Carola Cheroki

Estudo genético-clínico e molecular da
síndrome de Rokitansky-Mayer-Küster-Hauser
e condições afins

Tese apresentada ao
Departamento de Genética
e Biologia Evolutiva do
Instituto de Biociências
da Universidade de São
Paulo para a obtenção do
título de Doutor em
Ciências, na área de
Biologia/Genética

São Paulo

2008

Orientador

Prof. Dr. Paulo A. Otto

Cheroki, Carola

ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO E MOLECULAR
DA SÍNDROME DE ROKITANSKY-MAYER-KÜSTER-HAUSER.
176 páginas

TESE (DOUTORADO)
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOLOGIA EVOLUTIVA.

1. Aplasia útero vaginal. 2. Expressividade variável. 3.
Anomalias cromossômicas submicroscópicas.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. INSITUTO DE BIOCÊNCIAS.
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOLOGIA EVOLUTIVA.

Comissão Julgadora

Prof(a) . Dr(a) .

Prof(a) . Dr(a) .

Prof(a) . Dr(a) .

Prof(a) . Dr(a) .

Prof. Dr. Paulo A. Otto

Orientador

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da CNPq
(bolsa de mestrado) e CAPES (bolsa de doutorado direto).

“Uno llega a ser grande por lo que lee y no por lo que escribe”.

Jorge Luis Borges

A minha família
Viviana, Tiky, Pamela e Carlos

Agradecimentos

Ao Professor Paulo Otto, meu (querido) orientador, pelo exemplo, dedicação e paciência.

À Dra. Regina Célia Mingroni Netto pela co-orientação desse trabalho e por ter permitido o uso de seu laboratório.

Às Dras. Carla Rosenberg e Ana Cristina Krepischi Santos pela colaboração com os experimentos de array-CGH e as correções de papers.

Às Dras. Angela M. Vianna Morgante, Luciana Amaral Haddad, Fernanda Sarquis Jehee, Rita M. C. Pavanello e ao Dr. Peter Pearson pelo apoio e sugestões.

Aos Drs. Ivo Pavanello Filho e Sebastião Zanforlin Filho pela realização do exame ginecológico e ultrassonográfico, respectivamente, de nossas pacientes.

Às Dras. Chong Ae Kim, Ada Husulak, Maria Marcela Bailez, Carlota Lopez Kaufman, e ao Dr. Enrique Bagnati pelo encaminhamento de pacientes.

À Dra. Carina Argüelles por ter permitido a utilização de seu laboratório na Argentina.

A Dra. Celia P. Koiffmann pela colaboração para coletar as amostras de pacientes em Buenos Aires.

Às pacientes e seus familiares.

Ao Centro de Estudos do Genoma Humano, pelo uso das dependências.

Aos amigos Juliana, Rafaella, Ronaldo, Karina e Fátima pelo carinho e imensa paciência no auxílio das técnicas de laboratório (em espanhol).

Aos amigos Lilian, Fernando, Jacaré, Ana Carla, Samaris e Teresa, pelos inesquecíveis momentos compartilhados.

A todos os funcionários e alunos do laboratório, Maraisa, Ligia, Paulo, Mara, Silvia, Claudia, Daniel, Larissa, Nathalia, Raquel, Joana, Ana Maria e Beto.

À minha família suplente: Jihane, Eliete, Fernanda, Sebá, Helvio, Andrea, Deisy e Claudio.

Aos meus amigos Ali, Lili, Erich, Caio, Vero, Andrea, Pao e Edgar; sempre encurtando as distancias.

Aos meus avós, pelo exemplo de luta e perseverança.

À minha irmã, pela alegria ilimitada.

Aos meus pais, Tiky e Viviana, sempre presentes, pelo incentivo incansável; sem os quais não teria finalizado minha tese.

Ao Carlos, meu companheiro de luta, por sempre ter acreditado em mim.

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	pág. 1
I.1 - Caracterização clínica da síndrome de Rokitansky (SR)	2
I.2 - Embriologia	4
I.3 - Defeitos associados à SR	9
I.3.1 - Defeitos renais	10
I.3.2 - Defeitos ósseos	12
I.3.3 - Defeitos de audição	14
I.4 - Outras seqüências malformativas	14
I.5 - Achados citogenéticos	17
I.6 - Genes candidatos da SR	18
I.6.1 - Os genes dos receptores do ácido retinóico (RA)	19
I.6.2 - O gene <i>LHX-1</i>	21
I.6.3 - O gene <i>WNT-4</i>	23
I.6.4 - O gene <i>KLHL-4</i>	24
II - OBJETIVOS	27
III - MATERIAIS E MÉTODOS	28
III.1 - Pacientes	28
III.1.1 - Análise clínica das pacientes argentinas	29
III.1.2 - Análise clínica das pacientes brasileiras	29
III.1.2.a - Primeiro atendimento: exame clínico geral	30
III.1.2.b - Segundo atendimento: exame ginecológico	30
III.1.2.c - Terceiro atendimento: diagnóstico por imagem	31
III.2 - Métodos de análise molecular	31
III.2.1 - Extração de DNA a partir de sangue periférico	32
III.2.2 - Amplificação dos fragmentos de DNA: PCR <i>Touch-Down</i>	33
III.2.3 - Triagem de mutações	35
III.2.3.a - SSCP	35
III.2.3.b - dHPLC	36
III.2.3.c - Seqüenciamento	37
III.2.3.d - <i>Array-CGH</i>	38
III.2.3.e - MLPA	39
III.2.3.f - Microssatélites	39

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	pág. 41
IV.1 - Resultados da análise clínica	41
IV.1.a - Descrição das pacientes brasileiras	40
IV.1.b - Descrição das pacientes argentinas	75
IV.1.c - Sumário dos achados da análise clínica	78
IV.2 - Discussão dos achados clínicos	82
IV.3 - Resultados da análise laboratorial: SSCP e dHPLC	102
IV.4 - Discussão dos resultados laboratoriais	103
IV.5 - Resultados da análise por Array-CGH	104
IV.5.a - Paciente nº16	107
IV.5.b - Paciente nº15	110
IV.5.c - Paciente nº19	112
IV.5.d - Paciente nº28	114
IV.5.e - Paciente nº2	117
IV.6 - Discussão dos resultados do Array-CGH	118
V - CONCLUSÕES	123
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
VII - ANEXOS	
VII.1 - Fichas de atendimento	
VII.2 - Termos de livre consentimento	
VII.3 - Temperaturas do dHPLC	
VII.4 - Heredogramas dos casos isolados	
VII.5 - Publicações	

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura nº 1 - Configuração anatômica das afetadas pela SR	Pág. 1
2 - Vista dorsal de um embrião de camundongo de nove dias	4
3 - Organização do mesoderma no embrião de seis semanas	5
4 - Desenvolvimento urogenital normal (XX e XY)	6
5 - Região abdominal de um embrião humano de sete semanas	6
6 - Identificação das três regiões dos ductos de Müller	7
7 - Esquema da genitália feminina normal em conceitos XX	8
8 - Esquema de agenesia renal unilateral	9
9 - Rim ectópico	10
10 - Rins em ferradura	10
11 - Seqüência de Klippel-Feil	13
12 - Deformidade de Sprengel (esquema)	13
13 - Deformidade de Sprengel (fotografia)	14
14 - Paciente com SR tipo B (associação MURCS)	15
15 - Estrutura dos genes <i>RAR-G</i> e <i>RXR-A</i> e de seus produtos protéicos	20-21
16 - Estrutura do gene <i>LHX-1</i> e de seu produto protéico	22
17 - Estrutura do gene <i>WNT-4</i> e de seu produto protéico	24
18 - Estrutura do gene <i>KLHL-4</i> e de seu produto protéico	26
19 - Heredograma da família do Caso nº 1	43
20 - Heredograma da família do Caso nº 9	51
21 - Heredograma da família do Caso nº 10	53
22 - Heredograma da família do Caso nº 28	74
23 - Gel de SSCP	102
24 - Eletroferograma da técnica de dHPLC	103
25 - Esquema da duplicação em 1q21.1 da paciente 16	109
26 - Esquema da duplicação em 22q11 da paciente 16	109
27 - Esquema da deleção em 22q11 identificada na paciente 15	111
28 - Esquema da deleção em 17q12 identificada na paciente 19	112
29 - Confirmação da deleção 17q12 por FISH	113
30 - Esquema da duplicação em 17q21.31 da paciente 28	114
31 - Esquema da deleção em Xq21.31	117
32 - Sumário de todas as alterações identificadas por array-CGH	122

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Síndromes com defeitos da genitália feminina	Pág. 16
2 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados	34
3 - Descrição clínica das pacientes argentinas	76-77
4 - Dados obtidos no 1º, 2º e 3º atendimentos	79-80
5 - Sumário das medidas antropométricas	81
6 - Alterações identificadas por SSCP e dHPLC	103
7 - Alterações identificadas pela técnica de Array-CGH	105
8 - Fenótipo das pacientes com alterações submicroscópicas	106
9 - Alterações detectadas no gene <i>KLHL-4</i>	118

I. Introdução

A síndrome ou seqüência malformativa de Rokitansky-Mayer-Küster-Hauser (SR ou aplasia útero-vaginal) caracteriza-se por agenesia parcial ou completa da vagina, associada a útero rudimentar (Fig. 1). É provável que o defeito genital se origine de uma falha na fusão da porção caudal dos ductos paramesonéfricos ou de Müller, fenômeno que resulta na formação de um tubo único (o canal útero-vaginal) que normalmente ocorre na oitava semana do desenvolvimento embrionário de conceptos femininos, uma semana após os ductos de Müller terem se diferenciado como uma invaginação do epitélio celômico que margeia a saliência mesonéfrica. Uma parte considerável das afetadas apresenta, além disso, defeitos renais e esqueléticos. A freqüência da SR ao nascimento foi estimada em taxas da ordem de grandeza de 1/5000 meninas ou 1/10000 recém-nascidos de ambos os sexos.

No catálogo de McKusick o defeito é classificado sem grandes comentários como autossômico recessivo, identificado sob o número OMIM 277000 e definido como síndrome da aplasia útero vaginal. A maioria dos casos descritos na literatura inclui freqüentemente outros defeitos e recebem alternativamente outras denominações, como discutiremos abaixo. Devido a isso, sempre que usarmos a sigla SR estaremos nos referindo à síndrome de Rokitansky e condições afins.

Fig. 1 - Configuração anatômica mais freqüentemente encontrada em afetadas pela SR (agenesia parcial ou completa da vagina, associada a útero rudimentar)

[Desenho do Dr. Paulo A. Otto em relatório de bolsista da Dra. Rita de Cássia M. Pavanello]

I.1 Caracterização clínica da SR

Por um lado, a literatura especializada indica claramente que não existe ainda consenso quanto à precisa delimitação clínica da SR, que pode ser confundida com diversas outras condições clínicas mais ou menos afins, como a aplasia mülleriana. Por outro lado, existem indicações de que a SR é manifestação de seqüências e complexos malformativos mais amplos, como a adisplasia urogenital hereditária (HUA) e o complexo MURCS, que se explicam em detalhe no item I.3 e na Tabela 1. Isso tudo deve resultar, como acontece freqüentemente com outras patologias de origem embrionária, de que (1) defeitos com exatamente a mesma origem embrionária podem resultar em fenótipos mais ou menos diferenciados ou (2) defeitos com origens embrionárias distintas podem resultar em quadros aparentemente semelhantes.

Em 1968, Winter e col. descreveram uma família com várias irmãs com hipoplasia ou aplasia renal, atresia vaginal e anomalias de audição, condição essa denominada adisplasia urogenital hereditária ou HUA (Butcha e col., 1973). Schimke e King (1980) sugeriram que um gene autossômico, provavelmente dominante, seria responsável pelas anomalias müllerianas e renais encontradas na HUA, ao mesmo tempo em que propuseram a existência de uma relação entre a SR e HUA. Em 1984, Biedel e col. fizeram proposta semelhante, sugerindo um padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta e expressividade variável como responsável pela agenesia renal uni ou bilateral associada a um espectro variável de anomalias müllerianas. Ainda em 1984, Winer-Muram e col. associaram um caso de uma afetada por SR, agenesia renal unilateral e anomalias do espectro fácio-aurículo-vertebral ao complexo malformativo (atualmente definido como associação) MURCS. Bau e col. (1994) descreveram uma outra afetada por SR que apresentava hipoplasia femoral bilateral. Essas observações todas indicam que a SR é manifestação de complexos, seqüências ou associações com espectro clínico contínuo mais amplo, sendo provável que o diagnóstico de SR seja firmado preferencialmente quando estiverem ausentes manifestações extra-genitais conspícuas ou graves.

Embora na SR os ovários sejam praticamente normais na grande maioria dos casos, uma certa porcentagem das afetadas apresenta trompas uni ou bilateralmente displásicas, característica que foi usada para se propor a existência de subgrupos dentro da síndrome; empregando a técnica da laparoscopia exploratória, Strubbe e col. (1993, 1994) propuseram a existência na SR de dois subgrupos: tipo A (ou típico) com o útero representado por duas massas musculares simétricas e não funcionais, com trompas normais; e tipo B (ou atípico) em que as massas remanescentes do útero são claramente assimétricas e as trompas podem ser normais ou uni ou bilateralmente displásicas. As anomalias renais e esqueléticas comumente descritas na SR só foram encontradas entre casos do tipo B, mas nunca do A. Esses autores sugeriram também que o epônimo SR fique reservado aos casos em que o defeito genital não esteja associado a defeitos de coluna cervical e torácica que indiquem a seqüência de Klippel-Feil, situação em que os quadros seriam classificados como síndrome GRES (acrônimo de *genital-ear-renal syndrome*), também proposta por esses autores.

Como as afetadas pela SR apresentam vagina rudimentar terminando em fundo cego, a amenorréia primária e a dispareunia (sensação dolorosa à cópula) são as manifestações que, apesar de não serem exclusivas da SR, quase sempre fazem as afetadas procurarem orientação médica.

Opitz (1987) e Pavanello e col. (1988) sugeriram acertadamente que a SR e a adisplasia renal hereditária (HRA) possuem o mesmo fator etiológico com expressão variável (gene autossômico dominante com penetrância baixa ou, mais provavelmente, mecanismo multifatorial com gene principal segregando em algumas famílias). Pavanello e cols. (1988), além de fornecerem com sua casuística detalhes que fortaleceram definitivamente a hipótese de a SR fazer parte da associação MURCS, chamaram ainda a atenção para o fato de que praticamente todos os afetados pela síndrome de Potter (agenesia renal bilateral) de sexo feminino apresentam SR, além de defeitos esqueléticos semelhantes.

Pela descrição pouco freqüente na literatura de casos familiares da SR, juntamente com a impossibilidade de estudar-se a progênie das afetadas

- que sempre são estéreis - os estudos de ligação tornam-se inviáveis. Estudos com pares de gêmeas monozigóticas mostraram que um único gene autossômico recessivo não poderia explicar todos os casos de SR (Lischke e col., 1973). Com as novas técnicas de fertilização assistida, foi possível testar a hipótese de herança autossômica dominante (segundo a qual esperaria-se encontrar 50% prole feminina afetada) numa amostra de pacientes com ovários normais (Petrozcoa e col., 1997). Das 34 crianças que nasceram (metade das quais era de sexo feminino), nenhuma era afetada pela SR, o que descarta a possibilidade de herança autossômica dominante para SR.

I.2 Embriologia

O desenvolvimento do sistema urogenital em mamíferos depende da diferenciação coordenada de dois diferentes tecidos, o epitélio ductal e o mesênquima nefrogênico, ambos derivados, no embrião primitivo, do mesoderma intermediário (Fig. 2).

Fig. 2 - A: Microfotografia da vista dorsal de um embrião de camundongo de 9 dias (equivalente aproximadamente a um embrião humano de 22 dias). **B:** Um corte transversal da parte superior do embrião permite visualizar a organização do mesoderma intra-embriônico diferenciado em paraxial (amarelo), intermediário (verde) e lateral (vermelho). [Microfotografias obtidas de <http://www.med.unc.edu>]

Como mostrado no esquema da Fig. 2, o mesoderma intermediário estende-se ao longo de todo o comprimento da parede dorsal do corpo do embrião e, durante o desenvolvimento, perde a conexão com os somitos, formando a cada lado do notocórdio os denominados cordões nefrogênicos (indicado com o numero 8 na Fig.3). Esses cordões produzem protuberâncias longitudinais, denominadas saliências urogenitais.

Fig. 3 - Corte esquemático de um embrião com seis semanas de idade gestacional onde se pode ver a localização da crista genital (1), o epitélio celômico (2), o mesênquima local (3), as células primordiais germinais (4), a aorta (5), o tubo mesonéfrico (6), os ductos de Wolff (7) e o cordão nefrogênico (8) [Modificado de www.embryology.ch]

Diz-se que o sistema de ductos urogenitais encontra-se no estágio indiferenciado quando no embrião primitivo estão presentes tanto os ductos wolffianos como os müllerianos. Nos embriões 46,XY, as células de Leydig presentes nos testículos produzem andrógenos, hormônios que estimulam a diferenciação dos ductos de Wolff em vasos deferentes, epidídimo e vesícula seminal. Também nos testículos, as células de Sertoli secretam o hormônio anti-mülleriano (AMH), responsáveis pela degeneração dos ductos de Müller. Já nos embriões 46,XX a ausência de testículos e seus hormônios não impedem que os ductos de Wolff regridam e os de Müller se desenvolvam, dando lugar ao trato reprodutivo interno feminino (Fig. 4).

Fig. 4 - **A:** Esquema do sistema urogenital no estado embrionário indiferenciado, com ambos os tipos de ductos presentes, os quais podem se diferenciar em órgãos femininos ou masculinos de acordo aos hormônios secretados. **B:** Nas fêmeas XX as gônadas desenvolvem-se como ovários desde o córtex, os ductos de Müller persistem e se diferenciam nos órgãos do sistema reprodutivo feminino. Já os ductos de Wolff degeneram. **C:** Na presença do gene SRY a medula da gônada indiferenciada desenvolve-se como testículo, que secreta testosterona e o hormônio anti-mülleriano (AMH), os quais promovem respectivamente a diferenciação dos ductos de Wolff e a degeneração dos ductos de Müller [Modificado de Passarge, 2007].

Entre a 6^a e a 8^a semanas de vida intra-uterina, os ductos de Müller surgem das cristas urogenitais e crescem no sentido céfalo-caudal, paralelamente aos ductos de Wolff, já desenvolvidos (Fig. 5). Os dois ductos cruzam-se cima dos ductos de Wolff para posteriormente encontrar-se na linha mediana, fundindo-se e continuando a crescer caudalmente (Fig. 6).

Fig. 5 - A: Microfotografia da região abdominal de um embrião humano de sete semanas. **B:** Ampliação da imagem anterior expondo o estreito relacionamento dos sistemas renal e genital durante o desenvolvimento, os ductos de Wolff (verde claro) e de Müller (amarelo) crescendo em direção caudal paralelamente aos rins primitivos (azul) e as gônadas em desenvolvimento (vermelho). Microfotografias obtidas de: www.med.unc.edu/embryo_images

Em sua fase de crescimento céfalo-caudal, os ductos de Müller costumam ser divididos em três regiões. A região cefálica (indicada como CE na Fig. 6), a única onde os ductos não se encontram fundidos, diferencia-se dando origem às trompas de Falópio. As regiões mediana (ME) e caudal (CA) darão origem, respectivamente, ao corpo e ao colo do útero e aos 2/3 superiores da vagina (Fig. 7).

Acreditava-se que o terço inferior da vagina desenvolvia-se exclusivamente a partir do seio urogenital, mas trabalhos recentes com fêmeas de camundongos tratadas com androgênios sugeriram que a vagina se origina a partir da região caudal dos ductos de Müller e Wolff sem contribuição do seio urogenital, sob influência hormonal. (Drews e col., 2002).

Fig. 6 - A: Microfotografia (embrião feminino humano com 11 semanas) onde podem observar-se os ductos de Müller já fundidos na linha média. Nesta época é possível reconhecer nos ductos de Müller: a região cefálica (CE), que origina as trompas de Falópio; a região mediana (ME), já fundida, que se transforma no corpo uterino; e a região caudal (CA), que dá origem ao colo uterino e aos 2/3 superiores do canal vaginal. [Microfotografias obtidas de http://www.med.unc.edu/embryo_images]

Fig. 7 – Esquema do desenvolvimento da genitália feminina normal em conceitos XX. **A e B:** Genitália no início da 7ª e a 8ª semanas, respectivamente, mostrando o precursor do ligamento ovariano (1), os ductos de Wolff (2) e de Müller (3) unidos ao seio urogenital (5) e em processo de fusão entre si na linha média para dar origem ao canal útero-vaginal (4). **C:** No terceiro mês de vida intra-uterina a partir da porção cranial dos ductos de Müller, formam-se as trompas de Falópio (3b) e as paredes dos ductos fundidos desaparecem, dando lugar ao útero (4b) e a vagina (5b). **D:** Aspecto final da genitália interna feminina: ovários (6); ligamentos definitivos: ovariano (1b) e uterino (7), os remanescentes dos ductos de Wolff atrofiados (2b) e o hímen (8). [Modificado de <http://www.embryology.ch>]

Os ductos wolffianos e müllerianos possuem a mesma origem embrionária, têm comunicação intercelular ativa e encontram-se dentro de uma membrana basal comum no extremo caudal (Hashimoto, 2003), mas cada um deles é formado por um tipo celular único, reagindo de maneira própria aos hormônios sexuais (Jost e Magre, 1988).

Os componentes epiteliais não são os únicos derivados do mesoderma intermediário. As células do mesênquima migram do mesonefro para a gônada durante o desenvolvimento gonadal (Buehr e col., 1993). Mas apenas excepcionalmente as afetadas pela SR apresentam defeitos gonadais (Raybaud e col., 2001).

O desenvolvimento prévio dos ductos de Wolff é requisito indispensável para o crescimento posterior dos ductos müllerianos em direção ao seio urogenital (Hashimoto, 2003). Esse fato é constatado em camundongos *knockout* portadores de aplasia de ductos de Wolff, onde não foi possível detectar a presença isolada de ductos de Müller. Desde então se sugere a possibilidade de a superfície celular dos ductos de Wolff secretarem (ou expressarem) moléculas guia (ou indutivas) que contribuiriam para a adesão e proliferação celular durante o crescimento céfalo-caudal mülleriano (Hashimoto, 2003).

I.3 Defeitos associados à SR

Em 1976, Griffin e col. descreveram os achados clínicos em 14 pacientes com SR, realizando também uma revisão da literatura empregando os dados de 17 conjuntos de afetadas. Os defeitos mais freqüentemente encontrados (em 34% de todas as afetadas por SR) foram as anomalias do trato urinário, que incluíam agenesia ou ectopia unilateral de rim (Fig. 8 e 9, respectivamente), rim em ferradura (Fig. 10) e outros tipos de anomalias. Os defeitos esqueléticos ocorreram em 12% das afetadas e incluíam escoliose, espinha bífida, falha na segmentação de vértebras, hemivértebras, seqüência malformativa de Klippel-Feil (Fig. 11), anomalias de costelas e anomalia escapular de Sprengel (Fig. 12). Sete por cento das afetadas apresentavam hérnia inguinal e 4% eram portadoras de cardiopatia congênita.

Fig. 8 - Esquema mostrando a configuração anatômica presente em pacientes portadores de agenesia renal unilateral (E).
(Modificado de <http://www.embryology.ch/>)

Fig. 9 - Configuração anatômica encontrada nos portadores de rim ectópico. Na figura, o rim direito encontra-se localizado na cavidade pélvica. (Modificado de <http://www.embryology.ch/>)

Fig. 10 - Configuração encontrada em portadores de rins fundidos, também chamados rins em ferradura. (Modificado de <http://www.embryology.ch/>)

I.3.1 Defeitos renais

Os sistemas urinário e genital se originam do mesoderma intermediário; isso, somado à existência de genes em comum que controlam o desenvolvimento urogenital, faz com que afetadas pela SR comumente apresentem também defeitos renais.

A agenesia renal pode ser uni ou bilateral, mas é praticamente impossível determinar-se precisamente a frequência relativa dessas duas condições na SR, uma vez que a primeira é geralmente assintomática e a segunda é invariavelmente letal para seu portador. Uma das causas da agenesia renal completa é um defeito que ocorre na porção do ducto mesonéfrico da qual se origina o broto ureteral: como os ductos de Müller são orientados em seu desenvolvimento pelos ductos de Wolff, qualquer defeito que impeça a evaginação do broto ureteral a partir do ducto de Wolff redundará na ausência de crescimento caudal do ducto de Müller

(Hashimoto, 2003). De acordo com Griffin e col. (1976), como o ducto mesonéfrico origina o ducto metanéfrico e, posteriormente, estruturas renais e o sistema coletor urinário, tanto as anomalias do sistema urinário quanto os defeitos uterinos e vaginais poderiam ser explicados através de um único defeito no ducto de Wolff.

A ausência unilateral do rim, além de encontrar-se freqüentemente associada à ausência total ou parcial de órgãos reprodutivos femininos, associa-se também, embora menos freqüentemente, a uma variedade de formas de duplicação uterina e vaginal. No entanto, as relações exatas entre o desenvolvimento embrionário destas estruturas ainda não estão totalmente esclarecidas e têm sido objeto de numerosos estudos.

Potter (1946, 1965) estudou casos de agenesia renal bilateral encontrados em necropsias realizadas em fetos recém-nascidos. Em todos os fetos de sexo feminino da série mais antiga foi constatada agenesia uterina e vaginal e foram encontradas malformações esqueléticas associadas, semelhantes àquelas que freqüentemente se associam à SR (anomalias de segmentação de vértebras cervicais, costelas e espinha bífida). Na segunda casuística, apenas um de 13 fetos de sexo feminino possuía útero e vagina normais. Em dois casos, o útero era duplo e em um deles a vagina estava totalmente ausente. Nos dez casos restantes, o útero e a vagina encontravam-se ausentes ou eram extremamente rudimentares. Em todos os casos da segunda série, as trompas e ovários eram normais.

A alteração mülleriana presente na quase totalidade dos casos de síndrome de Potter de sexo feminino é compatível com uma falha completa de desenvolvimento da porção dos ductos de Müller que se fundem para formar o útero e a vagina, geralmente sem comprometimento das trompas. O defeito é aparentemente idêntico ao que ocorre nas pacientes com SR. Devido a isso, Pavanello e col. (1988) sugeriram que a agenesia renal bilateral possa representar uma forma extrema de manifestação do mesmo tipo de defeito presente na SR. Desta maneira, existiriam vários estágios intermediários entre a SR sem comprometimento renal até a síndrome de Potter, condição

incompatível com a sobrevivência extra-uterina que representa o grau máximo de expressão do defeito.

I.3.2 Defeitos ósseos

As malformações esqueléticas mais freqüentemente associadas à SR são anomalias de vértebras e costelas, principalmente ao nível de coluna cervical inferior e torácica superior.

Tanto o mesonefro como o sistema esquelético são estruturas derivadas do mesoderma; por volta do 25º ao 28º dia de vida embrionária existe uma relação de proximidade espacial íntima entre os somitos cervicais inferiores que originam tais estruturas e os somitos que dão origem às estruturas gênito-urinárias. É portanto razoável supor-se que algum defeito na organização do mesoderma, na região destes somitos vizinhos, possa causar anomalias simultâneas do sistema esquelético e dos órgãos derivados do mesonefro, com subseqüentes anomalias renais e genitais.

Dentre os defeitos esqueléticos congênitos associados à SR, a seqüência de Klippel-Feil (KF) é um dos mais freqüentes, caracterizando-se primariamente por fusão das vértebras cervicais; por causa disso, os afetados apresentam comumente implantação baixa dos cabelos na nuca, pescoço curto e limitação dos movimentos cervicais laterais (OMIM 148860, Fig. 11). A seqüência de KF pode ocorrer isoladamente ou fazer parte da síndrome de Rokitansky (ou condições afins) e de seqüências e complexos malformativos mais abrangentes, como a associação MURCS, que descreveremos mais abaixo. Outro defeito esquelético que pode ocorrer sob forma esporádica na população ou também fazer parte da SR é mostrado nas Figuras 12 e 13: a deformidade ou anomalia escapular de Sprengel (OMIM 184400), caracterizada pela luxação (uni ou bilateral), para cima, do omoplata.

A anomalia de Klippel-Feil e a deformidade de Sprengel são defeitos caracterizados pela ocorrência de dismorfologias faríngeas e laríngeas, (sub) occipitais, cervicais, de ombros; e de dificuldade para engolir.

A espinha bífida oculta (confinada à região cervical) incluindo o músculo trapézio encontra-se também freqüentemente associada. Na deformidade Sprengel, todos os elementos endocondrais dorsais da região occipital derivados da crista neural são substituídos por uma estrutura fibrosa denominada omo-vértebra. A deformidade de Sprengel é identificada com base nessas características, e como sendo uma das variantes fenotípicas da anomalia de Klippel-Feil. A mobilidade limitada dos movimentos laterais encontrada nos pacientes portadores do defeito de Klippel-Feil é consequência de falhas na diferenciação da região PONC (*post-otic neural cells*). O fenótipo encontrado nas pacientes é decorrência da ossificação das PONC no tecido conjuntivo do trapézio, ao redor dos precursores das vértebras cervicais e nos ligamentos pré-vertebrais dos músculos faríngeos.

Figura 11 - A: Paciente afetado pela seqüência de Klippel-Feil mostrando pescoço curto e implantação baixa do cabelo na nuca. **B:** Raios-X de coluna cervical mostrando a fusão de vértebras. (Jones, 2006)

Fig. 12 - Deformidade de Sprengel da cintura escapular. (Modificado de Meschan, 1963)

Fig. 13 - Paciente de seis anos de idade portador da deformidade de Sprengel, mostrando a assimetria escapular característica do defeito. (Modificado de <http://www.kinderorthopaedie.de>)

I.3.3 Defeitos de audição

Em 1982, Willensen chamou a atenção para a queixa de defeitos auditivos entre pacientes com SR que apresentavam também defeitos renais. Saito e col. (1982) e Bhaya e col. (1993) descreveram defeitos anatômicos do aparelho auditivo em recém nascidos com quadros típicos de síndrome de Potter. Defeitos auditivos neurosensoriais (que estão presentes em no máximo 1\3 das pessoas da população geral) foram descritos em mulheres portadoras de defeitos müllerianos por Latterie e Vauss em 1991. Supondo que a associação entre defeitos urogenitais e esqueléticos possa ser explicada através de uma origem mesodérmica única, fica difícil explicar a origem das anomalias auditivas que também se associam, com certa frequência, à SR.

I.4 Outras seqüências malformativas

A quase totalidade dos defeitos anatômicos que já foram descritos na literatura como associados à SR, em maior ou menor frequência, fazem parte de um padrão malformativo, bem mais amplo, designado como associação MURCS (OMIM 601076).

A associação MURCS (Fig. 14), descrita por Duncan (1979), inclui comumente baixa estatura, defeitos ósseos de coluna cervical inferiores e torácica superior, costelas, cintura escapular e membros superiores, anomalia de Klippel Feil, dismorfias crânio-faciais (defeitos de pavilhão auricular, assimetria facial, micrognatia, fendas labiais e palatinas), surdez, ectopia ou agenesia renal, defeitos gastrointestinais e genitais (agenesia total ou parcial de vagina, útero e trompas).

Fig. 14 - Fotografias de uma paciente com de SR tipo B ou associação MURCS. **A:** defeito de curvatura de coluna, defeito de Klippel-Feil e anomalia de Sprengel. **B:** assimetria facial e pescoço curto. **C:** agenesia de polegar direito e camptodactilia do esquerdo.

A hipótese formulada para explicar a origem dos defeitos característicos da associação MURCS é exatamente a mesma que existe para explicar a SR e suas malformações associadas: o íntimo relacionamento espacial no final da 4ª semana de vida fetal do blastema dos somitos cervicais inferiores, torácicos superiores, brotos de membros superiores e ductos müllerianos. Uma única alteração dos blastemas nessa época afetaria diretamente o desenvolvimento das vértebras, costelas, escápula, membros superiores, rins e trato genital.

As semelhanças e diferenças entre a SR e outras síndromes (ou seqüências malformativas) que apresentam também defeitos da genitália feminina com malformações do trato urinário estão detalhadas na Tabela 1. Nela se incluem: o espectro fácio-aurículo-vertebral (OMIM 164210), a displasia renal hereditária (HRA - OMIM 191830), síndrome de diabetes e cistos renais (MODY V - OMIM 137920), síndrome de *Cat eye* (OMIM 115470) e a síndrome pé-mão-genitália (*hand-foot-genital* ou HFG - OMIM 140000).

	MRKH/MURCS [277000/601076]	FAV spectrum [164210]	HRA [191830]	MODY V [137920]	CES [115470]	HFGS [140000]
Descrição fenotípica	Ausência congênita de útero e vagina/aplasia mülleriana, agenesia renal unilateral, displasia de somitos cervico-torácicos	Espectro fácio-aurículo-vertebral	Adisplasia renal hereditária, agenesia renal bilateral ou síndrome de Potter	Síndrome de cisto renal e diabetes	Síndrome de 'Cat eye' ou tetrassomia parcial do cromossomo 22	Síndrome pé-mão-genitália
	AD?/esporádico 1/4000	AD, 1/3000 - 1/5000	não determinado	AD	AD	AD
Defeitos urogenitais	agenesia/aplasia uterina, útero bicornio, agenesia de terço superior de vagina	aplasia uterina, aplasia/atresia vaginal	útero/vagina malformada	aplasia vaginal, útero rudimentar	agenesia/hipoplasia de útero, atresia vaginal	septos vaginais, útero duplo/bicornio
	agenesia renal unilateral, ectopia renal, rim em ferradura	agenesia renal unilateral, ectopia renal, rins fundidos	agenesia/adisplasia renal uni ou bilateral	agenesia renal unilateral, hipoplasia renal, falha renal crônica	agenesia renal unilateral	insuficiência renal
Defeitos ósseos	pescoço curto, defeitos de curvatura de coluna, vertebrais e de costelas, deformidade de Sprengel e anomalia de Klippel-Feil	defeitos vertebrais, polegar hipoplásico	deformidade de pés e mãos		aplasia de rádio	deformidade de pés e mãos
Face e audição	assimetria facial, palato/lábio fendido, micrognatia, surdez condutiva, orelhas malformadas	face assimétrica, hipoplasia malar e maxilar, palato/lábio fendido, macrostomia, micrognatia, estrabismo, microftalmos, coloboma de íris, glaucoma, orelhas malformadas de implantação baixa, surdez	orelhas grandes e de implantação baixa hipoplasia maxilar, hipertelorismo		palato fendido, micrognatia, hipertelorismo, coloboma de íris, estenosis de canal auditorio, orelhas de implantação baixa, fendas palpebrais inclinadas	
Outros	defeitos cardíacos	defeitos cardíacos			defeitos cardíacos	

Tabela 1: Semelhanças e diferenças entre síndromes que afetam o desenvolvimento de trato genital feminino, acompanhado de defeitos renais e esqueléticos. (Modificado de Guerrier e col., 2006; Kobayashi e Behringer, 2003)

Além das síndromes, seqüências ou complexos já citados, dos quais a SR pode fazer parte, existem relatos da ocorrência de defeitos müllerianos em outras síndromes raras (Verp e col., 1983), como é o caso da síndrome HFG (de *hand-foot-genital syndrome*), na qual os afetados apresentam, além de útero bicornio ou duplo, defeitos ósseos das extremidades.

Em 1990, Wulfsberg e col. descreveram quatro casos de SR associada à seqüência fácio-aurículo-vertebral, também denominada síndrome de Goldenhar (OMIM 164210), cujo fenótipo incluía face esquerda hipoplásica, microtia esquerda sem canal auditivo externo, palato fendido, rim direito ectópico em ferradura, vagina terminando em fundo cego e útero ausente. Os autores propuseram a possibilidade de o defeito ser o resultado de uma disrupção no mesoderma embrionário (ou no tecido que o originou) no momento da formação da linha primitiva.

A ausência congênita de útero e vagina tem sido descrita em associações casuais com outros defeitos, doenças e síndromes como agenesia gonadal (Raybaud e col., 2001; Gorgojo e col., 2002; Aydos e col., 2003), defeitos de membros, como a sindactilia (Turunen, 1957), defeitos auditivos (Strübbe e col., 1994), hipoplasia femural bilateral (Bau e col., 1994), síndrome de Silver-Russel (Bellver-Pradas e col., 2001), síndrome da anquilose do estribo (Cremers e col., 1995), síndrome de Sotos (Bussi e col., 2001), síndrome de Meckel-Gruber (Agapitos e Christouloudou, 1995), síndrome reno-aurículo-facial (Willemsen, 1982) e síndrome velo-cárdio-facial (Devriendt e col., 1997).

I.5 Achados citogenéticos

Em praticamente todas as mulheres portadoras de SR o cariótipo é normal (46,XX), como também os níveis dos hormônios sexuais e o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários.

Embora as afetadas não apresentem defeitos cromossômicos, sob o ponto de vista prático sempre se realiza o estudo cariotípico das pacientes suspeitas de serem afetadas com a finalidade de afastar a possibilidade de tratar-se de um caso de síndrome de Morris (feminização testicular completa

ou síndrome da insensibilidade periférica aos androgênios), condição com a qual o diagnóstico diferencial é obrigatório e cujo cariótipo é 46,XY.

Apenas ocasionalmente defeitos cromossômicos foram detectados em afetadas pela SR; entre esses, cariótipo 46,X,del(X)(pter-q22) em uma mulher de 19 anos com disgenesia gonadal (Aydos e col., 2003); mosaico 45,XO/46,XX em uma afetada com agenesia renal unilateral (Altieri e col., 1982); translocação recíproca dos cromossomos 3 e 16 resultando em cariótipo 46,XX,t(3;16)(p23;p13.3) em uma mulher com agenesia útero-vaginal (van Lingen e col., 1997); mosaico parcial de trissomia 8 em uma mulher com assimetria facial, aplasia mülleriana, defeito renal e esquelético (Loeffler e col., 2003) e translocação t(12;14)(q14;q31) em duas mulheres não aparentadas, sem trompas e útero e com vagina terminando em fundo cego (Tanejá e col., 1986 e Kucheria e col., 1988).

Dado o grau de dificuldade no diagnóstico clínico preciso da SR e a frequência insolitamente baixa com a qual ocorreram esses casos com cariótipo anômalo, é possível que muitos deles não tenham nenhuma relação causal com a SR.

I.6 Genes candidatos

Os mecanismos moleculares precisos que regulam o desenvolvimento embrionário urogenital em mamíferos ainda não são conhecidos em detalhe. Timmreck e col. (2003) realizaram uma revisão dos trabalhos sobre malformações decorrentes de defeitos müllerianos e forneceram uma lista dos genes excluídos como fator etiológico desses defeitos. Entre os genes listados encontra-se o regulador da condutância transmembranar da fibrose cística (Timmreck e col., 2003); o gene da galactose-1-fosfato-uridil-transferase (Klipstein e col., 2003); os genes que codificam o hormônio anti-mülleriano e seu receptor (Resendes e col., 2001); os genes homeóticos *HOXA-10* (Lalwani e col., 2001) e *HOXA-13* (Karnis e col., 2000); o gene *PAX-2* (van Lingen e col., 1998), o *WNT7-a* (Timmreck e col., 2003) e o gene *WT-1* que codifica fator de transcrição do tumor de Wilms (van Lingen e col. 1998).

I.6.1 - Os genes dos receptores do ácido retinóico (RA)

Durante a pesquisa de levantamento que realizamos sobre possíveis genes candidatos a fator etiológico da SR, chamaram a nossa atenção os trabalhos de Kucheria e col. (1988), Mendelsohn e col. (1994) e Kastner e col. (1997). O primeiro desses trabalhos descreve duas afetadas por aplasia útero-vaginal não aparentadas entre si e portadoras de uma mesma translocação (12;14)(q14;q31). Os dois outros trabalhos verificaram que camundongos *knockout* portadores de mutações em genes codificadores de receptores do ácido retinóico (RA) apresentavam uma série de defeitos similares àqueles presentes em pessoas portadoras de complexos e seqüências que contêm a SR. Ora, a região homóloga de um desses receptores corresponde exatamente à região 12q14 em humanos, localizada no segmento envolvido na translocação descrita por Kucheria e col. (1988).

A vitamina A e seus derivados ativos, referidos conjuntamente como ácidos retinóicos (*retinoic acid* ou RA), possuem função crítica durante o desenvolvimento e papel importante na homeostase de quase todos os tecidos de vertebrados, devido aos seus efeitos reguladores na diferenciação, proliferação e apoptose celular (Ross e col., 2000).

Durante o desenvolvimento embrionário, a complexa maquinaria molecular de transdução dos sinais do RA é exercida mediante duas superfamílias de receptores nucleares esteróides/tiróides: os chamados receptores RAR (ativados por todas as formas fisiológicas de AR) e os RXR (ativados unicamente por 9-cis RA). Cada família possui três isotipos (alfa, beta e gama) codificados por diferentes genes originando pelo menos duas isoformas para cada receptor. As diversas isoformas dos receptores transduzem os sinais do RA como dímeros e, além da formação de homodímeros RAR-RAR ou RXR-RXR, esses receptores existem também como heterodímeros RXR-RAR funcionais durante o desenvolvimento embrionário (Mendelsohn e col. (1994).

Embora cada tipo de camundongo *knockout* estudado por Kastner e col. (1997) possua geralmente um conjunto típico de defeitos fenotípicos, os autores afirmaram que os portadores de mutações compostas, particularmente nos genes que codificam as isoformas *RAR-gama* e *RXR-alfa* (Fig. 15-A e 15-B) dos receptores, apresentam defeitos dos derivados müllerianos, de rim e dos ureteres. Resultados semelhantes em camundongos com defeitos no aparelho urogenital feminino foram descritos por Mendelsohn e col. (1994) em animais portadores de mutações do gene do receptor *RAR-G*.

Esses resultados indicam que os RA, juntamente com seus pares específicos de receptores nucleares, seriam necessários para a nefrogênese e o desenvolvimento mülleriano normais; e que o receptor *RAR-gama* desempenharia vários papéis nos estágios iniciais do desenvolvimento.

Os vários genes não-alélicos que codificam esses receptores caracterizam-se por ter redundância funcional, provavelmente para garantir a transcrição dos genes-alvo. Não podemos descartar a possibilidade dessa redundância ter relação com o fato de que as anomalias causadas por mutações nesses genes freqüentemente possuem expressividade variável e penetrância incompleta (Lohnes e col., 1994).

Gene *RAR-G* ou *Retinoid acid receptor gamma*
Localização: 12q13.13
Organização: 8 exons
Tamanho do ADN: 17,10kb.
Tamanho do ARNm: 2599 bases

Gene *RXR-A* ou *Retinoid X receptor alfa*
Localização: 9q34.3
Organização: 9 exons
Tamanho do ADN: 38,95kb
Tamanho do ARNm: 5333 bases

Fig. 15 - A: Posicionamento dos exons (vermelho) e os introns (preto) dos genes *RAR-G* e *RXR-A*.

Produto protéico do gene *RAR-G*: 454 aminoácidos - 50.342 Da
 Localização primária: nuclear
 Função molecular: atividade regulatória da transcrição
 Processo biológico: regulação e metabolismo de ácidos nucleicos

Produto protéico do gene *RXR-A*: 462 aminoácidos - 50.800 Da
 Localização primária: nuclear
 Função molecular: receptor nuclear ligando-dependente
 Processo biológico: comunicação celular e transdução de sinais

Fig. 15 - B: Esquema dos domínios funcionais do cada produto protéico dos genes *RAR-G* e *RXR-A*. (Modificado de <http://www.hprd.org/query>)

I.6.2 - O gene *LHX-1*

O grupo de genes LIM, dos quais o *LHX-1* faz parte, constituem uma grande família cujos produtos protéicos carregam o domínio LIM; um domínio multifuncional proteína-proteína de união ao zinco, rico em cisteína de aproximadamente 60 aminoácidos. Pelo menos 40 membros desta família têm sido identificados em vertebrados e invertebrados, sendo eles organizados em quatro grupos de acordo com o número de domínios LIM e da presença de homeodomínios e domínios kinase.

Durante a embriogênese, o gene *LHX-1* (Fig. 16) se expressa inicialmente no mesoderma, e mais tarde durante no desenvolvimento dos sistemas urogenital e nervoso, do rim e do fígado. No adulto, a expressão é restrita a rins e cérebro. Embora nenhum defeito fenotípico tenha sido associado ao gene *LHX-1* em humanos (Hunter e Rhodes, 2005), Kobayashi e col. (2003) mostraram que nas células precursoras müllerianas de camundongos existe expressão do gene *Lim-1*, equivalente murino do *LHX-1* humano. Os camundongos com mutação em homozigose desse gene possuem um fenótipo similar ao da SR, o que sugere que o produto de *Lim-1* é essencial durante o desenvolvimento dos ductos müllerianos.

Para compreender as interações entre o gene *Lim-1* e outros genes possivelmente relacionados com falhas no desenvolvimento do trato genital, verificou-se a expressão dele em camundongos com mutações *Wnt-4*, *Pax-2* e *Wnt7a*. Os resultados indicaram que *Lim-1* é necessário em estágios iniciais da formação do epitélio mülleriano, funcionando de uma maneira independente dos genes *Wnt-4*, *Pax-2* e *Wnt7a*, mencionados acima.

Gene *LHX-1* ou *LIM homeobox protein 1*

Localização: 17q12

Organização: 5 exons

Tamanho do ADN: 5.99kb

Tamanho do ARNm: 2283 bases

Produto protéico: 406 aminoácidos - 44.808 Da

Localização primária: nuclear

Função molecular: fator de transcrição

Processo biológico: regulação e metabolismo de ácidos nucleicos

Fig. 16: Disposição dos exons e introns (vermelho e preto, respectivamente) do gene *LHX-1*, juntamente com as características funcionais do seu produto protéico. (Modificado de <http://www.hprd.org/query>)

1.6.3 - O gene *WNT-4*

Recentemente, foram incluídas no catálogo *on line* OMIM evidências indicando a SR ser causada por mutação no gene *WNT-4* (Biason-Laubert e col., 2004). O gene pertence à família de genes *WNT*, que codificam uma família de moléculas sinalizadoras altamente conservadas com papel destacado nos processos de desenvolvimento (Wodarz e Nusse, 1998). Estas proteínas têm sido implicadas em ontogênese e em diversos processos do desenvolvimento, incluindo regulação da diferenciação celular e o padrão corporal durante a embriogênese. O produto do gene *WNT-4* (Fig. 17) é uma molécula sinalizadora que forma parte da cascata de determinação do sexo do embrião, sendo comprovadamente necessárias nas etapas iniciais do desenvolvimento do aparelho urogenital feminino e da prevenção da formação dos testículos.

O gene codifica uma proteína com 98% de identidade com a proteína de camundongo e rato [<http://www.netpath.org>]. Sabe-se que durante o desenvolvimento embrionário de camundongos o produto do gene *WNT-4* é necessário (1) na formação dos ductos müllerianos, (2) na diferenciação das células da linhagem intersticial e (3) no desenvolvimento e manutenção pós-meiótica dos ovócitos (Vainio e col., 1999; Kobayashi e col., 2003).

Em conceptos femininos, o produto do gene *WNT-4* suprime a diferenciação de precursores das células de Leydig nos ovários e na ausência da sinalização do gene ocorre secreção ectópica de testosterona e persistência dos ductos de Wolff (Vainio e col., 1999). Embora os níveis de hormônios sejam insuficientes para virilizar a genitália externa, existe masculinização interna nas mutantes fêmeas de camundongos (persistência dos ductos wolffianos); esse fenótipo recebe a denominação de reversão sexual parcial (Vainio e col., 1999; Heikklä e col., 2001).

Em uma paciente 46,XX portadora de mutação no gene *WNT-4*, Biason-Lauber e col. (2004) identificaram virilização similar à descrita em fêmeas de camundongos. Essa paciente apresentava um quadro clínico bastante semelhante ao da SR, porém acompanhado de sinais clínicos de hiperandrogenismo (virilização), característica esta que decididamente não

faz parte do quadro de SR. Portanto, a atribuição do gene *WNT-4* como candidato à síndrome de Rokitansky (OMIM, 2005) não nos pareceu adequada.

Como poderá ser visto nas secções seguintes, outros autores também realizaram testes moleculares no gene *WNT-4* em pacientes com e sem fenótipo virilizado e chegaram a conclusões semelhantes às nossas (Clément-Ziza e col., 2005; Biason-Laubert e col., 2007; Drummond e col., 2007).

Gene *WNT-4* ou *Wingless-type MMTV integration family, member 4*

Localização: 1p36.23-p35.1

Organização: 5 exons

Tamanho do ADN: 23,02kb

Tamanho do ARNm: 1198 bases

Produto protéico: 351 aminoácidos - 39.052 Da

Localização primária: extracelular

Função molecular: união ao receptor

Processo biológico: comunicação celular - transdução de sinais

Fig. 17 - Esquema da organização dos exons (vermelho) e introns (preto) do gene *WNT-4*. Os domínios funcionais do seu produto protéico também são apresentados. (Modificado de <http://www.hprd.org/query>)

1.6.4 - O gene *KLHL-4*

Este gene pertence à família de proteínas Kelch, com um amplo espectro de funções biológicas e com a estrutura característica de domínios organizados em tandem com duplas glicina-glicina e um domínio de união a proteína chamado POZ/BTB. Supõe-se que os motivos Kelch também são de união, mas a função ainda é desconhecida.

O gene *KLHL-4* possui seis domínios Kelch de 50 aminoácidos no extremo C-terminal, mapeia no cromossomo X, na banda q21.31, contém 11 exons e se

expande por 152.23 kb [<http://www.genatlas.org>]. O *splicing* alternativo do último exon do gene resulta em duas variantes que codificam isoformas com região C-terminal diferentes. O produto protéico é amplamente expresso em vários tecidos fetais, incluindo língua, palato e mandíbula. No adulto, a expressão está restrita a fibroblastos e outros sistemas incluindo reprodutor feminino e rins [<http://www.genecards.org>].

A semelhança estrutural entre *KLHL-4* e os primeiros genes da família descritos em *D. melanogaster* sugere que eles compartilham um ancestral comum. Atualmente existem vários parálogos identificados em humanos e pelo menos outros sete genes tipo Kelch mapeando em diferentes cromossomos (*IPP* no cromossomo 1; *KLHL-2* no cromossomo 4; *KLHL-3* no 5; *KLHL-1* no 13; *KIAA0132* no 19; para mencionar alguns).

O gene tem sido estudado em pacientes portadores de palato fendido e ankyloglossia [OMIM 303400], mas unicamente polimorfismos não patogênicos têm sido identificados (Braybrook e col., 2001). Embora a escassa fundamentação bibliográfica suportando a hipótese deste gene *KLHL-4* estar envolvido na ausência congênita de útero e vagina, nós demos início à triagem de mutações no gene devido aos resultados obtidos do array-CGH. Em uma de nossas pacientes com o fenótipo clássico de SR foi identificada uma deleção de 1Mb em Xq21.31 contendo unicamente este gene.

Gene *KLHL-4* ou *kelch-like 4*

Localização: Xq21.1-q21.33

Organização: 11 exons

Tamanho do ADN: 152.23Kb

Tamanho do ARNm: 5753 bases

Produto protéico: 718 aminoácidos - 80.245 Da

Localização primária: citoplasma

Função molecular: proteína de união ao citoesqueleto

Processo biológico: crescimento celular - manutenção celular

Fig. 18 - Esquema da organização dos exons (vermelho) e introns (preto) do gene *KLHL-4*. Os domínios funcionais do seu produto protéico também são apresentados. (Modificado de <http://www.hprd.org/query>)

II. Objetivos

- 1) Aplicar técnicas moleculares visando detectar possíveis mutações em genes candidatos (*RAR-G*, *RXR-A*, *WNT-4*, *LHX-1* e *KLHL-4*) ou regiões cromossômicas (empregando a técnica de array-CGH) ligados direta ou indiretamente à SR, suas condições afins e complexos e seqüências malformativas que freqüentemente a incluem;
- 2) Tentar, através de dados de exame clínico-ginecológico, de imagem e possivelmente dos resultados obtidos da aplicação de técnicas moleculares, diferenciar a SR de outras condições afins e de seqüências e complexos malformativas mais abrangentes;

III. Materiais e Métodos

III.1 - Pacientes

Cerca de 80 pacientes suspeitas de serem portadoras da SR foram atendidas no Laboratório de Genética Humana (LGH) do Departamento de Biologia do IB USP nos últimos 20 anos. Um projeto inicial sobre o assunto foi desenvolvido entre 1984 e 1987 pela Dra. Rita de Cássia Pavanello, sob orientação do Dr. Paulo A. Otto, projeto esse que culminou com a publicação de trabalho ainda até hoje considerado importante sobre o assunto (Pavanello e col., 1988). Retomamos a pesquisa contando inclusive com a colaboração informal da própria Dra. Pavanello (Ambulatório do Centro de Estudos do Genoma Humano do Departamento de Biologia do IB USP). Colaboraram também no presente estudo o Dr. Sebastião Zanforlin Filho, especialista em diagnóstico por imagem, e o Dr. Ivo Pavanello Filho, especialista em Ginecologia e colaborador tradicional com os grupos de pesquisa de genética humana e médica do Departamento de Biologia.

Foi também importante a ajuda que recebemos do Departamento de Ginecologia (Dr. Vicente Renato Bagnoli) e do Serviço de Arquivo Médico do HC-FM-USP. Várias pacientes foram colocadas a nossa disposição pela Dra. Chong Ae Kim (Departamento de Genética, IC-HC-FM-USP). A Dra. Berenice B. Mendonça, do Departamento de Clínica Médica da mesma instituição, colocou à nossa disposição os dados clínicos e o DNA de duas outras pacientes.

De Buenos Aires (Argentina) colaboraram conosco os seguintes profissionais: a Dra. Carlota Lopez Kaufman e Dr. Enrique Bagnati (Serviço de Ginecologia do Hospital Berdardino Rivadavia) e Dra. Maria Marcela Bailez, cirurgiã do Hospital de Pediatria S.A.M.I.C. Prof. Dr. Juan P. Garrahan. Ambos os grupos colocaram à nossa disposição 16 afetadas. O DNA dessas pacientes foi extraído no Laboratório do Instituto de Previsão Social (IPS), por cortesia da Dra. Carina Argüelles (Universidad Nacional de Misiones).

Todas as pacientes da amostra brasileira, reconvocadas entre aquelas já previamente atendidas no LGH ou enviadas por especialistas e serviços por nós contatadas, foram submetidas a exame clínico-ginecológico padronizado (orientado por ficha específica mostrada no Anexo VII.1) e de imagem para definição precisa de seu quadro clínico. Posteriormente todas as amostras foram submetidas a exames laboratoriais (citogenética e testes moleculares). Foram aplicados também exames de diagnóstico de imagem em todos os parentes próximos suspeitos de serem portadores de algum problema associado à SR, com a finalidade de detecção de portadores assintomáticos de defeitos müllerianos, renais e esqueléticos, seguindo as recomendações de Opitz (1987) e Pavanello e col. (1988).

A casuística do presente trabalho é composta de 43 propósitas, sendo 29 brasileiras e 14 argentinas. Familiares com algum defeito associado à SR (renal, ósseo ou auditivo) foram também investigados quanto à presença de mutações nos genes *RAR-A*, *RXR-A*, *WNT-4*, *LHX-1* e *KLHL-4*. No total analisamos amostras de sangue de 64 pessoas.

III.1.1 - Métodos de análise clínica das pacientes argentinas

Nas amostras de sangue obtidas de pacientes argentinas foi aplicado o mesmo protocolo de laboratório com realização de cariótipo e testes moleculares para triagem de mutações. O exame clínico-ginecológico padronizado e de imagem foi realizado pelos médicos especialistas dos próprios centros. Uma cópia de nossa ficha clínica, bem como do protocolo de coleta de sangue e o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo VII), foram traduzidos ao espanhol e preenchidos pelos especialistas com todos os dados das pacientes (clínicos, ginecológicos, de imagem, história familiar, etc.). Esses documentos foram entregues a nós juntamente com as amostras correspondentes de sangue periférico.

III.1.2 - Métodos de análise clínica das pacientes brasileiras

III.1.2.a - Primeiro atendimento: Exame clínico geral (realizado com a colaboração do Dr. Paulo A. Otto)

Entre os meses de março e julho de 2004, 29 pacientes portadoras de SR compareceram ao Centro de Estudos do Genoma Humano para realizar o exame clínico e submeter-se a entrevista de anamnese mediante orientação de ficha confeccionada especialmente para o projeto (Anexo VII). Ainda nesse atendimento foi coletada uma amostra de cerca de 10ml de sangue da paciente e, eventualmente de familiares em primeiro grau com suspeita de apresentarem algum defeito associado a SR. Também durante esse primeiro atendimento a consulete assinou o termo de livre consentimento aprovado pelo Comitê de Ética do ICB-USP (Anexo VII).

III.1.2.b - Segundo atendimento: Exame ginecológico (responsável: Dr. Ivo Pavanello Filho)

Após realizar o exame clínico, as pacientes foram encaminhadas para realizar o atendimento ginecológico. O critério de classificação de Tanner (I, II, III, IV e V) foi aplicado para o exame do desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários (mamas, pilificação axilar e pubiana). Mediante a palpação abdominal foram avaliados o útero e os anexos. O exame de toque (uni ou bidigital) permite determinar a elasticidade e profundidade do canal vaginal. Por último o exame especular confirmou a presença de vagina em fundo cego (exame não realizado em pacientes virgens). Verificou-se também se a paciente faz uso de molde e se foi submetida à vaginoplastia. A profundidade vaginal e a existência de reconstrução cirúrgica vaginal foram dados importantes para determinar a via (transvaginal ou transabdominal) de realização do exame ultrassonográfico no atendimento descrito a seguir.

III.1.2.c - Terceiro atendimento: Exame de diagnóstico por imagem (responsável: Dr. Sebastião Zanforlin Filho)

Devido ao fato de que a maioria das afetadas por SR apresentam agenesia uterina, os órgãos pélvicos estão comumente deslocados de sua posição habitual, o que torna o exame ultrassonográfico da pelve complicado e demorado. Por causa disso foi solicitado que as afetadas bebessem água (300ml) uma hora antes do início do exame, fato que permitiu utilizar a bexiga como contraste na tarefa de determinar a modificação da anatomia feminina na ausência de um dos órgãos de maior tamanho e localizou com mais facilidade os anexos e as gônadas. Cada exame durou aproximadamente 1 hora, durante a qual foram avaliados o tipo de defeito uterino, a profundidade vaginal e topografia, presença, localização, tamanho (longitudinal, anteroposterior e dorsolateral) e contorno dos ovários e rins. Outros dados coletados foram a presença de cistos ovarianos, a presença de duplicação pielocalicial e o tipo de trânsito ureteral (livre ou não). As trompas não foram visualizadas em nenhuma das pacientes.

Além desses três atendimentos, todas as pacientes de nossa amostra realizaram exame radiográfico de coluna cervical e dorsal com a finalidade de se verificar a existência de defeitos de curvaturas patológicas de coluna e, nos casos suspeitos, de seqüência de Klippel-Feil e anomalia de Sprengel da cintura escapular. Esse exame foi realizado, quando possível, em serviços que mantinham convênio com as famílias das afetadas, ou no serviço de Traumatologia do Hospital Universitário.

III.2 - Métodos de análise molecular

Baseados na pesquisa bibliográfica foram escolhidos três genes candidatos para dar início à triagem de mutações que poderiam estar relacionadas com o fenótipo da síndrome de Rokitansky. Os genes escolhidos foram: dois genes da superfamília de receptores nucleares do ácido retinoico, *RAR-G* e *RXR-A*; o gene *WNT-4*, membro da família Wnt de moléculas secretoras e fatores de sinalização (homóloga do gene *wingless* de *Drosophila melanogaster*). Após aplicar a técnica de array-CGH (a qual será

detalhada no item III.3.3.d), os genes *LHX-1* e *KLHL-4* também foram considerados candidatos e incluídos para triagem molecular nas 43 propósitas.

III.2.1 - Extração de DNA a partir de sangue periférico (modificado de Kunkel e col., 1977)

No primeiro atendimento, foram colhidas amostras de 10ml de sangue venoso periférico total em tubos (5ml) contendo EDTA 5%, pH 8,0 de cada paciente e, eventualmente, de familiares em primeiro grau com suspeita de apresentarem algum defeito associado à SR.

A cada amostra de 5ml foram adicionados 40ml de solução de lise (11g. de sacarose 0,32M; 1ml de Tris-HCL 1M pH 7,4; 0,5ml de MgCl₂ 1M, 1ml de TritonX100 1% e 100ml de H₂O milli-Q) em tubos plásticos. A mistura foi em seguida centrifugada a 4°C e 3.000 RPM por 20 minutos para precipitar os núcleos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 4,5 ml de tampão para digestão com proteinase K (NaCl 0,075 M; EDTA 0,02 M pH 8,0), para lise dos núcleos. Foram acrescentados 250 µl de uma solução de SDS 10% e 50µl de proteinase K (10mg/ml, dissolvida em água estéril e mantida no congelador). As amostras foram então incubadas em estufa a 37°C por uma noite. Cada amostra foi, em seguida, transferida para um tubo de vidro ao qual foram adicionados 5ml de fenol destilado e saturado em tampão (Tris-HCl 10mm; EDTA 10mm; NaOH 100mm; pH 7,4). As amostras foram homogeneizadas cuidadosamente invertendo-se o tubo, sendo em seguida centrifugadas a 4 °C e 3.000 RPM por 20 minutos. O sobrenadante é cuidadosamente transferido para um outro tubo limpo e esta seqüência é repetida mais duas vezes, substituindo-se os 5ml de fenol por 5ml de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 24:1. O sobrenadante final foi em seguida transferido para um tubo contendo 500µl de uma solução de KCl 2M onde o DNA é precipitado por inversão do tubo, com prévia adição de 12ml de álcool etílico gelado. Com auxílio de um capilar de vidro, o DNA foi extraído da solução, lavado em etanol 70% e secado ao ar livre por alguns minutos. Finalmente o DNA foi dissolvido em 500µl de TE (Tris-HCl 10mm; pH

7,4 e EDTA 1mm) em um tubo Eppendorf. As amostras foram colocadas a banho-maria a 65°C por 30 minutos para inativar as nucleases, mantidas por uma noite à temperatura ambiente para o DNA terminar de dissolver e finalmente guardadas no *freezer*. A concentração de DNA das amostras foi estimada mediante leitura em um espectrofotômetro a partir do valor da absorbância a 260nm.

III.2.2 - Amplificação dos fragmentos de DNA por PCR

O DNA foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) do tipo *Touch Down*. Este tipo de PCR possui uma temperatura inicial de hibridação (*annealing*) elevada (69°C) com diminuição progressiva de meio grau nas sucessivas fases até chegar a 62°C, característica esta que permite obter produto altamente específico. Para as reações de PCR (volume total de 25µl), foram utilizados 1µl de DNA genômico (100ng/ul), 2,5µl de dNTP (200µM de dCTP, dTTP, dGTP e dATP); 1,0U da enzima Taq polimerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) e 2,5µl de tampão (*buffer*) e um volume de 0,5µl (0,7 a 2,0µM) de pares de *primers* específicos e quantidade complementar de água.

As condições de amplificação foram as seguintes: quatro minutos de desnaturação inicial a 94°C, 69 ciclos de 40 segundos cada com temperatura inicial de 69°C e diminuindo meio grau por ciclo (até 62°C), dois minutos à 72°C (temperatura de *annealing*), seguidos de uma etapa de extensão de 2 minutos a 72°C. As seqüências completas dos pares de primers usados para amplificar os genes *RAR-G*, *RXR-A*, *WNT-4* e *LHX-1*; construídos mediante os programas PRIMER 3, [<http://frodo.wi.mit.edu>] e BLAST [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast] bem como os tamanhos dos fragmentos amplificados na reação de PCR são mostrados a seguir na Tabela 2. O resultado da amplificação por PCR foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (0,5µg/ml) e visualizado sob luz ultra-violeta.

Gene <i>RAR-G</i>			Gene <i>RXR-A</i>		
Exon	Seqüência do primer	Tamanho	Exon	Seqüência do primer	Tamanho
1F	cctcagagtggctattctctca	399 pb	1F	acctgcactgaccactctccc	252 pb
1R	tccccaaagatccctgagact		1R	acagcacctacctcccagag	
2F	accctcacatcactgcttcc	196 pb	2F	gtgtacaccccgtgactg	151 pb
2R	cactcccaccacgtacacac		2R	aatggcctgacaaccctgt	
3F	ctggtactcccagcattgtg	240 pb	3F	agaccagcaggtccctttct	180 pb
3R	gtaggaccgaagtgtcctcg		3R	actccctgttgtccatctcg	
4F	gtcctgaccctctccttgc	247 pb	4F	cttccctgggagccactg	170 pb
4R	ttccccaaagtgaagagtgc		4R	gcacaggctgcaactcac	
5F	accttctacccctcccctct	222 pb	5F	ctgggactgaatgtcctgct	130 pb
5R	gaccacagggcctaacttac		5R	gggagtgtcctggtacgtgt	
6F	cagcactaacctcctccac	277 pb	6F	tgagtactgtgtgcctcct	133 pb
6R	gactgagcactgagcagacg		6R	ggccaagggtggctgaact	
7F	cttccttcccctctcactcc	240 pb	7F	ggcaagaagtacagccagga	92 pb
7R	agccctgggaagacagaga		7R	acctaactgggatggggtgt	
8F	tgtcctcctgagcctctctc	290 pb	8F	gtgccaccttctcattcaca	106 pb
8R	TGGGAGATGGTCAGTCTGCT		8R	tgacctgtggcttcttcctt	
			9F	gtaggaccgaagtgtcctcg	247 pb
			9R	gtcctgaccctctccttgc	
Gene <i>WNT-4</i>			Gene <i>LHX-1</i>		
Exon	Seqüência do primer	Tamanho	Exon	Seqüência do primer	Tamanho
1F	aggcacacggaggcagag	383 pb	1F	ATCCCCCTGGGCTCTACTTTG	305 pb
1R	gggtgtgcagagggacgtt		1R	ACCTCTGATCCGAAGCTGG	
2F	aagatgaggaggtgggctct	381 pb	2F	ctttctctctccgcctgtctcc	366 pb
2R	gacctgcaatagtcccgttg		2R	CTTGGCGAGCCTTCCTC	
3F	atatgcccctcccctctac	236 pb	3F	CTGGCTGGCTAGGTGCAAG	412 pb
3R	actctgaccacctcctgcac		3R	TGCCCCAAAGTGGCAGTG	
4F	ctttctgtgcccaccacac	209 pb	4F	CTAGCCAGGCGGTGAAGG	359 pb
4R	ctatccctaccccgtccttg		4R	GGCTTACAGAGAGCGAGGC	
5A F	tcccttgccatctcctgat	300 pb	5F	CTTCCCTCCCTTTCGGTc	573 pb
5A R	ATGGCCTTGGACGCTTGT		5R	TTCTCGAGGCTGGAGGAAG	
5B F	AGTTCAAGCCGCACACAGAT	300 pb			
5B R	ccccaaaaccaaaccagaac				
Gene <i>KLHL-4</i>					
Exon	Seqüência do primer	Tamanho	Exon	Seqüência do primer	Tamanho
1F	aagcaagaaagactgtctctg	597pb	7F	tttgctttgtctcccaggtt	480pb
1R	aagttaactgaagttacggcattc		7R	aatcccaataatgtgctgct	
2F	aagtgtgatgcctaaatttccacc	494pb	8F	caatattcagtgtgtggcataccta	298pb
2R	agagggtgtgtttgtgctgt		8R	gattggatggatcatgtcacc	
3F	tgatgatggaaagtacagcaca	398pb	9F	tgcatgcattttgtgtgtatatg	388pb
3R	aatgtgttatgtaatgtagggtcatt		9R	gggcatagaactaaactgatttcc	
4F	ttgacgtagtttttactttatggaac	400pb	10F	tttaagaatgtctgttattttcagttg	352pb
4R	gcagctcaaccagacaaatg		10R	ttgttagggcctagagaagagaa	
5F	tctgtgtctcttgcattttctga	393pb	11F	agacaagggtgatgttagacaaa	291pb
5R	aagaaatggattagtgcctagtgg		11R	ccagtctgattattaattgcagga	
6F	cgttcttttctaattggtgaactctc	300pb	11bF	ccgtgttcacgattccctac	228pb
6R	tttggaggctgttaagaatgtatc		11bR	tatcaaaaaggggcaacagc	

Tabela 2 - Características dos *primers* utilizados na amplificação das seqüências codificantes dos genes *RAR-G*, *RXR-A*, *WNT-4*, *LHX-1* e *KLHL-4*. (F: foward; R: reverse; tamanho do amplicon em pares de bases)

III.2.3 - Triagem de mutações

III.2.3.a - Análise de polimorfismo de conformação de fita simples

O procedimento de SSCP (*single strand conformation polymorphism* ou polimorfismo de conformação de fita simples) foi um dos métodos usados no processo de triagem mutacional nos genes *RAR-G*, *RXR-A* e *WNT-4*. Esta técnica (do inglês *single strand conformation polymorphism*), foi descrita pela primeira vez por Orita em 1989, sendo um método de detecção de vários tipos de alterações incluindo mutações de ponto e pequenas inserções ou deleções. O método tem sensibilidade para identificar substituições de um único nucleotídeo. A estratégia do SSCP consiste das seguintes etapas: 1) amplificar o segmento de DNA por meio de PCR, 2) separar a dupla fita por meio de desnaturação com calor (95°C por 5 min.), 3) permitir que cada fita simples adote uma conformação estável mediante exposição ao frio (choque térmico da amostra em gelo) e, finalmente, 4) correr a amostra em eletroforese de gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (sem uréia) e revelar o gel por meio de nitrato de prata. A técnica se baseia na relação entre a mobilidade eletroforética da fita simples de DNA e sua estrutura secundária, a qual depende da seqüência de nucleotídeos. As substituições de bases podem levar a estruturas secundárias diferentes devido as interações intra-moleculares diferentes.

O fundamento da técnica de SSCP reside nas diferentes velocidades de migração eletroforética de fragmentos amplificados por PCR em gel não desnaturante. Utilizamos a eletroforese vertical em gel MDE[®] Gel Solution for heteroduplex and SSCP analysis (Cambrex Bio Science Rockland, Inc.) com adição de 3% glicerol. Os produtos de PCR eram acrescidos de *SSCP loading buffer* (formamida 95%, EDTA 0,02M, xilenocianol 0,5%, azul de bromofenol 0,5%) na proporção 1:1, sendo que 8µl da mistura eram utilizados para aplicação no gel. As condições de eletroforese, como a velocidade de migração (12 a 20 horas) e a temperatura (ambiente ou 4°C), foram adaptadas dependendo do tamanho de cada fragmento (100 a 400pb) e a velocidade de migração no gel. Assim, enquanto alguns amplicons migraram a 6W por 12

horas a temperatura ambiente; outros precisaram de 12W por 20 horas a 4°C. Os produtos eram visualizados após coloração com nitrato de prata como descrito por Bassam e cols. (1991) e depois de corado o gel era fotografado com filme Typopaque TR-DO (Typon).

Os genes *RAR-G*, *RXR-A* e *WNT-4* foram testados em todas as 43 pacientes com SR ou condições afins. Quando alguma alteração foi detectada no padrão de migração de bandas, os familiares da propósita eram também triados.

Os fragmentos com padrões da bandas alteradas no gel de SSCP foram em seguida submetidos ao seqüenciamento (ver Item III.2.3.c)

III.2.3.b - Cromatografia líquida desnaturante de alto desempenho

Após realizar a triagem nos genes *RAR-G*, *RXR-A* e *WNT-4* mediante a técnica de SSCP, possíveis mutações nos genes foram também triadas mediante a técnica de dHPLC ou cromatografia líquida desnaturante de alto desempenho. Esta técnica que recebe o nome do inglês *denaturing high performance liquid chromatography* é realizada no laboratório do Centro de Estudos do Genoma Humano usando o aparelho *Wave DNA Fragment Analysis System™* da Transgenomics, juntamente com o software Navigator versão 1.5.4 da Transgenomics que indica as temperaturas ótimas das colunas para cada amplicom (listadas no Anexo). Os tampões e as condições de corrida foram padronizados para cada fragmento amplificado por PCR *Touch-Down* nos três genes triados.

O primeiro passo para iniciar à triagem de mutações nos genes *RAR-G*, *RXR-A* e *WNT-4* mediante dHPLC é amplificar os fragmentos usando PCR *Touch-Down* nas mesmas condições descritas no item III.2.2. Cada tubo devidamente identificado e contendo uma mistura de 25ul de produto amplificado de amostra controle com 25ul de DNA amplificado da paciente foi aquecido até 94°C durante 10 minutos para desnaturar as fitas de DNA e posteriormente deixado esfriar lentamente até atingir a temperatura ambiente conseguindo assim a formação do heteroduplex. Deste modo, cada tubo a ser testado contém uma mistura de DNA de um controle previamente seqüenciado e DNA da paciente a ser triada. Isto permite detectar alterações em homozigose como

também em heterozigose. Um tubo extra, contendo uma mistura de dois pacientes controles é também adicionado na corrida para verificar o comportamento das fitas na ausência de alterações. As placas contendo os produtos amplificados com heteroduplex formado são colocadas no cromatógrafo. As curvas resultantes, correspondem à velocidade de liberação dos heteroduplexes da matriz e são analisadas e comparadas com as curvas dos controles. Aqueles fragmentos que apresentaram picos alterados são posteriormente seqüenciados (ver procedimento a seguir).

III.2.3.c - Seqüenciamento

Os amplicons dos genes *RAR-G*, *RXR-A* e *WNT-4* com padrões de migração alterada na eletroforese vertical ou com picos alterados na cromatografia líquida foram em seguida submetidos ao seqüenciamento. Dois novos genes foram considerados candidatos após a análise com a técnica de array-CGH (ver item III.2.3.d, a seguir). A metodologia adotada para a triagem de mutações desses dois novos genes (*LHX-1* e *KLHL-4*) foi o seqüenciamento direto. Independentemente de ter sido ou não utilizada uma técnica previa de triagem, a metodologia de seqüenciamento aplicada no estudo dos cinco genes foi a mesma.

Cada fragmento foi seqüenciado pelo menos duas vezes: uma vez com o *primer* F e uma vez com o *primer* R. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification on Kit* (Amersham Biosciences) e em seguida quantificados em gel de agarose 2%, utilizando como padrão o "*low DNA mass ladder*" (Invitrogen). Depois de purificados e quantificados, os produtos de PCR foram preparados para as reações de seqüenciamento em ambas as direções, nas seguintes condições: 60-100ng de DNA (amplificado e purificado), 5pmol de *primer*, 4μl de *DYEnamic ET terminator reagent premix* e água para completar o volume de reação para 10μl. A mistura foi submetida à reação de seqüenciamento: 30 ciclos de desnaturação, hibridação e extensão, de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C e 1 minuto a 60°C, respectivamente. Depois de serem precipitados com

etanol e serem ressuspensos com *loading solution*, os produtos foram analisados no analisador genético MegaBace 1000 (Amersham Biosciences).

III.2.3.d - Hibridação genômica comparativa

A análise por array-CGH (do inglês *comparative genomic hybridization*) é uma técnica de alta resolução que permite detectar variações no número de cópias de DNA entre uma amostra de referência (controle) e a amostra do paciente. Desta maneira é possível identificar alterações de grandes regiões cromossômicas como deleções e duplicações.

Quinze pacientes foram selecionadas por apresentar um quadro clínico mais grave (defeitos genitais, ósseos, renais e auditivo) e analisadas mediante a técnica de Array-CGH pelas Dras. Carla Rosenberg e Ana Cristina Krepischki Santos nos laboratórios do Centro de Estudos do Genoma Humano

Nessa análise foram utilizadas lâminas contendo triplicatas de ~3.500 sondas clonadas em BACs/PACs espaçadas a intervalos de ~1Mb, produzidas no *Leiden University Medical Center*, Holanda. As informações sobre o conjunto de clones utilizados estão disponíveis em www.ensembl.org (Cytoview, 1Mb clone set, Sanger Center). A hibridação foi realizada baseada em Carter e col. (2002).

As lâminas foram hibridadas com o DNA teste e o controle (referência), marcadas com Cy3 e Cy5-dCTPs e analisadas com o auxílio de um *scanner*. A intensidade dos pontos foi medida utilizando-se como ferramenta o *software* GenePix Pro4.1 (Axon Instruments, Holanda). A determinação de seqüências com possíveis alterações no número de cópias foi realizada com base no log₂ da razão entre as médias de intensidade das réplicas. As seqüências foram consideradas amplificadas ou deletadas quando os valores estarem fora do intervalo $\pm 0,3$.

As alterações no número de cópias do DNA foram validadas por: 1) hibridação fluorescente *in situ* (FISH), para as sondas correspondentes em células metafásicas das propósitas (baseado no protocolo de Rosenberg e col., 1994); 2) amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação (MLPA); ou por 3) marcadores polimórficos do tipo microssatélites. Uma vez

confirmada a alteração, se deu início a avaliação dos progenitores (quando disponíveis) ou de outras pessoas da família em relação as mesmas regiões.

As alterações sub-microscópicas identificadas em nossas pacientes por array-CGH sugeriram novas regiões cromossômicas contendo genes não previamente relacionados a ausência congênita de útero e vagina. Estes genes (*LHX-1* em 17q12 e *KLHL-4* em Xq21.21) foram incluídos na rotina de seqüenciamento (item III.2.3.c) já aplicada aos dois receptores RA e ao gene *WNT-4*.

III.2.3.e - Amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação

A técnica de MLPA (do inglês *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) permite quantificar de forma simples até 40 seqüências de ácido nucléico em uma única reação de amplificação (um tubo) realizada a partir de 20ng de DNA. Quando um gene ou parte dele encontra-se duplicado ou deletado as técnicas laboratoriais de PCR seguido de seqüenciamento apresentam limitações de detecção devido à presença do outro alelo normal amplificado na amostra. Nesses casos, a análise pela técnica de MLPA é a alternativa apropriada para contornar as limitações de outras técnicas por possuir capacidade de detectar variações no número de cópias de uma seqüência de DNA. O kit utilizado para análise do cromossomo 22 foi o SALSA P023 - DiGeorge(MRC-Holland; Amsterdam, Netherlands), gentilmente cedido pela Dra. Fernanda Sarquis Jehee do Laboratório de Genética Humana da Dra. Maria Rita Passos Bueno, e usado de acordo com as instruções do fabricante (Schouten et al., 2002).

III.2.3.f - Marcadores polimórficos do tipo microssatélite

Três alterações no braço curto do cromossomo 22 foram identificadas pela técnica de Array-CGH. Para determinar a origem parental dos rearranjos detectados e para avaliar a existência de alterações na região 22q nas demais pacientes que não foram testadas com Array-CGH; testamos cinco marcadores polimórficos de DNA para esse cromossomo (D22S1638, D22S1648, D22S944, D22S1623, e D22S1709).

As condições de amplificação dos marcadores foram as seguintes: 4 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 30 ciclos de 15 segundos cada com temperatura inicial de 94°C e 15 minutos à 55°C (temperatura de hibridação ou *annealing*), seguidos de uma etapa de extensão de 30 seg. a 72°C. Para a amplificação, o volume final da reação é de 10ul, contendo DNA genômico (50ng), uma mistura de *primers* marcados com fluorocromos a 20mM, e 6ul do *True Allele Premix™*, (solução que contém AmpliTaq Gold, dNTPs, tampão e cerca de 2,5mM de MgCl₂). Os produtos de amplificação juntamente com o padrão de peso molecular (MegaBace™ "ET550-R Size Standard") foram separados por eletroforese em capilar no aparelho MegaBace™ 1000 (Amersham Biosciences). A análise foi realizada, utilizando o software Genetic Profiler versão 1.5.

IV. Resultados e Discussão

Nesta secção apresentamos uma descrição sumária dos achados clínicos das pacientes de nossa amostra.

A casuística do presente trabalho é composta por dois grupos de propósitos: brasileiras (N=29) e argentinas (N=14). No grupo de afetadas brasileiras estudamos também 21 familiares que apresentavam algum defeito fenotípico (renal, ósseo ou auditivo) associado a SR. Nelas aplicamos um mesmo protocolo de triagem de mutações nos genes *RAR-G*, *RXR-A*, *WNT-4*, *LHX-1* e *KLHL-4*.

O total de pacientes triados é de 64 e a representação gráfica usada nos heredogramas foi o seguinte:

IV.1 - Resultados da análise clínica

IV.I.a - Descrição das pacientes brasileiras (Casos 1-29)

Caso nº1: paciente com defeito mülleriano isolado

Paciente A.M.V., Registro nº16936 (Laboratório de Genética Humana da USP), foi encaminhada pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina da USP (Reg.nº13451165-I). Negra, solteira, nasceu prematura (sic) de parto cesariano com 3150gr e 37cm, tendo chorado espontaneamente. Ao nascimento sua mãe e seu pai (não consangüíneos) contavam respectivamente com 37 e 41 anos de idade. Não há nenhuma menção a exposição materna a drogas, radiação ou infecções durante o período gestacional. A paciente relata cólicas muito intensas até os 12 anos, quando se submeteu a cirurgia de abertura do canal vaginal, ocasião em que se verificou que possuía ovários e útero ambos normais e funcionantes, hematometrio e hematocolpos. Atualmente menstrua

regularmente e as únicas queixas que apresenta são referentes a infecções recorrentes do aparelho renal. Relata também ausência de cera nos ouvidos e sudorese excessiva com descamação da pele das mãos. A paciente nega dores de coluna. Inteligência, audição e visão normais. Pubarca e telarca respectivamente aos 9 e 11 anos de idade.

Exame físico: Altura: 160cm; peso: 54kg; PC: 57cm; DIM: 23cm; DPV: 73cm; DPP: 87cm. Proporções corpóreas conservadas. Crânio e face normais. Pavilhão auricular hipoplásico. Má-oclusão dentária (faz uso de aparelhos). Pescoço normal. Sem anomalias evidentes de coluna dorsal. Caracteres sexuais secundários bem desenvolvidos (mamas e pilificação pubiana estágio V de Tanner). Genitália externa normal, útero e anexos palpáveis.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia pélvica ginecológica: bexiga, rins, útero (2,5x2,2x2,0cm) e ovários normais (Dir.:2,5x2,2x2cm e Esq.: 2,5x2,1x2cm). Vagina estreita em fundo cego com estenose do terço médio (corrigida).

3) Exame de Exame de raios-X de coluna cervical e dorsal: normais.

4) Testes moleculares: duplicação polimórfica em 19q13.11 detectada por array-CGH.

História familiar e heredograma: a mãe da paciente (II-10) refere ser portadora de útero retrovertido e mioma. Teve dificuldade para engravidar. É portadora de hérnia de disco, queixa de dores ciáticas e deficiência plaquetária (62-68 mil) e tireoidite e enxaquecas crônicas. Outros problemas mencionados na família são escoliose (III-1), ameaça de aborto (III-2), diabetes (I-8), retardo mental e agressividade (I-7), defeitos cardíacos (I-8 e I-9) e cirurgia por hérnia inguinal (III-4 e III-5).

Figura 19: Heredograma da família da paciente 1.

Caso nº 2: paciente portadora de SR tipo B

Paciente C.D.H., RG-LGH-USP nº15935, branca, casada, com 32 anos (DN: 22/12/1971) é filha de pais não consangüíneos e nasceu de parto eutócico sem histórico de exposição materna a drogas, radiação ou infecções durante a gravidez. A paciente refere ter procurado médico durante a adolescência por causa de amenorréia primária. Por ocasião de seu casamento a paciente apresentou dor e dificuldade em manter relações sexuais. Apresenta queixas de déficit auditivo unilateral à direita e de infecções urinárias recorrentes; desenvolvimento neuropsicomotor e pôndero-estatural normal; inteligência e visão normais; pubarca e telarca aos 11 anos.

Exame físico: Altura: 142cm; peso: 45kg; PC: 56cm; DIM: 21cm; DPV: 68cm; DPP: 74cm; normolínea; a paciente apresenta pescoço curto com limitação dos movimentos laterais, implantação baixa dos cabelos na nuca, pterígio cervical leve; o aspecto facial lembra as pacientes com s. de Turner ou s. de Noonan; orelhas de implantação baixa e rotação incompleta; palato alto; má oclusão dentária leve; assimetria escapular e escoliose cérvico-torácica; braquidactilia discreta (mãos). Caracteres sexuais secundários bem desenvolvidos (mamas e pilificação pubiana estágio V de Tanner). Genitália externa normal. Vagina terminando em fundo cego, com útero e anexos não palpáveis ao toque retal. Profundidade vaginal em toque bi-digital: 7cm.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia pélvica: agenesia completa de útero com vagina curta terminando em fundo cego. Ovários visualizados (dir.: 4,5x1,8x4,2cm e esq.: 2,1x1,4x2,3cm) com topografia normal e sem presença de formações policísticas. Rins de contornos normais (dir.: 3,9x3,5x4,5cm e esq.: 9,4x4,3x4,8cm) com sistema pielocalicinal normal e trânsito ureteral livre.

3) Exame de raios-X de coluna cervical e dorsal: escoliose grave, sem defeitos de fusão ou segmentação das vértebras cervicais.

4) Audiometria: perda unilateral da audição de grau moderado/grave à direita. Estudo de emissões otoacústicas: emissões ausentes na orelha direita.

5) Testes moleculares: deleção de 1Mb localizado em Xq21.31 detectado por array-CGH (sonda RP11-192B18), confirmada por *tiling path* para o cromossomo X.

História familiar (heredograma no anexo): Negativa para outros casos de amenorréia primária, defeitos esqueléticos ou auditivos. A mãe (I-1) da paciente apresenta diabetes e dois tios (I-6 e I-7) faleceram de câncer e cardiopatia, respectivamente.

Caso nº 3: paciente portadora de defeito afim a SR

Paciente L.C.B., RG-LGH-USP nº 8891, branca, casada, com 33 anos de idade (DN: 24/04/1971), nascida de parto cesário a termo. Sua mãe e seu pai, não consanguíneos, contavam ambos 36 anos de idade ao nascimento da paciente. Não há menção de exposição a teratógenos durante a gravidez. Telarca e pubarca aos 12 anos. A paciente nega qualquer doença durante a infância e refere dores nas mamas com intervalos mensais. Sem queixas de dores abdominais cíclicas e de coluna. A única intervenção cirúrgica ocorreu aos 19 anos de idade para reconstrução de canal vaginal. Seu desenvolvimento neuropsicomotor e pômbero-estatural são normais. Inteligência, audição e visão são normais.

Exame físico: Altura: 161cm; peso: 55kg; PC: 56cm; DIM: 21cm; DPV: 78cm; DPP: 83cm. Tipo corporal: normolíneo. Crânio e face normais. Pavilhão auricular hipoplásico. Palato alto e arqueado. Pescoço e coluna cervical sem defeitos aparentes, bem como tórax, abdome, coluna e membros superiores e inferiores. Caracteres sexuais secundários bem desenvolvidos. Mamas e pilificação pubiana estágio V de Tanner. Genitália externa normal.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX,inv(9)(p11q13). A região heterocromática invertida no cromossomo 9 da paciente constitui um heteromorfismo cromossômico sem significado clínico (38 metáfases contadas: 28 com coloração de Giemsa, 5 com bandeamento G e 5 com bandeamento C).

2) Ultra-sonografia: agenesia completa de útero com canal vaginal normal, mas terminando em fundo cego.

História familiar (heredograma no anexo): Não há na família nenhum caso semelhante ao apresentado pela paciente. Sua mãe (I-2) teve um neomorto de três dias de vida e sua tia (I-3) teve duas perdas gestacionais espontâneas. Uma prima em primeiro grau (II-7) da paciente é portadora de S. De Down.

Caso nº 4: paciente portadora de SR tipo B

Paciente M.M.D.S.G., RG-LGH-USP nº12452, mulata, casada, de 32 anos de idade (DN:29/09/1967), filha de genitores não consangüíneos, nasceu de parto normal sem intercorrências e sem histórico de exposição a teratógenos durante a gravidez. A paciente nega qualquer doença durante a infância. As queixas apresentadas atualmente são dores intensas de coluna cervical e dispaurenia. Desenvolvimento neuropsicomotor e pôndero-estatural normal.

Exame físico: Altura: 150cm; peso: 87kg; PC: 57cm; DIM: 32cm; DPV: 73cm; DPP: 77cm. Proporções corpóreas conservadas com tipo corporal brevilíneo. Assimetria facial, pescoço curto, palato alto e hiperlordose lombar. Os membros superiores e inferiores são aparentemente normais. Caracteres sexuais secundários bem desenvolvidos. Genitália externa normal.

Mamas e pilificação pubiana estágio V de Tanner. Vagina em fundo cego com 4cm de profundidade. Útero e anexos não palpáveis no toque retal.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: agenesia completa de útero e vagina. Ambos ovários visualizados com topografia normal, com o ovário direito apresentando tamanho aumentado e microcistos (Dir.: 1,7x3,3x3,5cm e Esq.: 6x3,6x5cm). Num segundo exame, 30 dias após o primeiro, constatou-se diminuição do tamanho desse ovário e dos folículos (4,2x4x4cm). A avaliação do sistema urinário mostrou ambos os rins normais (Dir.: 10,1x4x5cm e Esq.: 11x4,7x4,8cm), bexiga e ureteres normais.

3) Exame de raios-X de coluna cervical e dorsal normais.

Historia familiar (heredograma no anexo): Não existem outros casos semelhantes na família da paciente. A irmã da afetada (II-2) teve dois abortamentos espontâneos.

Caso nº5: paciente afetada por SR tipo B

Paciente M.R.M., RG-LGH-USP nº13165, branca, solteira, de 30 anos de idade (DN: 20/10/1973), nascida de parto eutócico a termo sem intercorrências. Os pais, não consangüíneos, contavam respectivamente com 39 e 43 anos de idade por ocasião do seu nascimento. Não existe histórico de exposição a teratógenos durante o período gestacional e de doenças durante a infância. A telarca e pubarca ocorreram aos 13 anos de idade. A paciente foi submetida à reconstrução do canal vaginal e possui genitália externa normal. Desenvolvimento neuropsicomotor e pôndero estatural também normal.

Exame físico: Altura: 152cm; peso: 52kg; PC: 57cm; DIM: 21cm; DPV: 75cm; DPP: 77cm. Proporções corpóreas conservadas e tipo corporal normolíneo. Crânio e face normais. Pescoço aparentemente normal, sem anomalias evidentes de coluna. Tórax, abdome, membros superiores e

inferiores normais. Caracteres sexuais secundários normais. Mamas e pilificação pubiana estágio V de Tanner. Vagina em fundo cego com profundidade de 7cm (pós-cirúrgico). Útero e anexos não palpáveis. As queixas apresentadas atualmente são dores de coluna na região lombar e dispaurenia, esta última provavelmente como consequência do fechamento parcial (estenose) da neovagina, causado por ter abandonado o uso do molde.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: útero rudimentar ligeiramente deslocado para a esquerda. A visualização das tubas uterinas (assimétricas) foi excepcionalmente realizada durante o exame devido à existência de conteúdo líquido (hematosalpinge com calibre máximo de 9cm). O único ovário visualizado (de topografia normal) foi o esquerdo (2,1x4,4x2,2cm). As imagens dos rins mostraram à esquerda um rim tópico normal (11,2x0,44x4,2cm) com ectopia cruzada dos ureteres e á direita um rim pélvico (8,7x3,4x4,3cm).

História familiar (heredograma no anexo): Não há registros em sua família de casos semelhantes com defeitos urogenitais e esquelético, dificuldade para engravidar ou esterilidade.

Caso nº6: paciente portadora de SR tipo B

Paciente M.P.J., RG-LGH-USP nº12963, negra, casada, com 31 anos de idade (DN: 12/05/1973), nascida de parto normal a termo. A mãe relata gravidez agitada com estresse, sem intercorrências ou sem exposição a agentes teratógenos. Desenvolvimento neuro-psico-motor e pôndero-estatural normal. Telarca e pubarca aos 13 anos de idade.

Exame físico: Altura: 160cm; peso: 55kg; PC: 54cm; DIM: 21cm; DPV: 80cm; DPP: 80cm; proporções corpóreas conservadas com tipo corporal normolíneo. Crânio, face e pescoço normais, ausência de anomalias aparentes de coluna, tórax, abdome e membros. Caracteres secundários sexuais

normalmente desenvolvidos. Mamas e pilificação pubiana estágio V de Tanner. Vagina em fundo cego com 7cm de profundidade (uso de molde até a adolescência) e atualmente não apresenta dispaurenia.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: útero rudimentar sólido (2x1x1,5cm), localizado levemente à direita. Só o ovário esquerdo foi visualizado (5x1,5x2cm) com topografia normal e com folículos. A avaliação do aparelho urinário revelou rim (1,36x5x6,6cm) e ureteres de topografia normal à direita e agenesia do rim esquerdo. Afastamento do osso púbico e bexiga com falta de sustentação muscular e colo baixo.

História familiar (heredograma no anexo): Não há na família casos com fenótipo semelhante. Uma das irmãs (II-6) da propósita apresenta esquizofrenia.

Caso nº7: paciente portadora de SR tipo A

Paciente J.S.L, RG-LGH-USP nº14479, branca, separada, de 38 anos de idade (DN: 20/01/1966), nascida de parto normal a termo domiciliar, sem intercorrências. Não há menção de exposição materna a drogas ou outros agentes teratógenos durante o período gestacional. Pubarca e telarca aos 9 e 11 anos, respectivamente. Queixas de dispaurenia e de dores abdominais cíclicas, aproximadamente a cada 35 dias. Desenvolvimento neuropsicomotor e pôndero-estatural normal. Inteligência, audição e visão normais.

Exame físico: Altura: 157cm; peso: 52kg; PC: 55cm; DIM: 23cm; DPV: 78cm; DPP: 79cm. Proporções corpóreas conservadas e tipo corporal normolíneo. Nenhuma anomalias física aparente e caracteres sexuais secundários normais. Mamas e pilificação pubiana estágio V de Tanner. Vagina terminando em fundo cego, com 8cm de profundidade (uso contínuo do molde). Útero e anexos não palpáveis.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: útero rudimentar (4x2,2x3,1cm) com corpo e colo presentes. Trompas e canal vaginal não visualizados. Ovários de topografia normal (Dir.: 2,3x1,6x3cm e Esq.: 4x2x2,3cm). Rins (Dir.: 9,6x4,2x4,7cm e Esq.: 9,9x4,2x3,8cm) e anexos presentes e com contorno normal.

História familiar (heredograma no anexo): Na família da paciente não existe menção a casos semelhantes. A mãe da paciente relata 5 abortamentos espontâneos e duas irmãs da afetada relatam 1 (II-12) e 2 (II-8) perdas gestacionais, respectivamente. Outros achados na família são: déficit auditivo unilateral progressivo, possivelmente causado por exposição a ruído industrial (II-12) e hérnia inguinal (II-3).

Caso nº8: mulher portadora de SR tipo B

Paciente M.S.R.B. (RG-LGH-USP nº12979) foi encaminhada pelo Hospital das Clínicas (RG 2778716-C) para realização de cariótipo. A paciente, branca, separada, com 33 anos de idade (DN: 14/11/1970), nasceu de parto normal a termo e após uma gestação sem intercorrências. Por ocasião do nascimento, sua mãe e seu pai, não consangüíneos, contavam respectivamente com 34 e 41 anos de idade. Telarca e pubarca aos 11 e 12 anos, respectivamente. Não existe menção de exposição materna a drogas, radiação ou a infecções durante o período gestacional. A paciente refere dores abdominais cíclicas com intervalos de cerca de 30 dias. Desenvolvimento neuro-psico-motor, pôndero-estatural, inteligência e visão normal.

Exame físico: Altura: 156cm; peso: 45kg; PC: 55,5cm; DPV: 79cm; DPP: 77cm; com proporções corpóreas conservadas e tipo corporal normolíneo. Palato alto e arqueado. Não foi observada nenhuma outra anomalia física. Caracteres sexuais secundários bem desenvolvidos. Mamas e pilificação pubiana estágio V de Tanner, com genitália externa normal. Útero e anexos

não palpáveis. A paciente apresenta vagina curta (4,5cm) terminando em fundo cego com boa elasticidade, sem queixa de dispaurenia, e prega da mucosa anal hipertrofiada (plioma).

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: útero rudimentar hipoplásico (0,6x2x1,5cm). Trompas, vagina e ovários não visualizados (o esquerdo foi palpado). Rim esquerdo normal (12,6x4,8cm) e agenesia de rim direito.

3) Exame de Exame de raios-X de coluna cervical e dorsal: normais.

História familiar (heredograma no anexo): Nenhum familiar apresenta quadro semelhante ao da paciente. A sua mãe (I-2) teve um abortamento espontâneo.

Caso nº9: paciente afetada por SR tipo B

Paciente M.T.F.C., RG-LGH-USP nº10219, branca, separada, com 34 anos de idade (DN: 11/09/1969) filha de pais não consanguíneos. A paciente nega infecções ou doenças durante a infância. Atualmente refere queixa de déficit auditivo unilateral à direita e infecções urinárias recorrentes. A terapia de reposição hormonal (estrógenos e progesterona) indicada pela amenorréia primária levou à melhora do desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e ao aparecimento da telarca e pubarca aos 17 e 18 anos. Na época foi realizada a reconstrução íntegra do canal vaginal. Desenvolvimento neuro-psico-motor e pôndero-estatural normal. Inteligência e visão normais.

Exame físico: Altura: 160cm; peso: 49kg; PC: 51cm; DIM: 23cm; DPV: 81cm; DPP: 79cm. Tipo corporal: normolíneo. Hirsutismo facial moderado, características faciais virilizadas. Pescoço aparentemente normal, sem defeitos aparentes de coluna cervical. Tórax, abdome, coluna e membros superiores e inferiores normais. Caracteres secundários sexuais pouco

desenvolvidos. Mamas e pilificação pubiana estágios III e IV de Tanner, respectivamente. Vagina em fundo cego (pós-cirúrgico) medindo 4,5cm ao toque digital.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: agenesia total de útero; vagina curta terminando em fundo cego medindo 3,3cm. Ovários não visualizados. Agenesia de rim direito e rim esquerdo tópico de topografia normal medindo 10,2x5,5x5cm.

História familiar e heredograma: Não existem relatos na família de outras pessoas apresentando agenesia útero-vaginal, defeito renal ou virilização como o descrito na paciente. Na sua irmandade uma irmã (II-5) é portadora de útero infantil, mas conseguiu engravidar; outra irmã (II-3) apresenta retardo mental e teve um filho (III-1) com pé equinovaro; um irmão (II-2) é portador de diabetes e uma tia paterna (I-2) faleceu de cardiopatia.

Figura 20: Heredograma da família da paciente 9.

Caso nº10: paciente com SR tipo A

Paciente J.B.S.C., RG-LGH-USP nº8100, foi encaminhada pelo Serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas da FM-USP, aos 23 anos, para estudo cromossômico. Paciente, branca, casada, de 43 anos de idade (DN: 04/05/1961), nascida de parto normal, domiciliar, gemelar, sem intercorrências, após uma gestação de nove meses. Seus pais, primos em primeiro grau, contavam ambos com 31 anos de idade por ocasião de seu nascimento. Não há histórico de exposição materna a drogas, infecções ou radiações durante o período gestacional. A paciente referiu ter procurado um médico pela primeira vez aos 13 anos por causa da ausência de menstruação e de cólicas abdominais cíclicas, mensais, acompanhadas de cefaléia. Aos 15 anos fez tratamento (reposição hormonal). Desenvolvimento neuro-psico-motor e pôndero-estatural normal. Telarca e pubarca aos 13 e 14 anos, respectivamente.

Exame físico: Altura: 152cm; peso: 87kg; PC: 52cm; DIM: 31cm; DPV: 75cm; DPP: 77cm. Proporções corpóreas conservadas e tipo corporal normolíneo. Crânio e face normais, palato alto. Pescoço normal, sem defeitos aparentes de coluna cervical. Tórax, abdome, coluna, membros superiores e inferiores normais. Caracteres sexuais secundários bem desenvolvidos e genitália externa normal. Mamas e pilificação pubiana V estágio de Tanner. A palpação do útero e anexos mostrou-se inconclusiva por causa do excesso de peso da paciente. Vagina terminando em fundo cego com 7cm. de profundidade.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: agenesia completa de útero, vagina curta em fundo cego medindo 5cm. Trompas não visualizadas. Ovários de topografia normal (DIR.: 2,1x4,3x1,8cm e ESQ.: 4,2x1,6x1,6cm). Rins de topografia e contorno normais (DIR.: 9,9x3,4x5,1cm e ESQ.: 10,5x4,4x5cm). A irmã gêmea e

a mãe da paciente realizaram exame ultra-sonográfico, ambas com resultado normal.

3) Dosagens hormonais: FSH, LH, progesterona plasmática e testosterona normais.

4) Urografia excretora: normal

5) Teste molecular de gemelaridade: foram usados 10 marcadores moleculares demonstrando-se que a paciente e sua irmã são gêmeas dizigóticas.

História familiar: não há na família da paciente nenhum caso de amenorréia primária. A mãe da paciente apresenta queixas de dores lombares contínuas e de déficit auditivo unilateral de origem indeterminada. O pai da paciente faleceu de hepatite C e era diabético. Cinco de suas irmãs (IV-2, IV-3, IV-4, IV-6 e IV-7) são casadas, têm filhos e não apresentam história de insucessos reprodutivos. Uma irmã (IV-5) apresenta apêndices pré-auriculares. Uma das gravidezes de sua mãe terminaram em um natimorto (IV-8), de causa indeterminada. Um de seus sobrinhos (V-14), falecido após algumas horas de vida, apresentava defeitos de membros inferiores, lábio leporino e palato fendido (criança filha de pais primos em primeiro e segundo grau, e neta de avós primos em primeiro grau).

Figura 21: Heredograma da família da paciente 10.

Caso nº11: paciente com SR tipo B

Paciente S.S.O.S, Reg LGH-USP nº 16163, mestiça, solteira, de 26 anos de idade (DN: 01/06/1978), nascida de pais não consangüíneos e de parto normal sem intercorrências. Por ocasião do seu nascimento sua mãe e seu pai contavam, respectivamente, com 22 e 25 anos de idade. Não há histórico de exposição materna a drogas, infecções ou radiações durante o período gestacional. Telarca e pubarca aos 11 anos. Desenvolvimento neuropsicomotor e pôndero-estatural normal. Inteligência, visão e audição normais.

Exame físico: Altura: 153cm; peso: 49kg; PC: 57cm; DIM: 22cm; DPV: 84cm; DPP: 69cm. Proporções corpóreas conservadas e tipo corporal normolíneo. Crânio e face normais, palato ligeiramente alto e estreito. Má oclusão dentária. Pescoço, coluna cervical, tórax, abdome, coluna, membros superiores e inferiores normais. Caracteres sexuais secundários bem desenvolvidos e genitália externa normal. Mamas e pilificação pubiana estágio V de Tanner. Não foi realizado o exame de palpação de útero e anexos pelo fato de a paciente ser ainda virgem. Vagina terminando em fundo cego (sic).

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: Estrutura sólida paraovariana à esquerda, que poderia representar um útero unicórnio rudimentar, medindo 3,0x1,2x1,3cm, no quadrante esquerdo. Vagina muito curta (2,5cm) terminando em fundo cego. Ovários de topografia normal (DIR.: 3,9x1,6x2,6cm; ESQ.: 3,7x2x2,2cm) com folículos. Os rins, pélvicos, apresentaram topografia e contorno normal. Rim direito (9,7x4,6x4cm) localizado no fossa ilíaca direita e esquerdo (8,2x4,4x4,5cm) no hipogástrio para-umbilical à esquerda. Bexiga de morfologia, contorno e repleção normal. A ultra-sonografia da irmã gêmea, que tem dois filhos, foi normal: útero (82x42x51mm), vagina (4cm em repouso), ovários (dir. 47x16x38cm; esq. 44x36x26cm), rins (dir. 96x38x53cm; esq. 95x48x57cm)

3) Densitometria óssea: densidade mineral óssea diminuída (osteopenia) na coluna lombar (L1-L4) e no colo de fêmur.

História familiar (heredograma no anexo): não há na família nenhum outro caso semelhante. O pai da paciente (III-10) tem defeitos de curvatura de coluna (sic). Há dois casos de abortamento espontâneo (II-4 e II-8). Um dos irmãos da paciente tem epilepsia (III-19) e outro nasceu com hérnia inguinal (III-18).

Caso nº 12: paciente com SR tipo B

Paciente A.M.S, Reg LGH-USP nº 13638, negra, casada, de 36 anos de idade (DN: 20/12/1967), nascida de parto normal, domiciliar, a termo sem intercorrências. Não há histórico de exposição materna a drogas, infecções ou radiações durante o período gestacional. Por ocasião do seu nascimento sua mãe e seu pai (não consangüíneos) contavam, respectivamente, com 22 e 24 anos de idade. Telarca e pubarca aos 11 anos. Devido à ausência de menarca, aos 16 anos submeteu-se a exame ultra-sonográfico, que revelou ausência de útero e ovários. Desenvolvimento neuropsico-motor e pôndero-estatural normal. Inteligência, visão e audição normais.

Exame físico: Altura: 162cm; peso: 54kg; PC: 57cm; DIM: 20,5cm; DPV: 84cm; DPP: 78cm. Proporções corpóreas conservadas e tipo corporal longilíneo. Crânio e face normais, palato alto e arqueado. Má oclusão dentária. Pescoço normal, sem defeitos aparentes de coluna cervical. Caracteres sexuais secundários bem desenvolvidos e genitália externa normal. Mamas e pilificação pubiana estágio V de Tanner. Útero e anexos não palpáveis. A paciente apresenta vagina curta terminando em fundo cego com profundidade de 6cm. e tem queixas de dispaurenia e de cólicas abdominais cíclicas intensas cada 28-30 dias.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: agenesia completa de útero e vagina atrésica. Ovário direito não visualizado e o esquerdo com topografia normal (3,2x2x2,6cm). A avaliação do sistema urinário mostrou o rim direito ectópico e localizado à esquerda fundido pelo pólo superior direito ao pólo inferior esquerdo do outro rim também pélvico (14,5x4,7x4cm). Bexiga e ureteres normais.

3) Exame de Exame de raios-X de coluna cervical e dorsal: normais.

História familiar (heredograma no anexo): Não existem outros casos semelhantes na família da paciente. Todas as irmãs (III-1 a III-6) menstruaram normalmente e sem dificuldade para engravidar. O único registro de doença é dos avós maternos (I-1 e I-2) que sofrem de diabetes.

Caso nº 13: paciente portadora de defeito mülleriano isolado

Paciente M.Z.L.B.M., RG-LGH-USP nº13376, branca, casada, de 34 anos de idade (DN:17/02/1970), não consanguínea, nascida de parto normal sem intercorrências e sem histórico de exposição materna a teratógenos durante a gravidez. Pubarca e telarca aos 12 e 11 anos. A paciente nega infecções, cirurgias ou qualquer doença durante a infância. Durante a adolescência submeteu-se a terapia de reposição hormonal com estrógenos e progesterona, indicada por causa da amenorréia primária, sem obter resultados. A única queixa apresentada é a dispaurenia. Desenvolvimento neuro-psico motor e pôndero-estatural normal.

Exame físico: Altura: 150cm; peso: 44kg; PC: 54cm; DIM: 21cm; DPV: 75cm; DPP: 75cm. Proporções corpóreas conservadas e tipo corporal normolíneo. Nenhum defeito físico é observado. Caracteres sexuais secundários bem desenvolvidos e genitália externa normal. Mamas e pilificação pubiana estágio V de Tanner. Vagina em fundo cego com 7,5cm de profundidade. Útero e anexos não palpáveis ao toque retal.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: a paciente apresenta vagina normal terminando em fundo cego com 7,7cm, útero hipoplásico e rudimentar (3,5x1,5x2cm). Ambos os ovários com topografia normal (Dir.: 1,9x1,2x1,5cm e Esq.: 2,5x1,5x1,9cm). A avaliação do sistema urinário mostrou ambos os rins (Dir.: 9,5x3,7x4,4cm e Esq.: 10,8x4,5x4,4cm), bexiga e ureteres normais.

3) Exame de Exame de raios-X de coluna cervical e dorsal: normais.

História familiar (heredograma no anexo): Na família da paciente duas tias relatam dificuldade em engravidar (III-4 e III-6) e uma irmã (III-4) teve uma perda gestacional durante o primeiro trimestre de gravidez. Outra tia (II-9) apresenta deficiência auditiva bilateral progressiva de causa indeterminada. Uma quarta tia (II-10) submeteu-se a histerectomia devido a uma endometriose. Os avôs paternos (I-2 e I-3) faleceram, respectivamente, de trombose e problemas cardíacos.

Caso nº14: paciente portadora de SR tipo A

A paciente R.C.S., Reg LGH-USP nº 16984, mestiça, de 43 anos de idade (DN: 17/08/1961), não consanguínea, nascida de parto normal sem intercorrências. Foi admitida pela primeira vez no Hospital das Clínicas de FM-USP aos 20 anos de idade por causa de amenorréia primária. Por ocasião da consulta foram realizados exames de dosagem hormonais e parasitológicos (positivo para *Entamoeba coli*). Seu desenvolvimento neuropsico-motor e pôndero-estatural são normais. Inteligência, visão e audição são normais.

Exame físico: Altura: 159cm; peso: 45kg. Proporções corpóreas conservadas e tipo corporal normolíneo. Crânio, face e pescoço aparentemente normais, sem defeitos aparentes de coluna cervical. Tórax, abdome, coluna, membros superiores e inferiores normais. Caracteres sexuais secundários bem desenvolvidos.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Dosagem hormonal: LH: 9,2mUI/ml, FSH: superior a 200mUI/ml, prolactina: 27mUI/ml, T4 plasmática: 8,2mcg/100ml. Segunda dosagem de FSH: 4,4mUI/ml.

3) Parasitológico: positivo para *Entamoeba coli*.

4) Exame pneumopelvigráfico: sem evidências de imagem de útero nem brotos ovarianos.

História familiar (heredograma no anexo): não existem relatos de casos na família da paciente de pessoas com fenótipo semelhante.

Caso nº15: mulher afetada por SR tipo B

Paciente K.P.A, RG-LGH-USP nº16982, branca, solteira, de 16 anos de idade (DN: 01/03/1988), não consanguínea, nascida de parto cesário a termo sem intercorrências, pesando 2270g. Não existe nenhum histórico de exposição materna a drogas ou outros agentes teratógenos durante o período gestacional. Ao nascimento a paciente apresentou, pé valgo bilateral e icterícia. À ressonância magnética foram detectadas lesões da substância branca profunda, as quais provavelmente foram causadas por febre e graves problemas de incompatibilidade RH que indicaram transfusões de sangue no quinto dia de vida. Disfunção vesical neurogênica. A paciente sentou sem apoio com 1 ano e andou com 1 ano e 4 meses.

Exame físico: Altura: 159cm; peso: 48kg; PC: 54cm. Proporções corpóreas conservadas. Dismorfismo crânio facial: face alargada, nariz proeminente com base retangular, filtro nasal curto e palato alto. Membros alongados e mãos delicadas, pescoço aparentemente normal, com escoliose dorso/lombar. Ectasia discreta de arco aórtico. Retardo mental leve e dificuldades de aprendizado de nível leve a moderado. Hipotireoidismo causado por tireoidite de Hashimoto (problema presente também na irmã) e miopia de 6 graus. Audição normal e caracteres sexuais secundários normais. Mamas e pilificação pubiana estágio V de Tanner. A paciente apresenta quadro clínico compatível com o fenótipo de deleções 22q11 (síndrome Velo-cardio-facial/DiGeorge) associado ao fenótipo da síndrome de Rokitansky.

Exames realizados:

- 1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).
- 2) Ressonância magnética: lesões da substância branca profunda.
- 3) Ultra-sonografia: agenesia do canal vaginal, útero em fita, agenesia de rim direito e ovários não visualizados.
- 4) Exame de raios-X de coluna: escoliose dorso/lombar.
- 5) Testes moleculares: Deleção de ~2.5Mb em 22q11.21 detectada por array-CGH (sonda XX-91C); confirmada por FISH e mapeada por microsatélites (D22S1638, D22S1648, D22S944, D22S1623, D22S1709) e MLPA (SALSA P023 DiGeorge kit). Não foi possível testar o pai, mas os resultados dos marcadores polimórficos testados na mãe confirmaram que os alelos normais restantes na pacientes não eram compartilhados, indicando que a deleção era *de novo* e de herança materna.

História familiar e heredograma (ver Anexos): Não há na família da paciente outros casos semelhantes apresentando ausência congênita de útero e vagina, dificuldade escolar ou o fenótipo típico de deleções 22q11. A única irmã (III-1) menstrua normalmente e é portadora de hipotireoidismo (tireoidite auto-imune de Hashimoto) e cistos ovarianos. O exame ultra-sonográfico foi normal. A mãe relata que a face da paciente lembra muito a da avó paterna (I-2).

Caso nº 16: paciente com SR tipo B

Paciente A.C.S., RG-LGH-USP nº16983, negra, de 3 anos de idade (DN: 22/02/2001), não consanguínea, nascida de parto normal eutócico a termo sem histórico de exposição materna a drogas, radiação ou infecções durante a gravidez. Ao nascimento apresentou fusão de lábios genitais e sindactilia parcial do 2^{do} e 3^{ro} dígito do pé. Andou sem apoio com 10 meses e a mãe refere que durante a infância as doenças foram: infecções pulmonares

(bronquite e pneumonia) e amigdalite. Desenvolvimento neuropsicomotor e pondo-estatural normal. Inteligência, visão e audição normais.

Exame físico: Com 1 ano e 11 meses de idade: altura: 87cm; peso: 10kg; PC: 48,5cm. Tipo corporal: normolíneo. Crânio, face e pescoço aparentemente normais, sem defeitos aparentes de coluna cervical. Tórax, abdome, membros superiores normais.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ressonância magnética da pelve: agenesia completa de útero com atresia de canal vaginal. Ovários não visualizados.

3) Testes moleculares: duas duplicações localizadas no cromossomo 1 em q21.1 (~3.5Mb) e em 22q11.22 (~1Mb) detectadas por array-CGH (sondas RP11-315I20 e RP11-301M17 para o cr.1 e RP11-179H3 para o cr.22) e confirmadas por FISH. Ambas as alterações foram herdadas da mãe fenotipicamente normal. O pai, a irmã e a avó materna foram testados com resultado normal.

História familiar (heredograma no anexo): Não há na família da afetada nenhum outro caso semelhante de malformação congênita da genitália externa ou ausência de útero e canal vaginal. Ambos os avôs, paterno (I-3) e materno (I-1), faleceram, respectivamente de câncer e diabetes.

Caso nº 17: paciente com SR tipo B

Paciente R.N.B., RG-LGH-USP nº15205, mestiça, solteira, com 21 anos de idade (DN: 19/09/1983), nasceu de pais não consanguíneos a termo. Ao nascimento apresentou: comunicação inter-ventricular (CIV), ectasia da raiz da aorta e luxação congênita de quadril. Foi operada no Instituto da Criança da FM-USP com 1 ano e 8 meses. Posteriormente realizou uma segunda intervenção cirúrgica para corrigir a ectasia de raiz da aorta. A paciente apresenta quadro pulmonar misto restritivo e obstrutivo grave e amenorréia primária.

Exame físico: Assimetria facial, deficiência de implantação dentária, úvula bífida, agenesia de polegar à direita, polegar com aspecto trifalângico (hipoplasia tenar e hipotenar) e sem oponência à esquerda, encurtamento bilateral do 4º e 5º artelhos, cifoescoliose e defeito de Klippel-Feil. Caracteres sexuais secundários normais. Mamas e pilificação pubiana estágio IV de Tanner.

Exames realizados:

- 1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).
- 2) Ultra-sonografia: agenesia completa de útero e vagina, agenesia renal unilateral à esquerda.
- 3) Exame de raios-X: perda óssea alveolar horizontal em maxila e mandíbula, cifoescoliose dorsal sigmóidea, hiperlordose lombar, anomalias vertebrais (hemivértebra cérvico-dorsal), defeito de Klippel-Feil (fusão C5-C6).
- 4) Uropielografia excretora: agenesia de rim esquerdo.

História familiar (heredograma no anexo): Não há na família da paciente, relatos de outros casos com defeito urogenital ou sequer fenótipo semelhante. A mãe relata que sua terceira gestação (II-3) terminou em óbito fetal de 8 meses de gestação sem malformações e a gestação seguinte resultou em aborto espontâneo dois meses de gestação.

Caso nº18: paciente portadora de SR tipo A

Paciente J.S.C., RG-LGH-USP nº16516, branca, solteira, de 19 anos de idade (DN: 09/03/1985), nascida de parto cesáreo, sem intercorrências, após uma gestação de nove meses. Seu pai e sua mãe, não consangüíneos, contavam, respectivamente com 30 e 55 anos de idade por ocasião de seu nascimento. A mãe relata ter sido medicada por causa de pressão baixa durante a gravidez. Não há histórico de infecções ou exposição materna a radiações durante o período gestacional. Telarca e pubarca aos 13 anos. A paciente procurou atenção médica por amenorréia primária e dores abdominais na adolescência.

Recentemente, a presença de endométrio funcionante dentro da trompa de Fallopio (hematosalpinge) originou um quadro hemorrágico que indicaram uma histerectomia geral. Atualmente não possui nenhuma queixa e está sendo acompanhada psicologicamente. Desenvolvimento neuropsico-motor e pôndero-estatural normal.

Exame físico: Altura: 163cm; peso: 67kg; PC: 54cm; DIM: 21cm; DPV: 81cm; DPP: 82cm. Proporções corpóreas conservadas e tipo corporal normolíneo, com crânio e face normais. Pescoço aparentemente normal, sem defeitos aparentes de coluna cervical. Tórax, abdome, coluna, membros superiores e inferiores normais. Caracteres sexuais secundários bem desenvolvidos e genitália externa normal. Mamas e pilificação pubiana estágio de V Tanner. Útero e anexos não palpáveis. A paciente usa molde há dois anos. O exame especular não foi feito porque a paciente não teve ainda relações sexuais. Vagina terminando em fundo cego com 6cm. de profundidade.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G). Cariótipo na meia irmã (IV-3): 45,X/46,XX

2) Ultra-sonografia: agenesia completa de útero, vagina curta em fundo cego. Visualização de duas massas para-ovarianas (DIR.: 2,3x1,2x1,7cm e ESQ.: 3,2x1,5x1,5) que poderiam corresponder a hematosalpinge. Ovários visualizados, sendo que o direito é policístico (DIR.: 3,6x3x1,7cm e ESQ.: 2,8x2,4x3,2cm). Rins de topografia e contorno normais (DIR.: 11x4,1x5,8cm e ESQ.: 10,7x4,9x4,5cm). A meia irmã da paciente (IV-3) e sua filha (V-2) foram encaminhadas para realizar exame ultra-sonográfico devido à amenorréia secundária e seis abortos, respectivamente. Meia irmã: útero (7,5x4,8x3,6cm), ovários (DIR.: 1,6x1,0x1,8cm; ESQ.: 2,1x1,3x1,4cm) e rins (DIR.: 9,5x4,3x4,2cm; ESQ.: 10,2x4,3x4,4cm) normais. Sobrinha: útero (7,6x2,7x4,6cm); ovários (DIR.: 4,3x1,6x2,3cm; ESQ.: 4,2x2,4x2,1cm) e rins (DIR.: 9,3x3,8x3,8; ESQ.: 10,1x3,7x4,1cm) normais.

3) Exame de Exame de raios-X de coluna cervical e dorsal: normais.

História familiar (heredograma no anexo): não há na família da paciente nenhum outro caso semelhante, apresentando ausência de útero e vagina. Existe uma meia irmã (IV-3), filha de um casamento anterior (consanguíneo) do pai, que apresenta cistos ovarianos e teve seis abortamentos espontâneos. Nela foi identificada uma linhagem celular 45,X e outra 46,XX. Sua filha (V-2) tem amenorréia secundária de causa indeterminada. O pai (III-2) da propósita e o outro filho da meia irmã (V-1) nasceram com hérnia inguinal. A avó paterna e mais dois outros avôs têm diabetes.

Caso nº19: mulher afetada por SR tipo B

Paciente Z.R.O, RG-LGH-USP nº8575, foi encaminhada pelo Serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas da FM-USP para estudo genético. A paciente, de 45 anos de idade (DN: 10/05/1959), mulata clara, solteira, nasceu de parto normal, domiciliar. Sua mãe e seu pai, não consanguíneos, contavam, respectivamente, com 18 e 27 anos de idade, por ocasião de seu nascimento. A mãe refere amenorréia secundária antes de engravidar, não tendo certeza de que a gestação foi a termo. Ao nascimento, após quatro dias de trabalho de parto, a propósita não chorou espontaneamente e estava cianótica (sic: roxa). Com um ano de idade apresentou crises convulsivas e fez uso de anticonvulsivantes até os 14 anos. O último episódio aconteceu há 4 anos. Telarca e pubarca aos 8 anos. Notou-se acentuada assimetria no desenvolvimento mamário durante mais de um ano. Aos 14 anos procurou atenção médica por causa da amenorréia e deu início a medicação hormonal substitutiva. Aos 20 anos recebeu o diagnóstico de agenesia uterina. A única cirurgia que realizou foi uma adenoidectomia. A paciente apresenta retardo mental leve a moderado.

Exame físico: Altura: 160cm; peso: 47kg; PC: 55cm; DIM: 20cm; DPV: 77cm; DPP: 83cm. Proporções corpóreas conservadas e tipo corporal normolíneo. Discreta assimetria facial, nistagmo horizontal, com ligeiro desvio de septo nasal e mandíbula para a direita, má oclusão dentária com palato alto e arqueado. Pescoço aparentemente normal sem anomalias

aparentes de coluna. Tórax e abdome normais. Membros superiores e inferiores longos, com mãos e pés grandes e delgados e unhas com onicodistrofia. O dedo anular da mão direita ficou rígido após um dos vários episódios epilépticos.

Caracteres sexuais secundários desenvolvidos com mamas e pilificação pubiana estágio III de Tanner. Ausência completa de útero e canal vaginal.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: agenesia de útero e canal vaginal curto terminando em fundo cego. Ambos ovários não visualizados. Rins normais.

3) Exame de raios-X de coluna: normal.

4) Pneumopelvigrafia: agenesia de útero com ovários normais.

5) Urografia excretora: normal.

6) Testes moleculares: deleção de novo de 1.1 a 3.1Mb localizada em 17q12 detectada por array-CGH (sondas RP11-445F12 e RP11-115K3). A mãe foi testada com resultado normal.

História familiar (heredograma no anexo): Não há na família da paciente casos semelhantes apresentando ausência congênita de útero e vagina, como também não existem referências de pessoas portadoras de defeitos renais ou esqueléticos. Num segundo casamento, a mãe da paciente (II-11) relata dois abortamentos espontâneos no primeiro trimestre de gestação. Três tios da pacientes morreram de infarto de miocárdio. O casal III-1 e III-2 são primos em primeiro grau e tem três filhos normais. A avó da paciente (I-2) tem diabetes. Um tio (II-6) apresentou um único episódio epiléptico. O filho de II-4 nasceu com polidactilia.

Caso nº20: paciente afetada por SR tipo B

Paciente A.P.F.E., RG-LGH-USP nº16930, branca, casada, com 24 anos de idade (DN: 10/06/1980), nasceu de pais não consangüíneos a termo. Logo após

do parto foi constatado que apresentava luxação congênita de quadril e hérnia inguinal. Desenvolvimento neuro-psico-motor e pôn timero-estatural normal. Telarca e pubarca aos 12 e 10 anos de idade.

Exame físico: Altura: 163cm; peso: 70kg; PC: 58cm; DIM: 24cm; DPV: 77cm; DPP: 86cm. Proporções corpóreas conservadas com tipo corporal normolíneo. Crânio e face normais, palato alto, pescoço aparentemente normal, ausência de anomalias aparentes de coluna, tórax, abdome e membros. Caracteres secundários sexuais normalmente desenvolvidos. Mamas e pilificação pubiana estágio V de Tanner. Vagina em fundo cego com 10cm. de profundidade (pós-cirúrgico). A paciente apresenta dor abdominal cíclica com intervalos de 20 dias. O único relato de intervenção cirúrgica é de reconstrução de canal vaginal durante a adolescência, que foi mantida com o uso de molde. Atualmente tem relações sexuais sem queixas.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G)

2) Ultra-sonografia: agenesia completa de útero com neovagina terminando em fundo cego com 10cm. de profundidade. O ovário direito presente e localizado, ectopicamente, fora da fossa ilíaca; ovário esquerdo não localizado. A avaliação do aparelho urinário revelou ptose renal bilateral, com falha bilateral da rotação. Ambos os rins se encontram afastados a mais de 5 cm do diafragma (ectópicos), sendo que o rim direito (9,3x5,7x4,3cm) possui uma divisão que poderia constituir um septo ou um lóbulo, com duplicação pielocalicial. O rim esquerdo mede 9,6x4,2x3,5cm. Ambos os rins têm perda de diferenciação córtico-medular. A prima irmã da paciente (II-5) realizou também exame ultra-sonográfico, constatando-se que não possui nenhum defeito urogenital.

3) Exame de raios-X de coluna cervical e dorsal: normais.

4) Testes moleculares: duplicação polimórfica em 16q22 detectada por array-CGH.

História familiar (heredograma no anexo): Não há na família da paciente outros casos com fenótipo semelhante, apresentando ausência de canal útero-vaginal, defeito renal e defeito articular. Outras duas pessoas da família (II-5) e (III-1) apresentam o mesmo defeito congênito de hérnia inguinal.

Caso nº21: paciente com SR tipo B

Paciente M.M.C.V.R., RG-LGH-USP nº16931, branca, casada, de 39 anos de idade (DN: 29/05/1964), nascida de parto normal, sem intercorrências, de pais não consanguíneos. Não existe histórico de exposição materna a drogas ou qualquer teratógeno durante o período gestacional ou infecções durante a infância. Telarca e pubarca aos 12 anos de idade. A paciente se submeteu às cirurgias de reconstrução do canal vaginal e de extirpação de ovário policístico (esquerdo). Genitália externa, e desenvolvimento neuropsicomotor e pôn timer estatutal normal.

Exame físico: Altura: 155cm; peso: 55kg; PC: 53cm; DIM: 23cm; DPV: 72cm; DPP: 83cm. Proporções corpóreas conservadas e tipo corporal normolíneo. Crânio e face normais, palato alto e arqueado e má oclusão dentária corrigida com aparelhos. Pescoço aparentemente normal com implantação baixa do cabelo na nuca. Tórax, abdome, membros superiores e inferiores normais. Hiperlordose lombar. Queixa de dor abdominal cíclica cada 90 dias. Caracteres sexuais secundários normais. Mamas e pilificação pubiana estágio V de Tanner. Vagina em fundo cego com profundidade de 4cm. (pós-cirúrgico). Útero e anexos não palpáveis.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: útero rudimentar sólido medindo 1x2,4x2,1cm. Ovário único á direita de topografia normal medindo 3,6x2,6x2,3cm (o esquerdo, policístico, foi extirpado aos 18 anos de idade). Rins tópicos e anexos normais (DIR.: 9,9x3,5x5,4cm e ESQ.: 9,9x4,9x2,5cm). Uma massa que

poderia corresponder uma trompa dilatada foi visualizada medindo 4,7x3,3x2,2cm (hematosalpinge?)

3) Exame de raios-X de coluna cervical e dorsal: normais.

História familiar (heredograma no anexo): Não existem casos semelhantes na família da propósita. Três pessoas (I-1, I-2 e II-1) faleceram a causa de defeitos cardíacos. Uma tia da paciente (II-1), já falecida, teve um rim extirpado (sic) devido a um defeito congênito que a paciente não consegue lembrar. O avô (I-1) nasceu com hérnia inguinal e sofre de perda gradual bilateral da audição. A mãe (II-3) e a irmã (III-2) da propósita sofreram abortamentos espontâneos durante o primeiro trimestre de gravidez.

Caso nº22: paciente portadora de SR tipo B

Paciente F.C., RG-LGH-USP nº8419, foi encaminhada pelo serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas da FM-USP, aos 14 anos, com suspeita diagnóstica de síndrome de Rokitansky, para estudo genético. A paciente, branca, casada, nasceu de parto normal, hospitalar, após uma gestação de 7 meses e refere que, na ocasião de seu nascimento, foram notados apêndices pré-auriculares nas orelhas. Sua mãe e seu pai, não consanguíneos, contavam, respectivamente, com 39 e 40 anos de idade na ocasião do nascimento. Não há histórico de exposição materna a drogas, radiações ou infecções durante o período gestacional. Telarca e pubarca aos 10 anos. A paciente com amenorréia primária, procurou atenção médica aos 14 anos por fortes dores abdominais em cólicas, mensais, com duração de 2 a 3 dias. Na ocasião foi diagnosticada ausência de útero e vagina. Posteriormente fez cirurgia de reconstrução do canal vaginal. A paciente apresenta queixa de dores de coluna. Desenvolvimento pôndero-estatural e neuropsicomotor normal.

Exame físico: Altura: 155cm; peso: 96kg; PC: 57cm; DIM: 31cm; DPV: 77cm; DPP: 77cm. Proporções corpóreas conservadas e tipo corporal brevilíneo. Apresenta apêndices pré-auriculares: dois do lado esquerdo e um do lado direito da face. Pescoço ligeiramente curto com assimetria das

clavículas. Dor a palpação das escápulas, coluna cervical e torácica. Abdome normal. Clinodactilia do 5º dedo da mão direita e tamanho maior do pé esquerdo (cerca de 2 cm). Útero e anexos não palpáveis, presença de cisto de Bertolim e óstio vaginal com 1cm de profundidade, neovagina prolapsada a causa da obesidade. Caracteres sexuais secundários normais. Mamas e pilificação pubiana estágio V de Tanner.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: agenesia total de útero. Neovagina (prolapsada) medindo 4cm de profundidade. Ovário único á direita (2,2x1,4x1,7cm) de topografia normal com visualização de folículos. Rins em ferradura unidos pelos pólos inferiores sem cálculos ou hidronefrose. A mãe (I-2) é portadora do mesmo defeito de rins em ferradura que a propósita, no entanto todas as irmãs examinadas (II-2, II-6, II-7 e II-9) apresentaram útero e rins normais.

3) Urografia excretora: rins apresentando boa eliminação de contraste e má rotação de seus eixos longitudinais, com aproximação dos pólos inferiores. Bexiga normal.

4) Exame de raios-X de coluna cervical e dorsal: normais.

5) Testes moleculares: além da propósita, foram coletadas amostras de DNA de: II-3, II-6, II-7, II-9, III-7, III-10

História familiar (heredograma no anexo): Não há na família da pacientes outros casos de amenorréia primária. Sua mãe (I-2), já falecida de infarto de miocárdio, era portadora de desvio de coluna e rins em ferradura. Dois de seus irmãos (II-1 e II-5) faleceram na infância, de causa desconhecida. Todas as irmãs já tiveram filhos. Uma das gestações de III-9 foi ectópica pelo que foi realizada a extirpação da trompa. II-8 se encontra em tratamento psicológico por desvio de personalidade e agressividade. Uma sobrinha (III-7) nasceu com hérnia inguinal bilateral, posteriormente corrigida.

Caso nº 23: paciente com SR tipo B

Paciente P.C.S., RG-LGH-USP nº16860, foi encaminhada pelo serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas da FM-USP, por amenorréia primária, para estudo genético. A paciente, de 25 anos de idade (DN: 23/02/1979) nasceu de parto cesáreo com fórceps, de pais não consangüíneos. A mãe relata repouso absoluto por ameaça de aborto prematuro desde o segundo trimestre e nega medicação. Não há menção de exposição materna a drogas, radiações ou infecções durante o período gestacional. Aos 20 anos recebeu o diagnóstico de agenesia de útero e canal vaginal. O único relato de intervenção médica refere à realização de cateterização para litotripsia com anestesia geral.

Exame físico: Peso: 52kg; altura: 166cm; Proporções corpóreas conservadas e tipo corporal brevilíneo. Mamas estágio III de Tanner. Caracteres sexuais secundários pouco desenvolvidos e fenótipo virilizado. Útero e anexos não palpáveis. Profundidade de canal vaginal: 4cm (usa molde) intróito vaginal estreito e orifício ureteral isolado.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de coloração Giemsa e bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: agenesia total de útero, canal vaginal, ovários e de rim esquerdo com presença de nefrocistíase e cálculos no rim direito. Imagem sugestiva de próstata (2,2x2,6x2,5cm). Vesícula seminal não visualizada.

3) Dosagens hormonais: T3T: 144,4 mcg/100ml, T4T: 11,4 mUI/ml, FSH: 5,2 mUI/ml, LH: 3,5 mUI/ml, prolactina: 7,2 mUI/ml.

Caso nº 24: paciente afetada por SR tipo A

Paciente Q.M.L.S., RG-LGH-USP nº16859, de 36 anos de idade (DN: 20/08/1967), é filha de pais não consangüíneos. Foi atendida no serviço de Ginecologia do Hospital de Mairiporã, onde, após o diagnóstico de útero e ovários rudimentares, realizou cirurgia de abertura de canal vaginal. Atualmente é paciente do serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas da FM-USP.

Exame físico: Peso: 43kg. Proporções corpóreas conservadas e tipo corporal normolíneo. Mamas estágio V de Tanner, sem nódulos, sem galactorréia e sem dor. Caracteres sexuais secundários normais. Útero e anexos não palpáveis. A profundidade vaginal (pós-cirúrgica) é de 10cm. O canal é fibroso e de escassa elasticidade.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: Útero e ovários rudimentares, sem defeitos no sistema urinário.

3) Dosagens hormonais: FSH: 4,2 UI/L, LH: 4,7UI/L, E2: 50,1ng/ml, progesterona: 4,4 ng/ml.

Caso nº 25: paciente com SR tipo A

Paciente S.D.S., RG-LGH-USP nº12928, branca e solteira de 32 anos de idade (DN: 14/08/1972) foi encaminhada pelo serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas da FM-USP por amenorréia primária, para a realização de estudo genético. Não há menção de exposição materna a drogas, radiações ou teratógenos durante o período gestacional. Pubarca e telarca aos 12 anos de idade. A paciente foi diagnosticada com agenesia de útero e vagina curta terminando em fundo cego orientada a usar molde durante a adolescência.

Exame físico: Altura: 162cm; peso: 70kg; PC: 57cm; DIM: 25cm; DPV: 76cm; DPP: 86cm. Crânio e face normais, pescoço de aparência normal, ausência de anomalias aparentes de coluna, tórax, abdome e membros. Proporções corpóreas conservadas e tipo corporal normolíneo. Mamas e pilificação estágio V de Tanner. Caracteres sexuais secundários bem desenvolvidos. Útero e anexos não palpáveis, com 4cm de profundidade vaginal.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: agenesia total de útero com vagina curta em fundo cego. Não há defeitos no sistema urinário.

Caso nº 26: paciente com SR tipo B

Paciente M.A.S., RG-LGH-USP nº17729, de 26 anos de idade (DN: 14/02/1980), foi encaminhada pelo serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas da FM-USP por amenorréia primária e útero infantil, para a realização de estudo genético. A mãe refere ter sido diagnosticada com diabetes tipo II durante o terceiro mês de gestação. O parto foi pré-termo (cesariano) no oitavo mês gestacional. A paciente foi diagnosticada com útero rudimentar e vagina curta terminando em fundo cego e durante a adolescência fez correção de canal vaginal.

Exame físico: Crânio e face normais, sem defeitos físicos aparentes. Mamas e pilificação estágio V de Tanner. Caracteres sexuais secundários bem desenvolvidos.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: útero infantil e vagina curta (pós-cirúrgica) terminando em fundo cego. Agenesia de rim esquerdo e ovário esquerdo atrofiado.

História familiar (heredograma no anexo): Não existe na família da afetada nenhum outro caso semelhante. Uma avó materna (I-1) e um avô paterno (I-3) faleceram de cardiopatia e diabetes, respectivamente.

Caso nº 27: paciente com SR tipo A

Paciente Y.W.P.D.S, RG-LGH-USP nº17679, de 7 anos de idade (DN: 12/02/1999), filha de pais não consanguíneos e nascida de parto normal eutócico pré-termo, com 8 meses de gestação. Com cinco anos de idade foi detectada sinéquia de pequenos lábios. Inteligência normal.

Exame físico: Tipo corporal: normolíneo. Crânio, face e pescoço aparentemente normais, sem defeitos aparentes de coluna cervical.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ressonância magnética da pelve: agenesia completa de útero e vagina, com ovários não caracterizados.

3) Exame de raios-X de coluna cervical e dorsal: normais

História familiar (heredograma no anexo): Não há na família da afetada nenhum outro caso semelhante de malformação congênita da genitália externa ou ausência de útero e canal vaginal.

Caso nº 28: paciente com defeito mülleriano afim á SR

Paciente E.S.D.S., RG-LGH-USP nº16850-E, negra, casada, de 53 anos de idade (DN: 18/03/1951), sem histórico de exposição materna a teratógenos durante a gravidez. Não há nenhuma menção a infecções ou qualquer doença durante a infância. Durante a adolescência a menarca ocorreu em idade normal, mas irregularmente. Desenvolvimento neuro-psico-motor e pôndero-estatural normal.

Exame físico: Altura: 152cm; peso: 55kg; PC: 57cm; DIM: 23cm; DPV: 75cm; DPP: 77cm. Proporções corpóreas conservadas e tipo corporal normolíneo. Nenhum defeito físico é observado. Caracteres sexuais secundários bem desenvolvidos e genitália externa normal. Mamas e pilificação pubiana estágio IV de Tanner. Vagina normal com 8cm. de profundidade (em repouso). Útero hipoplásico em anteversão. Anexos palpáveis no toque retal. A última menstruação ocorreu faz três anos.

Exames realizados:

1) Cariótipo: 46,XX, normal para o sexo feminino (técnica de bandeamento G).

2) Ultra-sonografia: a paciente apresenta vagina normal com 7,7cm de profundidade, útero hipoplásico (6,5x3,1x3,5cm) em ante versão, ambos ovários com topografia normal (Dir.: 2,1x0,7x1,9cm e Esq.: 1,7x0,9x1,9cm). A avaliação do sistema urinário mostrou agenesia de rim direito. O rim esquerdo mede 12,5x7,4x7,2cm e apresenta seis cistos corticais no terço superior, com crescimento em direção à pelve (o cisto maior mede 3,5x4x4cm).

3) Exame de raios-X de coluna cervical e dorsal: coluna cervical apresentando hérnia de disco (a paciente usa colete) e coluna dorsal com duas osteofitoses.

4) Testes moleculares: o array-CGH detectou uma duplicação de 0.2 até 1MB localizado em 17q21.31 (sonda RP5-843B). A triagem no filho detectou a mesma duplicação em 17q21.31 e uma deleção de novo de 0.1 a 1.2Mb em 22q11.22 (sonda RP11-50123).

História familiar (heredograma no anexo): A paciente é mãe de dois filhos. A filha tem 32 anos de idade e, tanto ela como a sua progênie, são normais.

O filho (F.S.D.S.) tem 17 anos e nasceu com hipospândia períneo-escrotal, criptorquidia, bexiga neurogênica e testículo esquerdo aumentado de volume (macrorquidismo). As cirurgias as quais ele foi submetido incluem extirpação de rim direito por presença de policistos (dez meses de idade), orquipexia (sete anos) e correção de hipospádia.

Além dos defeitos urogenitais descritos, o filho da paciente apresenta também retardo mental leve-moderado, infecção de cisto inguinal, hipotireoidismo (desde os quatorze anos) e diabetes insulínica dependente (desde os dezesseis anos). O menino recebe suplementação hormonal para tiróides, medicação para o controle de urina e duas doses diárias de insulina.

Figura 22: Heredograma da família da paciente 28.

Caso nº 29: paciente com SR tipo B

Paciente K.L.R.O., RG-LGH-USP nº16640, de 2 anos de idade (DN: 07/02/2002), nascida de parto cesariano por apresentação transversa, falta de dilatação do canal de parto e cisto ovariano infectado na mãe. Foi encaminhada para a realização de estudo genético por fenótipo sindrômico.

Exame físico: Fácies triangular, frontal proeminente, hipertelorismo, fissuras palpebrais curtas, orelhas grandes e com rotação incompleta, implantação baixa do cabelo na nuca, tórax em escudo, 2º artelho grande com desvio do halux, prega palmar única transversa bilateral, retardo mental moderado-severo.

Exames realizados:

- 1) Cariótipo: 46,XX
- 2) Ultra-sonografia: útero, vagina e ovários não visualizados. Agenesia de rim esquerdo.
- 3) Testes moleculares: deleção de novo de 2.5Mb localizado em 5q35 detectada por array-CGH com as sondas CTB-87L24 e RP11-564G9.

História familiar (heredograma no anexo): Não há na família da afetada nenhum outro caso semelhante.

IV.I.b - Descrição das pacientes argentinas (Casos 30-43)

Nesta seção se apresenta a Tabela 3 com o fenótipo detalhado das 14 pacientes estrangeiras, correspondentes ao Caso nº30 ao nº43. As amostras de sangue periférico e as fichas com os dados destas pacientes foram enviados pelos especialistas do Serviço de Ginecologia do Hospital Berdardino Rivadavia e do Hospital de Pediatria Prof. Dr. Juan P. Garrahan, onde todas elas realizaram reconstrução do canal vaginal. O exame clínico-ginecológico padronizado e de imagem foi realizado pelos médicos especialistas dos próprios centros, mediante o preenchimento de uma cópia (traduzida) de nossa ficha clínica solicitando todos os dados (clínicos, ginecológicos, de imagem, história familiar, etc.). Esses documentos foram entregues a nós juntamente com as amostras de sangue periférico, devidamente identificadas. Essas amostras foram analisadas com o mesmo protocolo de laboratório usado nas pacientes brasileiras, com realização de cariótipo e testes moleculares para triagem de mutações.

Descrição fenotípica	
Caso nº30 SR tipo B	C.R., Reg. USP nº17724, com 18 anos de idade; apresenta agenesia completa de útero e vagina, com presença bilateral de remanescentes müllerianos sólidos não funcionais, displasia costo-vertebral e hérnia de diafragma corrigida na infância.
Caso nº31 SR tipo B	A.B., Reg. USP nº17725, com 2 anos de idade; apresenta agenesia completa de útero e vagina, malformação anorretal (fístula perianal) e agenesia unilateral de rim.
Caso nº32 SR tipo A	B.C., Reg. USP nº17726, com 16 anos de idade apresenta agenesia completa de útero e vagina, com presença bilateral de remanescentes müllerianos sólidos não funcionais.
Caso nº33 SR tipo A	M.D.C., Reg. USP nº17727, com 17 anos de idade, apresenta agenesia completa de útero e vagina, com presença bilateral de remanescentes müllerianos sólidos não funcionais.
Caso nº34 SR tipo B	S.M., Reg. USP nº17728, com 22 anos de idade; apresenta agenesia completa de útero e vagina, defeito de Klippel-Feil e malformação anorretal (fístula perianal).
Caso nº35 SR tipo B	C.C., Reg USP nº17611, com 23 nos de idade (DN: 02/12/1981), progenitores não consangüíneos, nasceu de parto cesariano sem intercorrências; apresenta agenesia completa de útero, vagina em fundo cego com 2cm de profundidade e escoliose dorsal. Ovários visualizados e rins normais (Dir.: 111x43mm; Esq.: 110x51mm). Tipo corporal normolíneo. Pubarca: 12 anos, telarca: 11 anos. Carac. Sex. 2º: Tanner V. Cariótipo: 46,XX. A avó materna é diabética insulino-dependente.
Caso nº36 SR tipo B	J.A., Reg. USP nº17612, com 22 anos de idade (DN: 01/03/1983), progenitores não consangüíneos, nasceu de parto cesariano pré-termo; apresenta agenesia completa de útero e vagina, ovários não visualizados, rins normais e escoliose cervico-dorsal. Tipo corporal normolíneo. Pubarca: 12 anos, telarca: 12 anos. Carac. Sex. 2º: Tanner IV. Vagina em fundo cego com 2cm. de profundidade (usa molde). Cariótipo: 46,XX. Prima paterna com infertilidade.
Caso nº37 SR tipo B	M.G.S., Reg. USP nº17613, com 31 anos de idade (DN:28/04/1974), progenitores não consangüíneos, nasceu de parto normal pré-termo; apresenta útero rudimentar sólido com vagina curta terminando em fundo cego com 5cm de profundidade, ovários e rins normais e déficit auditivo bilateral. Tipo corporal normolíneo. Pubarca: 12 anos, telarca: 11 anos. Carac. Sex. 2º: Tanner IV. Cariótipo: 46,XX. Prima irmã paterna com deficiência auditiva bilateral.

Tabela 3: Descrição clinica detalhada do fenótipo das pacientes argentinas.

Descrição fenotípica	
Caso nº38 SR tipo A	C.P., Reg. USP nº17614, com 24 anos de idade (DN:01/04/1980), progenitores não consangüíneos, nasceu de parto normal a termo; apresenta útero rudimentar sólido (21mm) com vagina curta terminando em fundo cego com 4 cm de profundidade. Rins e ovários normais (Dir.: 32x18mm; Esq.: 33x20mm). Fez reposição hormonal durante a adolescência. Tipo corporal normolíneo. Pubarca: 12 anos, telarca: 12 anos. Carac. Sex. 2º: Tanner V. Tia e prima paterna com esterilidade, avó paterna com diabetes e primo com deficiência auditiva bilateral.
Caso nº39 SR tipo B	S.P., Reg. USP nº17615, com 24 anos de idade (DN:11/11/1980), progenitores não consangüíneos, nasceu de parto normal a termo; apresenta útero rudimentar sólido (32mm) com agenesia de canal vaginal, rim direito pélvico (Dir.: 63mm; Esq.: 131mm), ambos ovários visualizados, cifose e cirurgias corretivas por persistência de ducto arterioso ao nascimento e de canal vaginal na adolescência. Pubarca: 12 anos, telarca: 12 anos. Carac. Sex. 2º: Tanner IV. Avó e tia materna com diabetes.
Caso nº40 SR tipo B	P.L., Reg. USP nº17616, com 24 anos de idade (DN: 10/08/1981), progenitores não consangüíneos, nasceu de parto cesariano a termo; apresenta útero rudimentar sólido (38x30x25mm) com agenesia de canal vaginal, ovário direito não visualizado (Esq.: 12x24mm), rins normais (infecção urinária a repetição), escoliose dorsal e assimetria facial com reconstrução maxilar por traumatismo. Tipo corporal brevilíneo (145cm de altura). Pubarca: 13 anos, telarca: 13 anos. Carac. Sex. 2º: Tanner V. Apresenta dor abdominal cíclico mensalente. A irmã (25 anos) apresenta assimetria mamária.
Caso nº41 SR tipo A	Y.V., Reg. USP nº17609, com 15 anos de idade (DN:17/04/90), progenitores consangüíneos, nasceu de parto normal a termo. Durante a gravidez a mãe teve infecção urinária e hérnia inguinal. A paciente apresenta útero rudimentar sólido e agenesia de vagina, fez cirurgia na infância por cardiopatia congênita. Pubarca: 12 anos, telarca: 12 anos. Carac. Sex. 2º: Tanner IV. A irmã fez cirurgia aos 6 anos por cisto cerebelar.
Caso nº42 SR tipo A	S.G., Reg. USP nº17610, com 26 anos de idade (DN:27/12/1978), progenitores não consangüíneos, nasceu de parto normal a termo; apresenta útero rudimentar sólido com vagina curta (5cm) terminando em fundo cego, rins e ovários normais (Der.: 20x14mm; Esq.: 25x14mm), dores abdominais cíclicas cada 30 a 60 dias. Pubarca: 10 anos, telarca: 9 anos. Carac. Sex. 2º: Tanner V. A mãe e outras pessoas da família apresentam cardiopatia congênita, duas tias e duas primas paternas com infertilidade, abortamentos recorrentes e dificuldade para engravidar.
Caso nº43 SR tipo B	P.P., Reg USP nº 18384, 14 anos de idade (DN: 01/12/93), nasceu de parto normal a termo, apresenta útero hipoplásico com vagina curta terminando em fundo cego, defeito congênito de articulação coxo-femoral e assimetria de membros inferiores. O pai tem espinha bífida, hérnia inguinal e problemas cardíacos. A avó paterna apresenta deficiência auditiva unilateral à esquerda.

Cont. Tabela 3: Descrição clínica detalhada do fenótipo das pacientes argentinas.

IV.1.c - Sumário dos achados da análise clínica

As Tabelas 4 e 5 sumarizam os dados obtidos de toda a casuística durante os três atendimentos. Outras informações pertinentes como idade, peso, medidas antropométricas e antecedentes familiares também são incluídos. As abreviaturas utilizadas na Tabela 4 são as seguintes:

EXAME CLÍNICO	Diagnóstico	SR típico/atípico	SR-A/SR-B
		defeito mülleriano afim à SR	Um
	Etnia	branca/negra/mulata	B/N/M
	Fácies e cavidade bucal	sindrômica	Sd
		assimétrica	As
		palato alto/ alto-arqueado	A/AA
		má oclusão dentária	MD
		úvula bífida	UB
		apêndices pré-auriculares	PP
	Defeito de membros, de curvatura de coluna e ósteo-articulares	clinodactilia/braquidactilia/sindactilia	Cl/Br/Si
		agenesia de dígitos	AD
		pé valgo bilateral	Pv
		assimetria de membros/ pés	Me/Pe
		luxação congênita do quadril	LQ
GINECOLÓGICO		escoliose/ lordose/ cifose	Es/Lo/Ci
		displasia costo-vertebral	DCV
	Deficiência auditiva	unilateral à esquerda/direita/bilateral	UE/UD/Bi
	Correção do canal	realizado/não realizado	+/-
		com/sem uso de molde	+/-
	Defeito vaginal	estenose/atresia	At
DE IMAGEM		ausência completa/agenesia	Ag
	Defeito uterino	rudimentar sólido/hipoplásico	Ru/Hi
	Defeito renal	agenesia unilateral direita/esquerda	AD/AE
		ectopia renal direita/esquerda	ED/EE
		ambos rins pélvicos/direita/esquerda	P/PD/PE
		rins em ferradura	Fe
		duplicidade pieló-calicial	Du
	Ovários	ambos visualizados	++
		ausência de um ovário	+
		nenhum ovário visualizado	-
		presença de cistos	C
Outros		Sinal ou defeito presente/ausente	+/-
		Exame inconclusivo ou não realizado	ND

EXAME CLÍNICO														GINECOLÓGICO				DE IMAGEM				OUTROS SINAIS IMPORTANTES			
Paciente	Diagnóstico	Etnia	Fácies e cavidade bucal	Impl. baixa das orelhas	Impl. baixa do cabelo	Defeito de Klippel-Feil	Anomalia de Sprengel	Defeito de membros, de curvatura de coluna e ósteo-articulares	Déficit auditivo	Dor abdominal cíclica	Reposição hormonal	Cardiopatias	Recorrência familiar	Vaginoplastia	Uso de molde	Malformação ano-retal	Defeito vaginal	Defeito uterino	Defeito renal	Ovários	Hematosalpinge				
1	Mu	N	MD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	Hi, +	-	-	++	+				
2	SR-B	B	AA	+	+	-	+	Br	UD	-	+	-	-	-	+	+	At, +	Ag	-	++	-	Pterígio cervical leve e baixa estatura			
3	Mu	B	AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	Ag	-	ND	-	Heteromorfismo cromossômico			
4	SR-B	M	As, AA	-	-	-	-	Lo	-	-	-	-	-	-	+	-	Ag	Ag	-	++	-	Assimetria facial e pescoço curto			
5	SR-B	B	AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Ag	Ru	PD	+	+	Ectopia renal cruzada			
6	SR-B	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	At, +	Ru	AE	+	-				
7	SR-A	B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	Ag	Ru	-	++	-	Mãe com abortamentos recorrentes			
8	SR-B	B	AA	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Ag	Ru	AD	-	-	Hipoplasia das trompas de Eustáquio, plioma			
9	SR-B	B	-	-	-	-	-	-	UD	-	+	-	+	+	+	-	Ag	Ag	AD	-	-	Fenótipo virilizado			
10	SR-A	B	AA	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	At, +	Ag	-	++	-	Pais consangüíneos, gêmea DZ discordante			
11	SR-B	M	AA, MD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	At, +	Ru	P	++	-	Osteopenia			
12	SR-B	N	AA, MD	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	At, +	Ag	P, Fe	+	-	Labirintite			
13	Mu	B	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	Ru	-	++	+				
14	SR-A	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ag	Ag	-	-	-				
15	SR-B	B	Sd	-	-	-	-	Pv, Es	-	-	-	+	+	-	-	-	Ag	Ru	AD	++	-	Fenótipo sínd. DiGeorge/Velocardiofacial			
16	SR-B	N	-	-	-	-	-	Si	-	-	-	-	-	-	-	-	At, +	Ag	-	-	-	Fusão dos grandes lábios			
17	SR-B	M	As	+	+	+	+	AD, LQ	-	-	-	+	-	-	-	-	Ag	Ag	AE	-	-	Úvula bífida			
18	SR-A	B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	At, +	Ag	-	++	+	Endométrio funcionais nas tropas			
19	SR-B	M	AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Ag	Ag	-	-	-	RM, epilepsia, nistagmo horizontal, onicodistrofia			
20	SR-B	B	A	-	-	-	-	LQ	-	+	-	-	+	+	+	-	Ag	Ag	P, Du	-	-	Topografia renal anormal			
21	SR-B	B	AA	-	+	-	-	Lo	-	+	-	-	+	+	-	-	Ag	Ru	-	+	+	Ovário esq. policístico (extirpado)			

Tabela 4 - Descrição sumária para os dados obtidos nos exames clínico, ginecológico e de imagem das 43 propósitas com SR ou condições afins.

EXAME CLÍNICO										GINECOLÓGICO				DE IMAGEM				OUTROS SINAIS IMPORTANTES				
Paciente	Diagnóstico	Etnia	Fácies e cavidade bucal	Impl. baixa das orelhas	Impl. baixa do cabelo	Defeito de Klippel-Feil	Anomalia de Sprengel	Defeito de membros, de curvatura de coluna e ósteo-articulares	Déficit auditivo	Dor abdominal cíclica	Reposição hormonal	Cardiopatia	Recorrência familiar	Vaginoplastia	Uso de molde	Malformação ano-retal	Defeito vaginal	Defeito uterino	Defeito renal	Ovários	Hematosalpinge	
22	SR-B	B	PP	-	-	-	-	Pé, Cl	-	+	-	-	+	+	+	-	Ag	Ag	Fe	+	-	Clavículas assimétricas
23	SR-B	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Ag	Ag	AE	-	-	Virilizada, nefrolitíase
24	SR-A	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Ag	Ru	-	-	-	
25	SR-A	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	At, +	Ru	-	-	-	
26	SR-B	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	Ag	Ru	AE	-	-	
27	SR-A	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ag	Ag	-	-	-	Sinéquia de pequenos lábios
28	Mu	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Hi	AD	++	-	Útero anteverso, osteofitose, filho sindrômico
29	SR-B	B	Sd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ag	Ag	AD	-	-	Tórax em escudo, fenótipo de sind. de Sotos, prega palmar única
30	SR-B	B	-	-	-	-	-	DVC	-	-	-	-	-	+	+	-	Ag	Ag	-	++	-	Remanescentes müllerianos sólidos não funcionais
31	SR-B	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	Ag	Ag	A	++	-	Fístula peri-anal
32	SR-A	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Ag	Ag	-	++	-	Remanescentes müllerianos sólidos não funcionais
33	SR-A	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Ag	Ag	-	++	-	Remanescentes müllerianos sólidos não funcionais
34	SR-B	B	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	Ag	Ag	-	++	-	Fístula peri-anal
35	SR-B	B	-	-	-	-	-	Es	-	-	-	-	+	+	+	-	At, +	Ag	-	++	-	
36	SR-B	B	-	-	-	-	-	Es	-	-	-	-	+	+	+	-	Ag	Ag	-	-	-	
37	SR-B	B	-	-	-	-	-	-	Bi	-	-	-	+	+	+	-	At, +	Ru	-	++	-	Miringoplastia
38	SR-A	B	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	At, +	Ru	-	++	-	
39	SR-B	B	-	-	-	-	-	Ci	-	-	-	+	-	+	+	-	Ag	Ru	PD	++	-	Persistência de ducto arterioso
40	SR-B	B	As	-	-	-	-	Es	-	-	-	-	+	-	-	-	At, +	Ru	-	+	-	Reconstrução de maxilar, baixa estatura
41	SR-A	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	Ag	Ru	-	++	-	Pais consanguíneos
42	SR-A	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	At, +	Ru	-	++	-	
43	SR-B	B	-	-	-	-	-	Me	-	+	-	-	+	-	-	-	At, +	Hi	-	++	-	Pai com espinha bífida e hérnia inguinal

Cont. Tabela 4 - Descrição sumária para os dados obtidos nos exames clínico, ginecológico e de imagem das 43 propósitas com SR ou condições afins.

Paciente	Idade (anos)	Pubarca (anos)	Telarca (anos)	Peso (kg)	Estatura (cm)	PC (cm)	DIM (cm)	DPP (cm)	DPV (cm)	Vagina (mm)	Mamas (Tanner)	Pilificação	Ovários (mm)		Rins (mm)	
													Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
1	13	9	11	54	160	57	23	73	87	60	IV	IV	35x20x20	31x20x25	ND	ND
2	32	11	11	45	142	56	21	68	74	70	IV	IV	45x18x42	21x14x23	39x35x45	94x43x48
3	33	12	12	55	161	56	21	78	83	70	V	V	ND	ND	ND	ND
4	32	ND	ND	87	150	57	32	73	77	40	IV	IV	17x33x35	42x40x40	101x40x50	110x47x48
5	30	13	13	52	152	57	21	75	77	70	IV	IV	NV	21x44x22	87x34x43	112x44x47
6	31	13	13	55	160	54	21	80	80	70	IV	IV	NV	50x15x20	136x50x66	NV
7	38	9	11	52	157	55	23	78	79	80	IV	IV	23x16x30	40x20x23	96x42x47	99x42x38
8	33	11	12	45	156	55	ND	79	77	45	IV	IV	NV	NV	NV	126x48x40
9	34	17	18	49	160	51	23	81	79	45	III	IV	NV	NV	NV	102x55x50
10	43	13	14	87	152	52	31	75	77	70	IV	IV	21x43x18	42x16x16	99x34x51	105x44x50
11	26	11	11	49	153	57	22	84	69	25	IV	IV	39x16x26	37x20x22	97x46x40	82x44x45
12	36	11	11	54	162	57	20.5	84	78	60	IV	IV	NV	32x20x26	ferradura	116x43x40
13	34	12	11	44	150	54	21	75	75	75	IV	IV	28x20x17	25x17x14	95x37x44	108x45x44
14	40	ND	ND	48	159	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NV	NV	ND	ND
15	16	ND	ND	48	159	52	ND	ND	ND	20	ND	ND	ND	ND	NV	ND
16	3	-	-	10	87	48	ND	ND	ND	1	I	I	NV	NV	ND	ND
17	21	12	12	46	150	ND	ND	ND	ND	10	IV	IV	NV	Ns	ND	NV
18	19	13	13	67	163	54	21	81	82	60	IV	IV	36x30x17	28x24x32	110x41x58	107x49x45
19	45	8	9	47	160	55	20	83	77	20	III	III	NV	NV	ND	ND
20	24	12	10	70	163	58	24	77	86	100	V	V	NV	NV	93x57x43	96x42x35
21	39	12	12	55	155	53	23	72	83	40	V	V	36x26x23	extirpado	99x35x54	99x49x52
22	33	10	10	96	154	57	31	77	77	40	IV	IV	22x14x17	NV	ND	ND
23	25	11	12	52	166	ND	ND	ND	ND	40	III	III	NVs	NVs	ND	NV
24	36	ND	ND	47	ND	ND	ND	ND	ND	100	V	V	NVs	NVs	ND	ND
25	32	12	12	70	162	57	25	76	86	80	IV	IV	ND	ND	ND	ND
26	26	ND	ND	55	165	57	ND	ND	ND	ND	IV	IV	ND	atrofiado	ND	NV
27	7	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10	I	I	NVs	NVs	ND	ND
28	53	ND	ND	55	152	57	23	75	77	80	IV	IV	21x7x19	17x9x18	NV	125x74x72
29	2	-	-	12	90	47	13	37	53	1	I	I	ND	ND	ND	ND
30	18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
31	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	NV	ND
32	16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
33	17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
34	22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
35	23	12	11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20	V	V	ND	ND	111x43	110x51
36	22	12	12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20	IV	IV	NV	NV	ND	ND
37	31	12	11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	50	IV	IV	ND	ND	ND	ND
38	24	12	12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	40	V	V	32x18	33x20	ND	ND
39	24	12	12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10	IV	IV	ND	ND	ND	ND
40	24	13	13	ND	145	ND	ND	ND	ND	10	V	V	NV	ND	ND	ND
41	15	12	12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10	IV	IV	ND	ND	ND	ND
42	26	10	9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	50	IV	IV	20x14	25x14	ND	ND
43	14	11	11	65	170	ND	ND	ND	ND	50	V	V	23	24	ND	ND

Tabela 5: Descrição sumária das 43 propósitas incluindo: idade, idade à pubarca e telarca, medidas físicas, profundidade vaginal, desenvolvimento mamário e pilificação pubiana (classificação de Tanner) e medidas de ovários e rins (lateral x ântero-posterior x transversal). [ND: Exame inconclusivo ou não realizado; NV: órgão não visualizado]

IV.2 - Discussão dos achados clínicos

Nas Tabelas 4 e 5 foram sumarizados todos os dados obtidos das 43 propósitas e seus familiares nos exames clínico, ginecológico e de imagem.

Geralmente, as pacientes encontravam-se na adolescência por ocasião do diagnóstico do defeito útero-vaginal. Exceções e esse fato foram crianças com identificação precoce do defeito devido à presença de malformações externas ao momento do nascimento [fusão da genitália externa (casos nº 3 e 27), malformação anorretal (casos nº 31 e 34), sinais clínicos variados que sugeriam fenótipo sindrômico (Casos nº 17 e 29), defeito cardíaco (casos nº 39 e 41) e luxação congênita do quadril (caso nº 20)].

Dentro do grupo de pacientes cujo diagnóstico foi realizado na adolescência, a queixa mais freqüente que indicou a procura do médico foi amenorréia primária (58%), seguida de dor abdominal cíclica, dispaurenia ou ambas as queixas (14%).

Os conjuntos de tabelas identificados pelos nomes amostra total e amostra de pacientes examinados pessoalmente que se seguem mostram as freqüências observadas dos sinais e sintomas mais importantes da síndrome de Rokitansky de nossa casuística.

Em cada tabela são mostradas as freqüências de sintomas e sinais afins (agrupados por órgãos, aparelhos ou sistemas) nas pacientes SR tipo A, SR tipo B e portadoras de defeitos afins e no conjunto de todas as pacientes. O segundo conjunto de tabelas, cujos resultados foram obtidos na amostra de pacientes examinados pessoalmente, apesar de menor, é mais confiável, uma vez que as freqüências lá mostradas foram inferidas a partir dos resultados obtidos mediante a aplicação sistemática de uma ficha específica (mostrada em anexo) de anamnese e exame físico.

Na amostra completa, que contém os dados de nossos pacientes examinados pessoalmente, na maioria das vezes não tínhamos critérios para decidir se uma característica qualquer deixou de ser mencionada porque não foi pesquisada ou porque não estava presente (consideramos sempre, para o cálculo das freqüências, que os sinais ou sintomas deixavam de ser mencionados porque estavam ausentes).

De qualquer maneira, essas freqüências devem ser apenas aproximações grosseiras das verdadeiras, uma vez que os pacientes já são incluídos no projeto justamente por apresentarem uma série de sinais ou sintomas típicos. Além disso, a probabilidade de inclusão de um paciente qualquer numa amostra é diretamente proporcional à gravidade do fenótipo ou ao número de características conspícuas que a afetada apresenta.

As freqüências de sinais e sintomas por nós observadas em nossos pacientes, e levando-se em conta o tamanho relativamente modesto de nossa amostra, encontram-se na faixa media da literatura. Chamou-nos apenas a atenção a percentagem alta, da ordem de 60%, da não visualização de um ou de ambos os ovários à ultrassonografia, uma vez que a maioria das pacientes afetadas por SR e suas condições afins não apresenta sinais clínicos de doença ovariana.

A - Conjunto de tabelas de freqüências de sinais e sintomas da SR observados na amostra total de 43 pacientes.

DEFEITOS UTERINOS

	agen.ut.	ut.rudi.	ut.hipo.	normal
1	6/12 = 0.500	6/12 = 0.500	0/12 = 0.000	0/12 = 0.000
2	16/27 = 0.593	10/27 = 0.370	1/27 = 0.037	0/27 = 0.000
3	1/ 4 = 0.250	1/ 4 = 0.250	1/ 4 = 0.250	1/ 4 = 0.250
T	23/43 = 0.535	17/43 = 0.395	2/43 = 0.047	1/43 = 0.023

DEFEITOS VAGINAIS

	agen.vag.	atr.vag.	him.imp.	normal
1	7/12 = 0.583	5/12 = 0.417	0/12 = 0.000	0/12 = 0.000
2	18/27 = 0.667	9/27 = 0.333	0/27 = 0.000	0/27 = 0.000
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	1/ 4 = 0.250	3/ 4 = 0.750
T	25/43 = 0.581	14/43 = 0.326	1/43 = 0.023	3/43 = 0.070

CORREÇÃO DO CANAL VAGINAL

	molde	vaginopl.	vag.+molde	s/corr.
1	3/12 = 0.250	1/12 = 0.083	4/12 = 0.333	4/12 = 0.333
2	2/27 = 0.074	1/27 = 0.037	13/27 = 0.481	11/27 = 0.407
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	2/ 4 = 0.500	2/ 4 = 0.500
T	5/43 = 0.116	2/43 = 0.047	19/43 = 0.442	17/43 = 0.395

DEFEITOS ANO-RETAIS

	fistula	normal
1	0/12 = 0.000	12/12 = 1.000
2	2/27 = 0.074	25/27 = 0.926
3	0/ 4 = 0.000	4/ 4 = 1.000
T	2/43 = 0.047	41/43 = 0.953

DEFEITOS RENAIIS

	agenesia	r.pelvico	r.ferrad.	normal
1	0/12 = 0.000	0/12 = 0.000	0/12 = 0.000	12/12 = 1.000
2	9/27 = 0.333	4/27 = 0.148	2/27 = 0.074	12/27 = 0.444
3	1/ 4 = 0.250	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	3/ 4 = 0.750
T	10/43 = 0.233	4/43 = 0.093	2/43 = 0.047	27/43 = 0.628

OVÁRIOS (VISUALIZAÇÃO)

	nenhum vi.	um visua.	ambos vi.
1	4/12 = 0.333	0/12 = 0.000	8/12 = 0.667
2	10/27 = 0.370	5/27 = 0.185	12/27 = 0.444
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	4/ 4 = 1.000
T	14/43 = 0.326	5/43 = 0.116	24/43 = 0.558

SEGM CEFÁLICO

	f.as./si.	ap.preaur.	imp.b.c.o.	normal
1	0/12 = 0.000	0/12 = 0.000	0/12 = 0.000	12/12 = 1.000
2	6/27 = 0.222	1/27 = 0.037	3/27 = 0.111	17/27 = 0.630
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	4/ 4 = 1.000
T	6/43 = 0.140	1/43 = 0.023	3/43 = 0.070	33/43 = 0.767

CAVIDADE BUCAL

	pal.alto	uv.bifida	normal
1	1/12 = 0.083	0/12 = 0.000	11/12 = 0.917
2	9/27 = 0.333	1/27 = 0.037	17/27 = 0.630
3	1/ 4 = 0.250	0/ 4 = 0.000	3/ 4 = 0.750
T	11/43 = 0.256	1/43 = 0.023	31/43 = 0.721

AUDIÇÃO

	def.unilat.	def.bilat.	normal
1	0/12 = 0.000	0/12 = 0.000	12/12 = 1.000
2	2/27 = 0.074	1/27 = 0.037	24/27 = 0.889
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	4/ 4 = 1.000
T	2/43 = 0.047	1/43 = 0.023	40/43 = 0.930

DEFEITOS OSTEO-ARTICULARES

	d.cur.col.	lux.c.quad.	ou.def.col.	normal
1	0/12 = 0.000	0/12 = 0.000	0/12 = 0.000	12/12 = 1.000
2	7/27 = 0.259	1/27 = 0.037	4/27 = 0.148	15/27 = 0.556
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	4/ 4 = 1.000
T	7/43 = 0.163	1/43 = 0.023	4/43 = 0.093	31/43 = 0.721

DEFEITOS CARDÍACOS

	com.i.v.	pers.d.a.	outros def.	normal
1	0/12 = 0.000	0/12 = 0.000	1/12 = 0.083	11/12 = 0.917
2	1/27 = 0.037	1/27 = 0.037	1/27 = 0.037	24/27 = 0.889
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	4/ 4 = 1.000
T	1/43 = 0.023	1/43 = 0.023	2/43 = 0.047	39/43 = 0.907

RECORRÊNCIA FAMILIAR

	out.afet.	c.isol.
1	6/12 = 0.500	6/12 = 0.500
2	13/27 = 0.481	14/27 = 0.519
3	4/ 4 = 1.000	0/ 4 = 0.000
T	23/43 = 0.535	20/43 = 0.465

DEFEITOS DE EXTREMIDADES

	braquid.	pe torto	outros d.	normal
1	0/12 = 0.000	0/12 = 0.000	0/12 = 0.000	12/12 = 1.000
2	1/27 = 0.037	1/27 = 0.037	1/27 = 0.037	24/27 = 0.889
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	4/ 4 = 1.000
T	1/43 = 0.023	1/43 = 0.023	1/43 = 0.023	40/43 = 0.930

B - Conjunto de tabelas de frequências de sinais e sintomas da SR observados na amostra de pacientes examinados pessoalmente.

DEFEITOS UTERINOS

	agen.ut.	ut.rudi.	ut.hipo.	normal
1	4/ 7 = 0.571	3/ 7 = 0.429	0/ 7 = 0.000	0/ 7 = 0.000
2	11/18 = 0.611	7/18 = 0.389	0/18 = 0.000	0/18 = 0.000
3	1/ 4 = 0.250	1/ 4 = 0.250	1/ 4 = 0.250	1/ 4 = 0.250
T	16/29 = 0.552	11/29 = 0.379	1/29 = 0.034	1/29 = 0.034

DEFEITOS VAGINAIS

	agen.vag.	atr.vag.	him.imp.	normal
1	4/ 7 = 0.571	3/ 7 = 0.429	0/ 7 = 0.000	0/ 7 = 0.000
2	13/18 = 0.722	5/18 = 0.278	0/18 = 0.000	0/18 = 0.000
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	1/ 4 = 0.250	3/ 4 = 0.750
T	17/29 = 0.586	8/29 = 0.276	1/29 = 0.034	3/29 = 0.103

CORREÇÃO DO CANAL VAGINAL

	molde	vaginopl.	vag.+molde	s/corr.
1	3/ 7 = 0.429	0/ 7 = 0.000	1/ 7 = 0.143	3/ 7 = 0.429
2	2/18 = 0.111	1/18 = 0.056	6/18 = 0.333	9/18 = 0.500
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	2/ 4 = 0.500	2/ 4 = 0.500
T	5/29 = 0.172	1/29 = 0.034	9/29 = 0.310	14/29 = 0.483

DEFEITOS ANO-RETAIS

	fistula	normal
1	0/ 7 = 0.000	7/ 7 = 1.000
2	0/18 = 0.000	18/18 = 1.000
3	0/ 4 = 0.000	4/ 4 = 1.000
T	0/29 = 0.000	29/29 = 1.000

DEFEITOS RENAIIS

	agenesia	r.pelvico	r.ferrad.	normal
1	0/ 7 = 0.000	0/ 7 = 0.000	0/ 7 = 0.000	7/ 7 = 1.000
2	8/18 = 0.444	3/18 = 0.167	2/18 = 0.111	5/18 = 0.278
3	1/ 4 = 0.250	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	3/ 4 = 0.750
T	9/29 = 0.310	3/29 = 0.103	2/29 = 0.069	15/29 = 0.517

OVARIOS (VISUALIZAÇÃO)

	nenhum vi.	um visua.	ambos vi.
1	4/ 7 = 0.571	0/ 7 = 0.000	3/ 7 = 0.429
2	9/18 = 0.500	5/18 = 0.278	4/18 = 0.222
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	4/ 4 = 1.000
T	13/29 = 0.448	5/29 = 0.172	11/29 = 0.379

SEGM. CEFALICO

	f.as./si.	ap.preaur.	imp.b.c.o.	normal
1	0/ 7 = 0.000	0/ 7 = 0.000	0/ 7 = 0.000	7/ 7 = 1.000
2	5/18 = 0.278	1/18 = 0.056	2/18 = 0.111	10/18 = 0.556
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	4/ 4 = 1.000
T	5/29 = 0.172	1/29 = 0.034	2/29 = 0.069	21/29 = 0.724

CAVIDADE BUCAL

	pal.alto	uv.bifida	normal
1	1/ 7 = 0.143	0/ 7 = 0.000	6/ 7 = 0.857
2	9/18 = 0.500	1/18 = 0.056	8/18 = 0.444
3	1/ 4 = 0.250	0/ 4 = 0.000	3/ 4 = 0.750
T	11/29 = 0.379	1/29 = 0.034	17/29 = 0.586

AUDIÇÃO

	def.unilat.	def.bilat.	normal
1	0/ 7 = 0.000	0/ 7 = 0.000	7/ 7 = 1.000
2	2/18 = 0.111	0/18 = 0.000	16/18 = 0.889
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	4/ 4 = 1.000
T	2/29 = 0.069	0/29 = 0.000	27/29 = 0.931

DEFEITOS OSTEO-ARTICULARES

	d.cur.col.	lux.c.quad.	ou.def.col.	normal
1	0/ 7 = 0.000	0/ 7 = 0.000	0/ 7 = 0.000	7/ 7 = 1.000
2	3/18 = 0.167	1/18 = 0.056	2/18 = 0.111	12/18 = 0.667
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	4/ 4 = 1.000
T	3/29 = 0.103	1/29 = 0.034	2/29 = 0.069	23/29 = 0.793

DEFEITOS CARDÍACOS

	com.i.v.	pers.d.a.	outros def.	normal
1	0/ 7 = 0.000	0/ 7 = 0.000	0/ 7 = 0.000	7/ 7 = 1.000
2	1/18 = 0.056	0/18 = 0.000	1/18 = 0.056	16/18 = 0.889
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	4/ 4 = 1.000
T	1/29 = 0.034	0/29 = 0.000	1/29 = 0.034	27/29 = 0.931

RECORRÊNCIA FAMILIAR

	out.afet.	c.isol.
1	3/ 7 = 0.429	4/ 7 = 0.571
2	8/18 = 0.444	10/18 = 0.556
3	4/ 4 = 1.000	0/ 4 = 0.000
T	15/29 = 0.517	14/29 = 0.483

DEFEITOS DE EXTREMIDADES

	braquid.	pe torto	outros d.	normal
1	0/ 7 = 0.000	0/ 7 = 0.000	0/ 7 = 0.000	7/ 7 = 1.000
2	1/18 = 0.056	1/18 = 0.056	0/18 = 0.000	16/18 = 0.889
3	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	0/ 4 = 0.000	4/ 4 = 1.000
T	1/29 = 0.034	1/29 = 0.034	0/29 = 0.000	27/29 = 0.931

Apresentamos em seguida tabelas de estatística descritiva e gráficos de dispersão e boxplot de 15 variáveis quantitativas estudadas em nossas pacientes, separadas por grupos (três subtipos de SR e total). Para essa análise foram retiradas as afetadas com menos de 14 anos. Todos os cálculos foram realizados por meio de programas comerciais de estatística e por meio de programas especialmente desenvolvidos para o projeto.

Idade (em anos)

grupo	n	média	mediana	s.d.	s.e.	min	max	Q1	Q3
1	11	27.82	26.00	10.41	3.14	15.00	43.00	17.00	38.00
2	24	27.54	26.00	7.40	1.51	14.00	45.00	22.25	32.75
3	4	33.25	33.50	16.34	8.17	13.00	53.00	18.00	48.25
4	39	28.21	26.00	9.26	1.48	13.00	53.00	22.00	34.00

Gráficos de dispersão e boxplot (median, range, Q1, Q3, outliers)

Peso (em kg)

grupo	n	média	mediana	s.d.	s.e.	min	max	Q1	Q3
1	6	61.83	59.50	15.72	6.42	47.00	87.00	47.75	74.25
2	17	57.06	52.00	14.67	3.56	45.00	96.00	47.50	60.00
3	4	52.00	54.50	5.35	2.68	44.00	55.00	46.50	55.00
4	27	57.37	54.00	13.87	2.67	44.00	96.00	48.00	65.00

Gráficos de dispersão e boxplot (median, range, Q1, Q3, outliers)

Estatura (em cm)

grupo	n	média	mediana	s.d.	s.e.	min	max	Q1	Q3
1	5	158.60	159.00	4.39	1.96	152.00	163.00	154.50	162.50
2	18	156.78	157.50	7.38	1.74	142.00	170.00	151.50	162.25
3	4	155.75	156.00	5.56	2.78	150.00	161.00	150.50	160.75
4	27	156.96	159.00	6.55	1.26	142.00	170.00	152.00	162.00

Gráficos de dispersão e boxplot (median, range, Q1, Q3, outliers)

Idade à pubarca (em anos)

grupo	n	média	mediana	s.d.	s.e.	min	max	Q1	Q3
1	7	11.57	12.00	1.51	0.57	9.00	13.00	10.00	13.00
2	19	11.79	12.00	1.72	0.39	8.00	17.00	11.00	12.00
3	3	11.00	12.00	1.73	1.00	9.00	12.00	9.00	12.00
4	29	11.66	12.00	1.63	0.30	8.00	17.00	11.00	12.00

Gráficos de dispersão e boxplot (median, range, Q1, Q3, outliers)

Idade à telarca (em anos)

grupo	n	média	mediana	s.d.	s.e.	min	max	Q1	Q3
1	7	11.86	12.00	1.57	0.59	9.00	14.00	11.00	13.00
2	19	11.79	12.00	1.84	0.42	9.00	18.00	11.00	12.00
3	3	11.33	11.00	0.58	0.33	11.00	12.00	11.00	12.00
4	29	11.76	12.00	1.66	0.31	9.00	18.00	11.00	12.00

Gráficos de dispersão e boxplot (median, range, Q1, Q3, outliers)

Perímetro cefálico (em cm)

grupo	n	média	mediana	s.d.	s.e.	min	max	Q1	Q3
1	4	54.50	54.50	2.08	1.04	52.00	57.00	52.50	56.50
2	14	55.43	56.50	2.17	0.58	51.00	58.00	53.75	57.00
3	4	56.00	56.50	1.41	0.71	54.00	57.00	54.50	57.00
4	22	55.36	56.00	2.01	0.43	51.00	58.00	54.00	57.00

Gráficos de dispersão e boxplot (median, range, Q1, Q3, outliers)

Distância intermamilar (em cm)

grupo	n	média	mediana	s.d.	s.e.	min	max	Q1	Q3
1	4	25.00	24.00	4.32	2.16	21.00	31.00	21.50	29.50
2	11	23.45	22.00	4.18	1.26	20.00	32.00	21.00	24.00
3	4	22.00	22.00	1.15	0.58	21.00	23.00	21.00	23.00
4	19	23.47	23.00	3.75	0.86	20.00	32.00	21.00	24.00

Gráficos de dispersão e boxplot (median, range, Q1, Q3, outliers)

Comprimento da vagina (em mm)

grupo	n	média	mediana	s.d.	s.e.	min	max	Q1	Q3
1	10	51.00	55.00	32.80	10.40	10.00	100.00	10.00	80.00
2	23	38.04	40.00	24.48	5.11	10.00	100.00	20.00	50.00
3	4	71.25	72.50	8.54	4.27	60.00	80.00	62.50	78.75
4	37	45.14	45.00	27.55	4.53	10.00	100.00	20.00	70.00

Gráficos de dispersão e boxplot (median, range, Q1, Q3, outliers)

Volume médio dos rins (em cm³)

grupo	n	média	mediana	s.d.	s.e.	min	max	Q1	Q3
1	3	101.80	105.40	30.40	17.60	69.70	130.20	69.70	130.20
2	6	96.59	95.28	18.63	7.61	66.87	117.85	83.64	115.73
3	1	96.47	96.47	-	-	96.47	96.47	-	-
4	10	98.14	96.55	20.13	6.36	66.87	130.25	84.35	115.73

Gráficos de dispersão e boxplot (median, range, Q1, Q3, outliers)

Volume médio dos ovários (em cm³)

grupo	n	média	mediana	s.d.	s.e.	min	max	Q1	Q3
1	3	8.40	7.71	1.79	1.03	7.07	10.44	7.07	10.44
2	3	13.97	10.68	7.66	4.42	8.51	22.73	8.51	22.73
3	3	4.41	4.05	3.15	1.82	1.45	7.72	1.45	7.72
4	9	8.93	7.72	5.94	1.98	1.45	22.73	5.56	10.56

Gráficos de dispersão e boxplot (median, range, Q1, Q3, outliers)

Índice pube-planta/pube-vértex

grupo	n	média	mediana	s.d.	s.e.	min	max	Q1	Q3
1	4	0.96	0.98	0.05	0.02	0.88	0.99	0.91	0.99
2	12	1.00	1.00	0.09	0.03	0.87	1.22	0.93	1.06
3	4	0.94	0.96	0.07	0.04	0.84	1.00	0.86	0.99
4	20	0.98	0.98	0.08	0.02	0.84	1.22	0.92	1.02

Gráficos de dispersão e boxplot (median, range, Q1, Q3, outliers)

Matriz de correlação entre as variáveis métricas e merísticas

	idade	peso	estat	pubarca	telarca	per_cefa	d_intnam	comp_vag	volmrim	volmova
peso	0.010									
estat	-0.287	0.029								
pubarca	-0.043	0.031	-0.078							
telarca	0.050	-0.042	-0.039	0.864						
per_cefa	-0.081	0.173	0.009	-0.539	-0.692					
d_intnam	0.099	0.901	-0.249	0.037	0.084	0.020				
comp_vag	0.505	0.093	0.176	0.013	-0.021	0.301	-0.101			
volmrim	-0.241	0.583	0.450	0.749	0.534	-0.300	0.337	-0.336		
volmova	-0.329	0.559	-0.119	0.008	0.117	0.234	0.555	-0.573	0.371	
indpppv	0.191	-0.228	-0.032	-0.029	-0.012	-0.065	-0.196	-0.516	-0.152	-0.108

IV.3 - Resultados das análises de laboratório: SSCP e dHPLC

As regiões codificadoras de cada gene (oito exons do gene *RAR-G*, nove do gene *RXR-A* e cinco do gene *WNT-4*) correspondente a cada propósita e seus familiares (N=64) foram submetidas à triagem em eletroforese em gel vertical e em seguida analisadas mediante a técnica de cromatografia líquida.

A triagem revelou a existência de 18 alterações, identificadas pelo padrão de migração de bandas no gel de SSCP (Fig. 23) ou pela presença de pico duplo no dHPLC (Fig. 24). Todas as amostras foram seqüenciadas e as alterações identificadas são detalhadas na Tabela 6.

Figura 23 - A: Fotografia do gel de SSCP indicando a migração de bandas normais e alteradas (seta). **B:** Confirmação por seqüenciamento da alteração detectada por SSCP. O electroferograma mostra a variação polimórfica c.1280T>C no exon 8 do gene *RAR-G*. **C:** seqüência normal.

Figura 24: **A e B:** Electroferogramas gerados pelo software do dHPLC, mostrando em A o resultado da análise de uma amostra com padrão normal e em B o resultado da análise de uma paciente com SR com pico duplo. **C:** Sequência do controle normal. **D:** Identificação do polimorfismo mediante o sequenciamento da amostra indicada em B.

Gene	RAR-G	8 alterações	Alteração
Intron 7-8	caso nº21 e mãe do caso 1		IVS7+21C>T
Exon 8	casos nº1, 7, 11, 16, 12 e 3		c.1190G>C
Gene	RAR-X	3 alterações	Alteração
Exon 3	caso nº7		c.494G>T
Exon 7	caso nº13		c.1108C>A
Intron 9-10	sobrinha do caso nº18		IVS9+21T>A
Gene	WNT-4	7 alterações	Alteração
Exon 5	casos nº 14, 28,10, 29, 24, 25 e filho de caso nº28		c.1026C>T

Tabela 6 – Dezoito alterações polimórficas previamente descritas, identificadas mediante a técnica de SSCP seguida de dHPLC nos genes RAR-G, RXR- e, WNT-4.

IV.4 – Discussão dos resultados laboratoriais

A análise molecular por meio das técnicas de SSCP e dHPLC de todas as regiões codificadoras dos genes RAR-G, RXR-A e WNT-4 nos 64 propósitos da casuística permitem concluirmos que um total de dezoito alterações, todas em heterozigose. A comparação com os bancos de dados (<http://www.ensembl.org/>) determinou que as alterações correspondem a variações populacionais polimórficas (previamente descritas) e sem efeito patogênico, uma vez que nenhuma delas altera a sequência de aminoácidos das proteínas por elas codificadas.

IV.5 - Resultados obtidos da análise por array-CGH

Realizamos o exame de array-CGH na tentativa de identificarmos perdas ou ganhos de segmentos cromossômicos sub-microscópicos abaixo da resolução do bandeamento G (4 a 10Mb) contendo genes ligados à SR, e que não podem ser triados por eletroforese vertical ou cromatografia líquida. Os pacientes selecionados para a pesquisa de rearranjos cromossômicos apresentam cariótipo normal e sinais adicionais associadas à aplasia mülleriana.

Os exames laboratoriais dos 14 pacientes foram realizados pelas Dras. Carla Rosenberg e Ana Cristina Krepischi Santos (Laboratório de Genética Humana do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB-USP).

Baseando-se no tipo de defeito mülleriano que apresentavam, as pacientes selecionadas podem ser reunidas em quatro tipos:

- I. Propósitas com o quadro clínico típico da SR (SR tipo A), sem defeitos extra-genitais (Casos nº 7, 10 e 18)
- II. Propósitas que com SR tipo B, apresentando outros defeitos (Casos nº 2, 5, 9, 15, 16, 19 e 20)
- III. Propósitas portadoras de defeitos müllerianos afim à SR (Casos nº 1, 3 e 28)
- IV. Paciente com SR tipo B ou associação MURCS (Caso nº 17)

A lista sumária das propósitas testadas e os resultados desses testes se encontram descritas na Tabela 7. Consideramos como alterações ganhos e perdas de segmentos cromossômicos não previamente descritos em indivíduos normais, documentado no Banco de Dados de Variantes Genômicas (DGV - Database of Genomic Variants - <http://projects.tcag.ca/variation/>)

Reg. USP	Paciente	Fenótipo	Array-CGH
16936	Caso n° 1	Mü	normal
15935	Caso n° 2	SR-B	alterado
8891	Caso n° 3	Mü	normal
13165	Caso n° 5	SR-B	normal
14779	Caso n° 7	SR-A	normal
10219	Caso n° 9	SR-B	normal
8100	Caso n° 10	SR-A	normal
16982	Caso n° 15	SR-B	alterado
16983	Caso n° 16	SR-B	alterado
15205	Caso n° 17	SR-B	normal
16516	Caso n° 18	SR-A	normal
8575	Caso n° 19	SR-B	alterado
16930	Caso n° 20	SR-B	normal
16850-E	Caso n° 28	Mü	alterado

Tabela 7 - Resultado das 14 propósitas analisadas por array-CGH.

Com o uso da técnica de array-CGH foi possível identificar que cinco das quatorze pacientes (35%) possuíam alterações cromossômicas sub-microscópicas não descritas anteriormente e possivelmente patogênicas, compreendendo as regiões cromossômicas 1q21.1, 17q12, 22q11.21 e Xq21.31.

A descrição clínica de cada propósita com o tipo de alteração (deleção ou duplicação), a localização cromossômica, o nome da sonda, o tamanho máximo e mínimo do segmento envolvido e o tipo de herança estão sumarizados na Tabela 8.

Paciente e descrição fenotípica	Características das alterações identificadas		
	Tipo de aberração	Extensão da aberração	Origem parental
Caso 1: 16 anos de idade, útero e ovários normais, vagina estreita em fundo cego e estenose do terço médio, hematometrio e hematocolpos.	dup19q13.11	~1 Mb	de novo
Caso 20: 24 anos de idade, agenesia completa de útero e vagina, ovário direito ectópico e o esquerdo não visualizado, ptose renal bilateral com falha bilateral da rotação, rim direito septado e com duplicação pielo-calicial, ambos os rins sem diferenciação córtico-medular, luxação congênita de quadril e hérnia inguinal.	dup16q22	~1 Mb	de novo
Caso 16: 3 anos de idade, agenesia útero-vaginal, fusão de lábios genitais e sindactilia parcial do 2 ^{do} e 3 ^{ro} pododáctilos e ovários não detectados a ultrasonografia.	dup1q21.1 dup22q11.22	3.5 Mb ~1 Mb	ambos herdados da mãe normal
Caso 15: 16 anos de idade, agenesia vaginal e útero rudimentar (em fita), rim direito ausente, RM leve, dificuldades de aprendizado (leve-moderado), face alargada, nariz proeminente com base retangular, filtro nasal curto e palato alto, membros alongados, ectasia discreta de arco aórtico, escoliose dorso/lombar e hipotireoidismo.	del22q11.21	2.5 Mb	de novo
Caso 19: 45 anos de idade, ausência completa de útero e canal vaginal, RM moderado, crises convulsivas, assimetria facial discreta, nistagmo horizontal, ligeiro desvio de septo nasal e mandíbula à direita, palato alto, membros longos, com mãos e pés grandes e delgados e oncodistrofia.	del17q12	1.8 Mb	de novo
Caso 28: 53 anos de idade, útero hipoplásico em anteversão, ausência de rim esquerdo, menstruação irregular e defeitos de vértebras cervicais.	dup17q21.31	0.2–1 Mb	desconhecido pais não disponíveis
Caso 2: 32 anos de idade, ausência completa de útero e do terço superior da vagina, deformidade de Sprengel, pescoço curto com limitação dos movimentos laterais, implantação baixa do cabelo na nuca, orelhas com rotação incompleta, palato alto, déficit auditivo moderado-severo à direita, braquidactilia discreta nos membros superiores.	del Xq21.31	1 Mb	desconhecido pais não disponíveis

Tabela 8: Descrição fenotípica das pacientes com alterações sub-microscópicas detectadas por array-CGH. Mostra-se o tipo de alteração (dup. = duplicação, del. = deleção), a localização cromossômica, o tamanho em megabases (Mb) e o modo de herança. (CNV = considerado variação normal no número de cópias pelo DGV). [Ensemble release 48 - Dezembro de 2007]

IV.5.a - Paciente nº 16

A paciente apresenta duas duplicações, uma localizada em 1q21.1 e a outra em 22q11.21. Ambas as alterações foram herdadas da mãe, fenotipicamente normal. O pai e a irmã também foram testados com resultado normal.

A duplicação 1q21.1 (Fig. 25) detectada na paciente 16 se estende por ~3.5Mb e contém pequenos segmentos cromossômicos dispersos na área, os que foram previamente descritos como variação normal em DGV. Entretanto, variações polimórficas não foram descritas na região distal da duplicação, a qual abrange as regiões de micro-deleção/micro-duplicação recorrentes [www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html] e a área de susceptibilidade para a síndrome TAR (thrombocytopenia-absent-radius; OMIM #27400).

Os afetados pela a síndrome TAR apresentam trombocitopenia ao nascimento com ausência de bilateral de rádio e, em menor frequência, encurtamento ou ausência do úmero; estes sinais são muito mais graves que a sindactilia do 2º e 3º dígito do pé apresentada pela paciente 16. Mas a região 1q21 se encontra duplicada nela, sendo que se encontra deletada nos pacientes TAR.

O estudo com 30 afetados pela síndrome TAR realizado por Klopocki e col. (2007) revelou a existência de deleções de tamanho variável na região 1q21.1, incluindo a área em comum de 200Kb que esta duplicada na nossa paciente. A semelhança do que acontece na nossa paciente, os autores descrevem que a maior parte das micro-deleções (75%) foram herdadas de um dos progenitores não afetado, o que indica que a haplo-insuficiência da região é necessária mas não suficiente para causar a síndrome TAR. Estes resultados sugerem que a herança da síndrome é complexa, e que sua expressão fenotípica requereria (pelo menos) dois alelos não homólogos, possivelmente; um freqüente (na região 1q21.1) e um outro raro (não identificado ainda).

Outra questão que não pode ser omitida é o íntimo relacionamento espacial no final da 4ª semana de vida fetal dos somitos cervicais inferiores, torácicos superiores, brotos de membros superiores e ductos de

Müller. Devido à proximidade, uma única alteração nessa época comprometeria diretamente o desenvolvimento das vértebras, costelas, escápula, membros superiores, rins e trato genital, sugerindo que estas alterações são todas associadas a problemas do desenvolvimento deste período.

A literatura registra descrições de pacientes com defeitos müllerianos e anomalias de membros (Lopez e col., 2002; Massafra e col., 2002); de duplicações em 1q12-q22 associadas à clinodactilia e genitália externa hipoplásica (Sawyer e col., 2007); como também de portadoras da síndrome de Rokitansky também afetadas pela síndrome TAR (Behera col., 2005; Griesinger e col., 2005; Klopocki e col., 2007). Esses dados sugerem a existência de um gene com penetrância incompleta ou expressividade variável (ou quiçá genes contíguos) envolvidos na determinação da ausência de útero e vagina e dos defeitos de membros, mapeando na região 1q21.1.

Nos últimos anos, com a maior acessibilidade às técnicas de cariotipagem molecular, uma quantidade crescente de artigos tem revelado a grande escala da variação no número de cópias que ocorre em indivíduos normais (Iafrate e col., 2004). Existe a possibilidade de algumas de dessas variantes consideradas não patogênicas constituírem fatores de risco para determinadas anomalias fenotípicas cujas manifestações clínicas poderiam estar sujeitas à interação com outros fatores genéticos (modificadores) e ambientais. Além do mais, torna-se cada vez mais evidente que as alterações no número de cópias não possuem sempre efeito dominante com penetrância completa.

Como fator agravante, a paciente nº16 apresenta uma alteração adicional de ~1 Mb no cromossomo 22, em sobreposição parcial com o segmento distal da região da síndrome de micro-deleção/micro-duplicação de 22q11.21 (Figura 26). Esta região se encontra parcialmente coberta por CNVs, exceto por um segmento de ~200Kb contendo vários genes. A síndrome de duplicação 22q11 é caracterizada pelo fenótipo variável, com espectro de leve a normal; no entanto defeitos de útero e canal vaginal nunca foram descritos (Ensenauer e col., 2003).

Apesar disso, ambos os segmentos duplicados na paciente 16 foram herdados de seu progenitor normal e possuem um significado incerto, resultando em dificuldades para o aconselhamento genético.

Figura 25: Esquema da abnda q21.1 do braço longo do cromossomo 1 mostrando a região onde se localiza a alteração detectada por Array-CGH na paciente 16. Outras síndromes que mapeiam na área também são mostradas. (Verde: duplicação, vermelho: deleção; Mb: megabases)

Figura 26: Esquema da região 22q11.21 mostrando a localização da segunda duplicação detectada na paciente 16. As síndromes de micro-deleção (DG/VCF) /micro-duplicação que mapeiam na área também são mostradas. (Verde: duplicação; vermelho: deleção; Mb: megabases)

IV.5.b - Paciente nº 15

Na paciente, portadora de útero rudimentar (em fita) e agenesia de canal vaginal, foi detectada uma deleção de 2.5 Mb no cromossomo 22 na região da síndrome de DG/VCF (OMIM 188400/192430). As deleções em 22q11.21 foram previamente descritas associadas a defeitos de canal útero-vaginal apenas em fetos (Devriendt e col., 1997; Le Caignec e col., 2005).

Posteriormente à identificação da deleção na paciente 15, foi realizado o mapeamento em detalhe com arrays de oligonucleotídeos da área, o qual revelou que a alteração encontra-se interrompida por um pequeno segmento cromossômico em número normal de cópias (Fig. 27). O segmento não deletado contém o gene *TBX-1*, considerado responsável pelos cinco sinais clínicos principais associados ao fenótipo da síndrome 22q11.21: CAFS (*conotruncal anomaly face*), defeitos cardíacos, hipoplasia de timo, insuficiência velo-faríngea, fissura de palato, disfunção paratireoidiana e hipocalcemia. Nossa paciente não apresenta características clínicas das deleções *TBX-1*, porém possui outros sinais clínicos frequentemente presentes na síndrome DG/VCF mas que não estão ligadas ao gene *TBX-1*: dificuldades de aprendizado, face alargada, nariz proeminente com base retangular, filtro nasal curto e palato alto, membros alongados, ectasia discreta de arco aórtico, escoliose dorso/lombar, agenesia de rim e hipotireoidismo.

Embora o pai não estivesse disponível para a análise, usando cinco marcadores polimórficos (D22S1638, D22S1648, D22S944, D22S1623 e D22S1709) foi possível determinar que o alelo deletado era de origem materna e, conseqüentemente, a deleção era de novo.

Como a deleção desta região foi considerada candidata para o quadro clínico apresentado pelas pacientes, todas as 43 propósitas da casuística foram avaliadas com os mesmos cinco marcadores do cromossomo 22 quanto a alterações na região 22q11 para determinar a existência de alterações na área, sendo que nenhum defeito foi detectado.

A.

B.

C.

D.

Figura 27 - A: Esquema da deleção identificada na paciente 15, exibindo a interrupção na região do gene *TBX-1* e a área comumente alterada em paciente com a síndrome DiGeorge/Velocardiofacial (DG/VCF) em vermelho. Outras síndromes que mapeiam na área também são mostradas. B: Perfil do array-CGH do cromossomo 22 indicando com a seta e os pontos vermelhos as sondas deletadas (XX-91C, RP11-155F20 e RP11-179H3). C: Confirmação do array-CGH mediante MLPA comparando a Paciente 15 e um controle normal. As sondas ausentes são indicadas por setas vermelhas (HIRA, CLDN5, KIAA1652, FLJ14360, PCQAP, SNAP29 e LZTR1). D: Detalhe do mapeamento fino realizado com Oligo-Arrays expondo a interrupção da deleção por um segmento não deletado (entre as barras em vermelho) que contém o gene *TBX-1*. (Mb: megabases)

IV.5.c - Paciente nº 19

Esta paciente possui uma deleção em 17q12 de ~1.8Mb (Fig. 28 e 29), que inclui a região de cistos renais e diabetes (RCAD ou também chamada MODY V; OMIM #137920). Esta síndrome é causada por mutações ou deleções em uma cópia do gene *TCF-2* (Fig. 28) que codifica o fator nuclear de hepatócitos-1-beta. O fenótipo da síndrome RCAD compreende anomalias renais com ou sem diabetes (Edghill e col., 2006). Embora a Paciente 15 possua haplo-insuficiência do *TCF-2*, não apresenta diabetes nem malformações renais. Além disso, ela tem ausência completa de útero e canal vaginal, RM moderado, crises convulsivas, e outros sinais clínicos que definitivamente não fazem parte da síndrome RCAD.

Figura 28: Alteração no cromossomo 17 na paciente 19. **A:** Esquema da região 17q12 mostrando o tamanho da deleção identificada (em megabases) com os genes contidos nela e superposição com a síndrome de cisto renal e diabetes (RCAD ou MODY V). **B:** Perfil do Array-CGH com a seta e os pontos vermelhos indicando as duas sondas (RP11-445F12 e RP11-115K3) deletadas.

Figura 29: Fotografia do FISH confirmando a deleção 17q12 detectada no array-CGH. Mostra-se a hibridização com BAC em unicamente um cromossomo 17 (seta e banda vermelhas)

Esporadicamente, anomalias do trato genital (incluindo útero rudimentar ou bicornio) foram descritas em pacientes com mutações no gene *TCF-2* (Bingham e col., 2002). Portanto, não podemos excluir a possibilidade do fenótipo da paciente ser em parte consequência da deleção deste gene. Entretanto, outros genes que mapeiam na região deletada (Fig. 28) podem ter contribuído para os defeitos descritos; particularmente o gene *LHX-1*.

Embora nenhum defeito fenotípico tenha sido descrito associado ao gene *LHX-1* em humanos (Hunter e Rhodes, 2005), os trabalhos usando fêmeas de camundongos *knockout* para o gene *lim^{-/-}* (com 99,5% de homologia com *LHX-1* segundo <http://www.genecards.org/index.shtml>) sugerem que o gene desempenha funções essenciais durante o desenvolvimento dos ductos de Müller. Os autores descreveram a ausência completa de todos os derivados dos ductos de Müller (trompas de Falópio, útero e canal vaginal) nessas fêmeas de camundongos.

Com a indicação de que desempenha funções essenciais no desenvolvimento do útero e canal vaginal, o gene *LHX-1* contido no segmento deletado em 17q12 na paciente 19, aparece como candidato para os defeitos müllerianos de nossas pacientes. Iniciamos então a pesquisa de mutações no gene em todas as 43 propósitas da casuística. A triagem foi realizada com o seqüenciamento direto das 5 regiões codificantes do gene. Os primers utilizados foram detalhados na página 33.

Uma única alteração polimórfica, previamente descrita, localizada no primeiro intron do gene *LHX-1* foi identificada na paciente 26 (IVS1+41G>T).

IV.5.d - Paciente nº 28

Esta paciente é portadora de uma duplicação localizada também no cromossomo 17, porém na banda q21, a ~8 Mb de distância da deleção descrita na paciente 19. Esta alteração se sobrepõe com a região da síndrome de micro-deleção 17q21.3 recentemente descrita (Shaw-Smith e col., 2006; Koolen e col., 2006; Sharp e col., 2006; Varela e col., 2006) e poderia representar sua duplicação recíproca (Kirchhoff, e col., 2007) (Fig. 30).

Figura 30: Esquema das alterações identificadas no cromossomo 17. Na região telomérica se encontra a duplicação (verde) da paciente 28 e o filho, parcialmente superposta com a síndrome de micro-deleção 17q21.3. A modo de referência, também se colocam na área a deleção da paciente 19, superposta com a região da síndrome de cisto renal e diabetes (RCAD). Ambas as alterações se encontram a ~8 Mb de distância.

Os defeitos apresentados pela paciente 28 podem ser considerados leves quando comparados com o fenótipo das outras propósitas incluídas na casuística, mas essas anomalias também podem ser interpretadas como componentes do espectro de defeitos müllerianos afins a SR não incapacitantes para a reprodução: ela apresenta útero funcional, hipoplásico, em ante-versão, com menarcas irregulares e agenesia renal direita. Seu filho é portador da mesma duplicação, no entanto, seu fenótipo é mais grave. O adolescente de 17 anos nasceu com hipospádia períneo-escretal, criptorquidia, bexiga neurogênica e testículo esquerdo com volume aumentado (macrorquidismo). Foi submetido à extirpação de rim direito devido à presença de cistos múltiplos, a orquipexia e correção de hipospádia. Além dos defeitos urogenitais descritos, o filho da paciente 28 apresenta também retardo mental leve-moderado, hipotireoidismo e diabetes

insulinodependente. O menino recebe suplementação hormonal para tiróide, medicação para o controle de urina e duas doses diárias de insulina.

Como observado em outras alterações cromossômicas familiares (Klopocki e col., 2007; Lopez e col., 2002), é possível que a duplicação 17q21 identificada na Paciente 28 e seu filho apresente expressividade variável.

Entre os possíveis fatores determinantes do maior impacto fenotípico observado no filho (o pai não estava disponível para testar e a irmã resultou normal), aparece uma alteração adicional detectada em 22q11.22. Esta deleção mapeia distal às alterações previamente descritas nas pacientes 15 e 16, e é citada no DGV entre indivíduos normais. Embora esta deleção adicional possa representar um polimorfismo sem significado clínico, nunca foi observada em cerca de 250 pacientes e controles normais examinados por array-CGH no nosso laboratório. Conseqüentemente, é possível que a deleção adicional (em associação com a duplicação 17q21) tenha agido como fator agravante, ocasionando um comprometimento fenotípico maior no filho da nossa paciente.

O cromossomo 22, e particularmente a banda q11, é suscetível a rearranjos cromossômicos devido ao grande número de LCRs (*Low Copy Repeats*). A recombinação entre segmentos homólogos não alélicos devido a emparelhamento desigual tem como consequência direta a deleção e duplicação recíproca dos segmentos envolvidos. Em teoria, deleções e duplicações ocorrem em igual número, porém as descrições de afetados por duplicações 22q11 são escassas (Meiss e col., 2003). As deleções na banda 22q11 originam diferentes defeitos congênitos (Ryan e col., 1997), entre eles se encontram as síndromes de DiGeorge (DGS) e velo-cárdio-facial (VCFS). Uma vez que ambas as condições são causadas pelo mesmo tipo de alterações e os portadores apresentam sinais clínicos em comum, as síndromes são conjuntamente referidas como espectro de malformações DGS/VCFS. Os sinais clínicos que apresentam os afetados por micro-duplicações 22q11 são variados, incluindo ausência total de sinais clínicos e anomalias do comportamento, até presença de múltiplos defeitos; alguns deles presentes

também em pacientes com a síndrome de deleção 22q11 (Ensenauer e col., 2003; Yobb e col., 2005).

Nossa pesquisa identificou três alterações na banda 22q11 na nossa casuística: 1) uma deleção em 22q11.21 na paciente 15; 2) uma duplicação 22q11.22 na paciente 16 e 3) no filho da paciente 28 (portadora de defeito mülleriano afim à SR, não esterilizante) foi detectada outra deleção em 22q11.23. Os três defeitos identificados são consecutivos e não se encontram superpostos (Fig. 32).

As regiões responsáveis por ambas as síndromes de micro-deleção e micro-duplicação 22q11 estão parcialmente contidos nas alterações das Pacientes 15 e 16. Mas, além de incluir esses loci, a deleção identificada na Paciente 15 se encontra adjacente da área da síndrome de Cat-eye (CES, OMIM #115470).

Sabidamente, os sinais clínicos variam amplamente entre os afetados por alterações em 22q11; o fato importante a destacar é que as malformações uterinas unicamente estão contidas no fenótipo CES, que mapeia proximalmente á DGS/VCFS. Não sabemos se isto poderia em parte explicar a presença simultânea de características fenotípicas de SR (útero em fita, agenesia de rim e escoliose) e de DGS/VCFS (face característica, mãos alongadas, hipotireoidismo, RM e ectasia discreta de arco aórtico) na nossa paciente.

Vários pontos podem ser discutidos na tentativa de elucidar a origem das diferenças fenotípicas encontradas entre duas pacientes (casos nº 15 e 16) com alterações sub-microscópicas tão próximas (Fig. 32): 1) as alterações que incluem falta de material genético têm impacto deletério maior sobre o fenótipo do portador. 2) a deleção da Paciente 15 inclui loci de duas síndromes (CES e DGS/VCFS) diferentes e bem caracterizadas. 3) a duplicação da paciente 16 inclui uma região muito menor de DGS/VCFS mas tem outra duplicação adicional em 1q21.1.

IV.5.e - Paciente nº 2

A paciente é portadora de uma deleção de 1 Mb em Xq21.31, a qual foi mapeada em detalhe por array-CGH usando lâminas *tiling-path* para o cromossomo X (Veltman e col., 2004). O segmento eliminado (Fig. 31) abrange unicamente um gene, o *KLHL-4*, o qual, por conseguinte surge como forte candidato para o fenótipo apresentado pela paciente.

Figura 31: Esquema da região Xq21 mostrando a localização da deleção detectada na paciente 2. Outros genes que mapeiam na área são ilustrados (vermelho: deleção; Mb: megabases)

Este gene, (*KLHL-4*), codifica um membro da família de proteínas Kelch, cujo produto protéico é amplamente expresso em vários tecidos fetais, incluindo língua, palato e mandíbula. No adulto, a expressão esta restrita a fibroblastos e outros sistemas, incluindo útero e rins [<http://www.genecards.org>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>]. A função deste gene é ainda desconhecida.

Em adição à haplo-insuficiência do gene *KLHL-4*, a expressão de outros genes adjacentes à alteração (*DACH-2* e *POFB-1*) pode ter sido comprometida devido a sua proximidade com o rearranjo. Em referência a estes genes que poderiam ter sido afetados pela deleção, a literatura cita descrições da rara associação entre a SR e falha ovariana prematura (Levens e col., 2005; Cramer e col., 1987), causada pelo gene *POFB-1*.

Poder-se-ia argumentar que a inativação preferencial do cromossomo X portador da deleção poderia levar à manifestação de qualquer outro gene recessivo presente no homólogo normal, mas o padrão de inativação do X de nossa paciente em linfócitos não indicou tal desvio.

Considerando-se que a deleção em Xq21.2 na paciente 2 contém um único gene, demos início à triagem de mutações em todos os exons deste utilizando a metodologia de seqüenciamento direto. As 12 regiões codificadoras do gene *KLHL-4* foram analisadas nas 43 propósitas e em seus familiares e as alterações identificadas são apresentadas a seguir na Tabela 9.

KLHL-4	90 alterações	Característica	Alteração
Exon 1 (N=1)	caso n° 32	heterozigose	c.23G>A
Intron 2-3 (N=33)	casos n° 1, 3, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 16, 17, 20, 22, 23, 27, 28, 30, 32, 34, 35, 40, 41 43 e 18 com sua sobrinha	heterozigose	IVS2+55G>A
	casos n° 2, 5, 19, 31, 37, 42, filho de caso 28, mãe de caso 10 e meia irmã de caso 18	homozigose	IVS2+55G>A
Intron 4-5 (N=5)	casos n° 8, 17, 32, 35 e mãe de caso 1	homozigose	IVS4+120G>T
Exon 5 (N=10)	casos n° 3, 10, 12, 14, 16, 21, 24, 27, 32 e gêmea de caso 10	heterozigose	c.1111G>T [#]
Intron 6-7 (N=40)	casos n° 2, 3, 5, 6, 7, 8, 15, 19, 21, 23, 27, 31, 32, 35, 41, 42, 43 e meia irmã de caso n° 18	homozigose	IVS6+86A>G
	caso n°1 e sua mãe, caso 18 e sua sobrinha, caso n° 28 e seu filho, casos n° 4, 9, 12, 13, 14, 16, 17, 20, 24, 29, 30, 33, 34, 37, 39 e 40	heterozigose	IVS6+86A>G
Exon 7 (N=41)	casos n° 2, 3, 5, 6, 7, 8, 15, 19, 21, 23, 27, 31, 32, 35, 41, 42, 43 e meia irmã de caso n° 18	homozigose	c.1479C>T [*]
	caso n°1 e sua mãe, caso 18 e sua sobrinha, caso n° 28 e seu filho, casos n° 4, 9, 12, 13, 14, 16, 17, 20, 24, 29, 30, 33, 34, 37, 38, 39 e 40	heterozigose	c.1479C>T [*]

Tabela 9 - Sumário das alterações detectadas na triagem do gene *KLHL-4* nas afetadas por SR e seus familiares. As 12 regiões codificadoras do gene foram seqüenciadas e todos os polimorfismos detectados correspondem a variações previamente descritas na literatura. [#: Alteração previamente relacionada à anquiloglossia por Braybrook e col., 2001; *: Alteração combinada com o polimorfismo IVS6+86A>G]

IV.6 - Discussão dos resultados obtidos por array-CGH

Oito alterações sub-microscópicas foram identificadas em sete afetadas pela SR (Tabela 8 e Fig. 32) entre 14 pacientes testadas (50%). Duas alterações foram afastadas, uma vez que não são patogênicas e sim variação normal em DGV (casos n° 1 e 20). Alterações adicionais foram identificadas em familiares com fenótipo normal como também em portadores

de defeitos urogenitais (mãe de caso n° 16 e filho de caso n°28, respectivamente).

A análise de familiares das afetadas permitiu determinar que duas pacientes (casos n° 15 e 19) apresentavam alterações cromossômicas *de novo*, localizadas respectivamente em 22q11.21 e 17q12. Foi possível estabelecer também que ambos os defeitos identificados na paciente 16 foram herdados da mãe portadora normal (a única avó viva não apresenta a alteração). A Paciente 2 não permitiu que seus pais fossem investigados e os genitores da paciente 28 já haviam falecido; devido a isso a origem parental desses defeitos em Xq21.31 e 17q21.3 não pôde ser determinada.

Embora seja habitual que os afetados por alterações na região 22q11 apresentem um amplo espectro de defeitos fenotípicos, a deleção identificada na paciente 15 constitui o primeiro relato de SR com aberração cromossômica incluindo a área de DGS/VCFS. A bibliografia só se refere às deleções em 22q11 e a defeitos útero-vaginais em fetos, encaminhados para exame post-mortem por serem portadores de malformações múltiplas (Devriendt e col., 1997; Le Caignec e col., 2005). Esses achados, analisados em conjunto com os de outra paciente com SR e de um familiar de afetada portador de vários defeitos urogenitais, todos com alterações na área 22q11, reforçam a hipótese da existência de um gene (ou um conjunto de genes contíguos) necessário para o perfeito o desenvolvimento embrionário dos ductos de Müller, na banda q11 do cromossomo 22.

A análise da paciente 19 mostrou uma alteração em 17q12, região previamente considerada relacionada aos defeitos urogenitais por incluir o gene *TCF-2* responsável pela síndrome de cisto renal e diabetes (RCAD). Somente o estudo detalhado da região levou à consideração de outro gene, o *LHX-1*, como fator etiológico dos defeitos apresentados pela paciente, baseando-se nos estudos do fenótipo apresentado por camundongos *knockout* (Kobayashi e col., 2003).

Do mesmo modo, os resultados dos experimentos na paciente 2 indicam que alterações do cromossomo X podem estar relacionadas a defeitos de canal útero-vaginal como já havia sido proposto e exaustivamente pesquisado desde

as décadas de 70 e 80 (De Leon e col., 1984; Gardo e col., 1971; Goldman e col., 1982; Phansey e col., 1981).

Os resultados da análise dos casos 19 (17q12) e 2 (Xq21.31) indicam que também essas regiões cromossômicas, e especialmente os genes *LHX-1* e *KLHL-4*, podem ser fortes candidatos para a etiologia dos defeitos útero-vaginais.

A alteração c.1111G>T, identificada no exon 5 do gene *KLHL-4* foi previamente estudada em portadores de palato fendido e anquiloglossia (CPX) por Braybrook e col. (2001) na Islândia. Os autores estudaram quatro gerações (um total de 187 pessoas) afetadas por CPX e apenas um dos pacientes era portador dessa alteração. Na população estudada, essa variante foi também encontrada em cromossomos normais em numa frequência baixa. Identificamos o mesmo polimorfismo na nossa casuística, porém numa frequência maior (oito casos dentre os 64 estudados). As diferentes frequências encontradas para esse polimorfismo provavelmente estão relacionadas a composição das populações pesquisadas.

Como observado na Tabela 9, a alteração c.1479C>T detectada no exon 7, foi identificada tanto em homozigose como em heterozigose e sempre seguida de uma segunda alteração polimórfica (IVS6+86A>G) localizada no intron 6-7. Embora todos os SNPs por nós identificados encontram-se descritos nos bancos de dados como variação normal, nós não podemos excluir a possibilidade de que certa combinação desses polimorfismos, como os identificados no exon 7, confirmam uma predisposição para os defeitos de útero e canal vaginal em determinadas condições ambientais. A pesquisa desses polimorfismos na população normal brasileira poderá esclarecer se esses conferem predisposição ao quadro clínico ou se há apenas uma frequência aumentada dos mesmos em nossa população.

Admitindo-se que as aberrações cromossômicas sub-microscópicas detectadas em nossas pacientes e seus familiares tenham originado as malformações nelas observadas, concluímos que esses fenótipos associados possuem penetrância incompleta e um grau variável de expressividade. Pelo

menos em duas das pessoas testadas existe a possibilidade de uma interação entre duas variações no número de cópias diferentes.

Nossos resultados indicam possíveis novas regiões cromossômicas (1q21.1, 17q, Xq21.31 e 22q11) candidatas a conter genes relacionados com a SR e condições afins (*LHX-1* e *KLHL-4*), embora exista uma crescente dificuldade para estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo quando consideramos padrões mais complicados que os dominantes simples de herança monogênica.

A hipótese pela qual a SR forma parte de um amplo padrão malformativo compreendida entre a forma leve com defeitos genitais cirurgicamente corrigíveis (útero didelfo) até a forma extrema apresentando agenesia completa de útero e vagina, ou até letal (síndrome de Potter), é reforçada pela descrição de familiares de afetadas apresentando defeitos não incapacitantes para a reprodução como os septos vaginais, agenesia renal unilateral, defeitos esqueléticos ou surdez; todos possivelmente resultado do mesmo defeito genético com expressão variável.

Apesar da disponibilidade crescente de ferramentas de cariotipagem molecular, existem situações localizadas na extremidade grave do espectro de defeitos urogenitais malformativos para as quais não existiriam um fator etiológico candidato nem correlação fenótipo-genótipo.

A propósita nº 17 (foto pág. 15) apresenta agenesia completa de útero e vagina e defeitos renais (agenesia à esquerda); acompanhado de defeitos faciais (assimetria, deficiência da implantação dentária com perda óssea alveolar na maxila e úvula bífida), defeitos cardíacos (comunicação interventricular e ectasia da raiz da aorta), ósseos e de membros (luxação congênita do quadril, agenesia de polegar direito, polegar esquerdo trifalângico sem oposição a, cifoescoliose dorsal sigmóidea, hiperlordose lombar, hemivértebra cérvico-dorsal e defeito de Klippel-Feil). Não obstante, o cariótipo dela é normal para o sexo feminino e nenhuma alteração no número de cópias foi identificada pela técnica de Array-CGH.

Figura 32: Esquema sumário de todas as alterações identificadas com a técnica de Array-CGH em 1q21.1, 17q12, 17q21.3, 22q11 e Xq21.31. As cinco propósitas e seus familiares com deleções (vermelho) ou duplicações (verde), os genes envolvidos e outras síndromes que mapeiam nas áreas são mostradas para cada um dos 4 cromossomos (Mb: megabases).

V. Conclusões finais

Embora não tenhamos conseguido identificar em nossa amostra nenhum gene patogênico ao qual pudesse ser imputada diretamente a síndrome de Rokitansky-Küster-Mayer-Hauser, afastamos definitivamente a possibilidade de algum desses genes (*RAR-G*, *RXR-A*, *WNT-4*, *LHX-1* e *KLHL-4*) estarem envolvidos na gênese do quadro.

Por meio da técnica de array-CGH aplicada a um conjunto de pacientes portadores de fenótipo mais grave, por outro lado, identificamos várias regiões cromossômicas com deleções e duplicações submicroscópicas consideradas patogênicas. Esses achados já se encontram devidamente descritos em três artigos veiculados por periódicos científicos de circulação internacional, cópias dos quais anexamos ao presente trabalho.

A alta frequência de casos afetados pela síndrome de Rokitansky e suas condições afins portadoras de variantes que, a pesar de consideradas não patogênicas, ocorrem na população com frequências muito baixas (geralmente da ordem de um pouco mais que 1%), sugere que alguns desses polimorfismos possam ter realmente alguma associação com a gênese da SR e suas condições afins. Esse assunto merece obviamente um aprofundamento.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agapitos E, Christoloudou C, 1995. Meckel Gruber syndrome associated with Rokitasky-Kuster-Hauser syndrome. *J Clin Ultrasound* 23:452-455.
- Altieri V, Caggiano S, Paniccia T, Gentile M. 1982. The Rokitansky-Küster-Hauser syndrome with chromosome XO/XX mosaicism (single pelvic kidney). *Minerva Gynecol* 34: 331-334.
- Aydos S, Tukun A, Bokesoy I, 2003. Gonadal dysgenesis and the Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome in a girl with 46,X,del(pter-q22). *Arch Gynecol Obstet* 267: 173-174.
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM, 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 1991 Jul;196(1):80-3. Erratum in: *Anal Biochem*, 198:217.
- Bau CH, Ribero CA, Ribero AS, Florez RZ, 1994. Bilateral femoral hypoplasia associated with Rokitansky sequence: another example of mesodermal malformation spectrum?. *Am J Med Genet* 49:205-206.
- Bhaya MH, Schachern P, Morizono T, Paparella MM, 1993. Potter's syndrome: a temporal bone histopathological study. *J Otolaryngol*, 22:195-9.
- Bellver-Pradas J, Cervera-Sánchez J, Boldó-Roda A, Martín-Cortés A, Ferreres-Gomez L, Serra-Serra V, Romeu-Sarrió A, 2001. Silver-Russel syndrome associated to Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome, diabetes e hirsutism. *Arch Gynecol Obstet* 265:155-157.
- Biason-Laubert A, Konrad D, Navratil F, Schoenle EJ, 2004. A WNT4 mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *New Eng J Med* 351:792-798.
- Biason-Laubert A, De Filippo G, Konrad D, Scarano G, Nazzaro A, Schoenle EJ, 2007. WNT4 deficiency - a clinical phenotype distinct from the classic Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser anomaly. *Human Reprod* 22:224-229.
- Biedel CW, Pagon RA, Zapata JO, 1984. Müllerian anomalies and renal agenesis: autosomal dominant urogenital adysplasia. *J Pediatr* 104: 861-864.
- Bingham C, Ellard S, Cole TR, Jones KE, Allen LI, Goodship JA, Goodship TH, Bakalinova-Pugh D, Russell GI, Woolf AS, Nicholls AJ, Hattersley AT, 2002. Solitary functioning kidney and diverse genital tract malformations associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Kidney Int* 61(4):1243-51.
- Bussy G, Zannino L, Navone M, 2001. Soto's syndrome and Rokitansky syndrome: a new association? Case report. *Minerva Pediatr* 53:508-509.
- Butcha RM, Viseskul C, Gilbert EF, Sarto GE, Opitz JM. 1973. Familial bilateral renal agenesis and hereditary renal adysplasia. *Z. Kinderheilk*, 115:111-129.
- Behera M, Couchman G, Walmer D, Price TM, 2005. Mullerian agenesis and thrombocytopenia absent radius syndrome: a case report and review of syndromes associated with Mullerian agenesis. *Obstet Gynecol Surv* 60:453-61.
- Buehr M, Gu S, McLaren A, 1993. Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development*, 117:273-81.

- Braybrook C, Warry G, Howell G, Arnason A, Bjornsson A, Moore GE, Ross MT, Stanier P, 2001. Identification and characterization of KLHL4, a novel human homologue of the *Drosophila* Kelch gene that maps within the X-linked cleft palate and ankyloglossia (CPX) critical region. *Genomics* 72: 128-136.
- Carter NP, Fiegler H, Piper J, 2002. Comparative analysis of comparative genomic hybridization microarray technologies: report of a workshop sponsored by the Wellcome Trust. *Cytometry* 49:43-48.
- Clément-Ziza M, Khen N, Gonzales J, Crétolle-Vastel C, Picard JY, Tullio-Pelet A, Besmond C, Munnich A, Lyonnet S, Nihoul-Fékété C, 2005. Exclusion of WNT4 as a major gene in Rokitansky-Küster-Hauser anomaly. *Am J Med Genet A* 137:98-9.
- Cramer DW, Ravnkar VA, Craighill M, Goldstein DP, Reilly R, 1987. Müllerian aplasia associated with maternal deficiency of galactose-1-phosphate uridylyl transferase. *Fertil Steril* 47:930-4.
- Cremers CW, Strübbe EH, Willemsem WN, 1995. Stapedial ankylosis in the Mayer-Rokitansky-Hauser syndrome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121: 800-803.
- De Leon FD, Herish JH, Sanfilippo JS, Schikler KN, Yen FF, 1984. Gonadal and Mullerian agenesis in a girl with 46,X,i(Xq). *Obstet Gynecol* 63S:81-83.
- Devriendt K, Moerman P, Van Schoubroeck D, Vandenberghe K, Fryns JP, 1997. Chromosome 22q11 deletion presenting as the Potter sequence. *J Med Genet* 34:423-425.
- Dreus U, Sulak O, Schenck PA, 2002. Androgens and the development of the vagina. *Biol Reprod*, 67:1353-9.
- Drummond JB, Reis FM, Boson WL, Silveira LF, Bicalho MA, De Marco L, 2007. Molecular analysis of the WNT4 gene in 6 patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Fertil Steril* (Epub ahead of print)
- Duncan PA, Shapiro LR, Stangel JJ, Klein RM, Addonizio JC, 1979. The MURCS association: Müllerian duct aplasia, renal aplasia and cervicothoracic somite dysplasia. *J Pediatr* 95:399-402.
- Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT, Smith WE, Simon-Fayard E, Alexander AA, Kulharya AS, Ketterling RP, Clark RD, Jalal SM, 2003. Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet* 73:1027-40.
- Edghill EL, Bingham C, Ellard S, Hattersley AT, 2006. Mutations in hepatocyte nuclear factor-1-beta and their related phenotypes. *J Med Genet* 43:84-90.
- Gardo S, Papp Z, Gaal J, 1971. XO/XX mosaicism in the Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Lancet* 2:1380-1381.
- Guerrier D, Mouchel T, Pasquier L, Pellerin I, 2006. The Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome (congenital absence of uterus and vagina)--phenotypic manifestations and genetic approaches. *J Negat Results Biomed*, 27;5:1.

- Goldman B, Polani PE, Daker MG, Angell RR, 1982. Clinical and cytogenetic aspects of X chromosome deletions. *Clin Genet* 21:36-52.
- Gorgojo JJ, Almodovar F, Lopez E, Donnay S, 2002. Gonadal agenesis 46,XX associated with the atypical form of Rokitansky syndrome. *Fertil Steril* 77:185-187.
- Griesinger G, Dafopoulos K, Schultze-Mosgau A, Schroder A, Felberbaum R, Diedrich K, 2005. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome associated with thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Fertil Steril* 83:452-454.
- Griffin JE, Edwards C, Madden JD, Harrod MJ, Wilson JD, 1976. Congenital absence of the vagina - the Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Ann Intern med* 85:224-236.
- Hashimoto R, 2003. Development of the human müllerian duct in the sexually undifferentiated stage. *Anat Rec Part A* 272A:514-519.
- Heikklä M, Peltoketo H, Vainio S, 2001. Wnts and the female reproductive system. *J Exp Zool* 290:616-623.
- Hunter CS e Rhodes SJ, 2005. LIM-homeodomain genes in mammalian development and human disease. *Molecular Biology Reports* 2005; 32:67-77.
- Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C, 2004. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*; 36(9):949-951.
- Jones KL, 2006. Smith's recognizable patterns of human malformation. Sixth Edition. Elsevier Saunders.
- Jost A, Magre S, 1988. Control mechanisms of testicular differentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 322:55-61.
- Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupé V, Grondona J, Chambon P, 1997. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 124, 313-326.
- Karnis M, Stelling J, Lalwani S, 2000. Mutation analysis of the HOXA 13 gene in patients with congenital absence of the uterus and vagina. *J Soc Gynecol Invest* 7 (1 suppl):172A.
- Kirchhoff M, Bisgaard AM, Duno M, Hansen FJ, Schwartz M, 2007. A 17q21.31 microduplication, reciprocal to the newly described 17q21.31 microdeletion, in a girl with severe psychomotor developmental delay and dysmorphic craniofacial features. *Eur J Med Genet*, 50:256-63.
- Klipstein S, Bhagavath B, Totipat C, Sasur L, Reindollar RH, Gray MR, 2003. The N314D polymorphism of the GALT gene is not associated with congenital absence of the uterus and vagina. *Mol Hum Reprod* 9:171-174.
- Kobayashi A, Shawlot W, Kania A, Behringer RR, 2004. Requirement of *Lim1* for female reproductive tract development. *Development* 131, 539-549.
- Kobayashi A, Kwan KM, Carroll TJ, McMahon AP, Mendelsohn CL, Behringer RR, 2005. Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *LIM1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development* 132, 2809-2823.

- Klopocki E, Schulze H, Straus G, Ott CE, Hall J, Trotier F, Fleischhauer S, Greenhalgh L, Newbury-Ecob RA, Neumann LM, Habenicht R, König R, Seemanova E, Megarbane A, Ropers HH, Ullmann R, Horn D, Mundlos S, 2007. Complex Inheritance Pattern Resembling Autosomal Recessive Inheritance Involving a Microdeletion in Thrombocytopenia-Absent Radius Syndrome. *Am J Hum Genet*, 80:232-240.
- Koolen DA, Vissers LE, Pfundt R, de Leeuw N, Knight SJ, Regan R, Kooy RF, Reyniers E, Romano C, Fichera M, Schinzel A, Baumer A, Anderlid BM, Schoumans J, Knoers NV, van Kessel AG, Sistermans EA, Veltman JA, Brunner HG, de Vries BB, 2006. A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nat Genet* 38:999-1001
- Kucheria K, Tanejá N, Kinra G, 1988. Autosomal translocation of chromosome 12q & 14q in müllerian duct failure. *Indian Med Res* 87:290-292.
- Latterie GS, Vauss N, 1991. Mullerian tract abnormalities and associated auditory defects. *J Reprod Med* 36:765-768.
- Lalwani S, Karnis M, Timmreck L e col., 2001. HOXA10 mutation analysis in women with congenital absence of the uterus and vagina. *J Soc Gynecol Invest* 8:162A.
- Le Caignec C, Boceno M, Saugier-Veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, Frebourg T, Rival JM, 2005. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridization in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet*;42:121-8.
- Levens E, Gustofson RL, Segars JH, Armstrong AY, 2005. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome and premature ovarian failure: a rare combination. *Fertil Steril* 84: Suppl 1: S425-426
- Lee JS, Ishimoto A, Yanagawa S, 1999. Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J Biol Chem* 274:21464-70.
- Loeffler J, Soelder E, Erdel M, Utermann B, Janecke A, Duba HC, Utermann G, 2003. Muellerian aplasia associated with ring chromosome 8p12q12 mosaicism. *Am J Med Gen* 116A:290-294.
- Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dollé P, Dierich A, Gorry PH, Gansmuller A, Chambon P, 1994. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I) craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 120:2723-2748.
- Lopez AG, Fryns JP, Devriendt K, 2002. MURCS association with duplicated thumb. *Clin Genet*, 61:308-9.
- Lischke JH, Curtis CH, Lamb EJ, 1973. Discordance of vaginal agenesis in monozygotic twins. *Obstet Gynecol* 41:920-923.
- Massafra C, Bartolozzi M, Bartolozzi P, Scillone L, 1988. Rokitansky-Küster-Hauser syndrome with ectrodactyly. *Acta Obstet Gynecol Scand* 67:557-60.
- Mendelsohn C, Lohnes D, Décimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, Mark M, 1994. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. (II) Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 120, 2749-2771.

- Meins M, Burfeind P, Motsch S, Trappe R, Bartmus D, Langer S, Speicher M, Muhlendyck H, Bartels I, Zoll B, 2003. Partial trisomy of chromosome 22 resulting from an interstitial duplication of 22q11.2 in a child with typical cat eye syndrome. *J Med Genet* 40:e62.
- Opitz JM, 1987. Vaginal atresia (von Mayer Rokitansky syndrome or MRK anomaly) in hereditary renal adysplasia. *Am J Med Genet* 26:863-872.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K, 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-9.
- Phansey SA, Tsai CC, Williamson HO, 1981. Vaginal agenesis in association with gonadal dysgenesis. *Obstet Gynecol* 57S:56-57.
- Passarge E, 2007. *Color Atlas of Genetics*. Third Edition. Thieme Stuttgart, New York.
- Pavanello RCM, Eigier A, Otto PA, 1988. Relationship between Mayer-Rokitansky (MRK) anomaly and hereditary renal adysplasia (HRA). *Am J Med Genet* 29:845-849.
- Petrozsoa JC, Gray MR, Davis AJ, Reindollar RH, 1997. Congenital absence of the uterus and vagina is not commonly transmitted as a dominant genetic trait: outcomes of surrogate pregnancies. *Fertil Steril* 67:387-389.
- Potter EL, 1946. Bilateral renal agenesis. *J Pediatr* 29:68.
- Potter EL, 1965. Bilateral absence of ureteres and kidneys - a report of 50 cases. *Obstet Gynecol* 25:3.
- Raybaud C, Richard O, Arzim M, David M, 2001. Mayer-Rokitansky-Kuter-Hauser syndrome: associated pathologies. *Arch Pediatr* 8:1209-1213.
- Resendes B, Sohn S, Stelling J e col., 2001. Rol for anti-Müllerian hormone in congenital absence of uterus and vagina. *Am J Med Genet* 98:129-36.
- Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca M, 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80, 1021-1054.
- Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, Oechsler H, Belohradsky B, Prieur M, Aurias A, Raymond FL, Clayton-Smith J, Hatchwell E, McKeown C, Beemer FA, Dallapiccola B, Novelli G, Hurst JA, Ignatius J, Green AJ, Winter RM, Brueton L, Brøndum-Nielsen K, Scambler PJ, 1997. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet* 34:798-804.
- Saito R, Takata N, Matsumoto N, Koide I, Fujita A, Ogura Y, Murakami M, Yanagida K, Komazawa M, 1982. Anomalies of the auditory organ in Potter's syndrome. Histopathological findings in the temporal bone. *Arch Otolaryngol*, 108:484-8.
- Sawyer JR, Binz RL, Swanson CM, Lim C, 2007. De novo proximal duplication of 1(q12q22) in a female infant with multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet A* 143A:338-342.
- Schimke RN e King CR, 1980. Hereditary urogenital adysplasia. *Clin Genet* 18:417-420.

- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaiker R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G, 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 30(12):e57.
- Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, Cheng Z, Regan R, Hurst JA, Stewart H, Price SM, Blair E, Hennekam RC, Fitzpatrick CA, Segraves R, Richmond TA, Guiver C, Albertson DG, Pinkel D, Eis PS, Schwartz S, Knight SJ, Eichler EE, 2006. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet* 38(9):1038-42.
- Shaw-Smith C, Pittman AM, Willatt L, Martin H, Rickman L, Gribble S, Curley R, Cumming S, Dunn C, Kalaitzopoulos D, Porter K, Prigmore E, Krepisch-Santos AC, Varela MC, Koiffmann CP, Lees AJ, Rosenberg C, Firth HV, de Silva R, Carter NP, 2006. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. *Nat Genet*, 38:1032-1037
- Strubbe EH, Willemsen WN, Lemmens JA, Thijn CJ, Rolland R, 1993. The Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: distinction between two forms based on urographic, sonographic and laparoscopic findings. *Am J Roetgenol* 160:331-334.
- Strubbe EH, Cremers CW, Willemsen WN, Rolland R, Thijn CJ, 1994. The Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome without and with associated features: two separate entities?. *Clin Dismorphol* 3:192-199.
- Tanejá N, Kucheria K, Kinra G. 1986. A new translocation between chromosomes 12q and 14q in two girls with müllerian duct failure. 7th Int. Cong. Hum. Genet., Berlin 105-106.
- Timmreck LS, Pan HA, Reindollar RH, Gray MR, 2003. WNT7A mutations in patients with müllerian duct abnormalities. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 16:217-221.
- Timmreck LS, Gray MR, Handelin B, Allito B, Rohlfes E, Davis AJ, Gidwani G, Reindollar RH, 2003. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in patients with congenital absence of the uterus and vagina. *Am J Med Genet* 120A:72-76.
- Turunen A, 1957. Über kongenitales Fehlen der Scheide. *Ann Chir Gynaecol Fenn* 46: 125-142. (Citado em Griffin e col., 1976)
- Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP, 1999. Female development in mammals is regulated by WNT-4 signalling. *Nature* 397:405-409.
- van Lingen BL, Gray MR, Davis AJ, Cowan JM, Reindollar RH, 1997. Physical mapping of 3p23, a region that includes a translocation breakpoint in a patient with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Am J Hum Genet* 61:A246.
- van Lingen BL, Reindollar RH, Davis AJ, Gray MR. 1998. Further evidence that the WT-1 gene does not have a role in the development of the derivatives of the müllerian duct. *Am J Obstet Gynecol* 179:597-603.
- van Lingen BL, Eccles M, Reindollar RH, e col., 1998. Molecular genetics analysis of the PAX-2 gene in patients with congenital absence of the uterus and vagina. *Fertil Steril* 70:S402.

- Veltman JA, Yntema HG, Lugtenberg D, Arts H, Briault S, Huys EH, Osoegawa K, de Jong P, Brunner HG, Geurts van Kessel A, van Bokhoven H, Schoenmakers EF, 2004. High resolution profiling of X chromosomal aberrations by array comparative genomic hybridisation. *J Med Genet* 41: 425-432.
- Varela MC, Krepischi-Santos AC, Paz JA, Knijnenburg J, Szuhai K, Rosenberg C, Koiffmann CP, 2006. A 17q21.31 microdeletion encompassing the MAPT gene in a mentally impaired patient. *Cytogenet Genome Res*, 114:89-92.
- Verp MS, Simpson JL, Elias S, Carson AS, Sarto GE, Feingold M, 1983. Heritable aspects of uterine anomalies I. Three familial aggregates with Mullerian fusion anomalies. *Fertil Steril* 40:80-85.
- Willensen WNP, 1982. Renal-skeletal-ear and facial anomalies in combination with the Mayer-Rokitansky-Küster (MRK) syndrome. *Europ J Obstet Gynec Reprod Biol* 13:229-235.
- Winer-Muram HT, Muram D, Wiltroy RA, Cupp C. 1984. The concurrence of facioauriculo vertebral spectrum and the Rokitansky syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 149:569-570.
- Winter JSD, Kohn G, Mellman WJ, Wagner S, 1968. A familial syndrome of renal, genital, and middle ear anomalies. *J. Pediat.* 72: 88-93.
- Wulfsberg EA, Grigbsy TM, 1990. Rokitansky sequence in association with the facio-auriculo-vertebral sequence: part of a mesodermal malformation spectrum? *Am J Med Genet*, 37:100-2.
- Yobb TM, Somerville MJ, Willatt L, Firth HV, Harrison K, MacKenzie J, Gallo N, Morrow BE, Shaffer LG, Babcock M, Chernos J, Bernier F, Sprysak K, Christiansen J, Haase S, Elyas B, Lilley M, Bamforth S, McDermid HE, 2005. Microduplication and triplication of 22q11.2: a highly variable syndrome. *Am J Hum Genet*, 76(5):865-76.

RECURSOS BIBLIOGRÁFICOS ON-LINE

Ensembl Genome Database

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html

Database of Chromosomal Imbalances and Phenotype in Humans using Ensembl Resources - DECIPHER

<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher>

Database of Genomic Variants - DGV

<http://projects.tcag.ca/variation/>

GeneCards

<http://www.genecards.org/index.shtml>

Online Mendelian Inheritance in Man - OMIM

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>

Online course in embryology for medicine students

Universities of Fribourg, Lausanne and Bern (Switzerland)

<http://www.embryology.ch>

Online images in embryology for students

University of North Carolina

http://www.med.unc.edu/embryo_images

VII. Anexo

VII.1 - Heredogramas das famílias das afetadas

VII.2 - Fichas de atendimento

VII.3 - Termos de livre consentimento

VII.4 - Temperaturas do dHPLC

VII.5 - Publicações

VII - ANEXO

Representação genealógica dos casos analisados. Os símbolos abaixo são válidos para todos os heredogramas que se seguem.

Caso nº1

Caso nº2

Caso nº3

Caso nº4

Caso nº5

Caso nº 6

Caso nº7

Caso nº8

Caso nº9

Caso nº10

Caso nº11

Caso nº12

Caso nº13

Caso nº15

Caso nº16

Caso nº17

Caso nº18

Caso nº19

Caso nº20

Caso nº21

Caso nº22

Caso nº 24

Caso nº25

Caso nº26

Caso nº28

Caso nº29

PROJETO: SÍNDROME DE ROKITANSKY-MAYER-KÜSTER-HAUSER E CONDIÇÕES AFINS

DATA:....../....../....REGISTRO Nº:.....MÉDICO/SERVIÇO:.....
NOME:.....
SEXO:.....IDADE:.....DATA DE NASCIMENTO:....../....../....
ETNIA: B () N () A () M () I () OCUPAÇÃO:.....
ESTADO CIVIL: SOLTEIRO/A () CASADO/A () OUTRO: ESPECIF:.....
ESCOLARIDADE: ENSINO BÁSICO () MÉDIO () SUPERIOR () ESCOLA ESPECIAL: ()
NÍVEL ATINGIDO:.....ANOS DE ESCOLARIDADE:.....
NOME DO PAI:.....
PROFISSÃO:.....IDADE:.....
NOME DA MÃE:.....
PROFISSÃO:.....IDADE:.....
ENDEREÇO:.....APTO:.....
CIDADE:.....ESTADO:.....CEP:.....
TELEFONE:.....CEL:.....

1.- GESTAÇÃO E ANTECEDENTES PERINATAIS: [S, N, ?]

PRÉ-NATAL: () MEDICAMENTOS () ANTIBIÓTICOS () INFECÇÕES () RADIAÇÃO ()
OUTRAS INTERCORRENCIAS:.....
PARTO: NORMAL () CESARIANA () PREMATURO () TERMO () APGAR: 1 min.....5 min.
CHORO ESPONT. () CIANOSE () ICTERÍCIA () SOFR. FETAL () PESO:.....kg
COMPRIMENTO:.....cm. PER.CEF:.....cm. OUTRAS:.....
IDADE DA MÃE AO NASCIMENTO:.....anos. IDADE DO PAI AO NASCIMENTO:.....anos.
OBSERVAÇÕES:.....
.....
.....

2.- EVOLUÇÃO PSICOMOTORA:

SUSTENTOU A CABEÇA:.....SENTOU SEM APOIO:.....ENGATINHOU:.....
FICOU EM PÉ:.....ANDOU SEM APOIO:.....PRIMERAS PALAVRAS:.....
FORMOU FRASES:.....OUTROS:.....

3.- HISTORIA PATOLÓGICA PREGRESSA:

INFECÇÕES () IMUNIZAÇÃO () CONVULSÕES () CIRURGIAS () ESPECIF:.....
DOENÇAS DA INFÂNCIA ().....
AMENORRÉIA PRIMARIA: () DISPAURENIA ()
TERAPIA HORMONAL: ESTRÓGENOS () PROGESTERONA () RESPONDEU ()
PUBARCA:..... TELARCA:.....ABORTOS:()ESPECIF:.....
OBSERVAÇÕES:.....
.....
.....

4.- ANTECEDENTES FAMILIARES:

CONSAGÜINIDADE () DIABETES () EPILEPSIA () RETARDO MENTAL () CARDIOPATIAS ()
INFERTILIDADE () ABORTOS () MALFORMAÇÕES () HÉRNIAS () ANOMALIAS RENAIIS ()
ANOMALIAS ESQUELÉTICAS () OUTRAS ANOMALIAS MÜLLERIANAS () ASSOCIAÇÃO MURCS ()
DÉFICIT AUDITIVO BILATERAL () UNILATERAL () ESQ. () DIR. ()
CONDUTIVO () CONGÊNITO () MISTO () INDETERMINADO ()

ESPECIF:.....
.....
.....
.....
.....

OBSERVAÇÕES:.....
.....
.....

5.- QUEIXA:

DÉFICIT AUDITIVO: UNILATERAL () DIR () ESQ () BILATERAL () DE CONDUÇÃO ()
CONGÊNITO () MISTO () INDETERMINADO (). ESPECIF:.....
DOR CERVICAL () DORSAL () LOMBAR () HÉRNIA INGUINAL () UMBILICAL ()
DOR ABDOMINAL CÍCLICA: () FREQUÊNCIA:.....dias.

6.- HEREDOGRAMA:

7.- EXAME CLÍNICO:

RESPONSÁVEL:.....
ESTATURA:.....cm. PESO:.....kg. PERÍMETRO CEFÁLICO:.....cm. DIM.....cm.
DIST. PUBE-PLANTA:.....cm. DIST. PUBE-PÉ:.....cm. PROP.CORPÓREAS CONSERVADAS: ()
TIPO CORPORAL: NORMOLÍNEO () LONGILÍNEO () BREVILÍNEO () EUNUCÓIDE ()
OBSERVAÇÕES:.....
.....
.....

7.I) CABEÇA:

ASSIMETRIA FACIAL () ESPECIF:.....
PAVILHÃO AURICULAR HIPOPLÁSICO () IMPLANTAÇÃO BAIXA DAS ORELHAS ()
PESCOÇO CURTO () IMPLANTAÇÃO BAIXA DO CABELO NA NUCA ()
PALATO ALTO/ARQUEADO () MÁ OCLUSÃO DENTAL () FOTO ()
OBSERVAÇÕES:.....
.....
.....

7.II) TÓRAX, COLUNA E ABDOME:

ANOMALIA CERVICAL () LOMBAR () DORSAL ()
ESPECIF:.....
ANOMALIA ESCAPULAR DE SPRENGEL () ASSIMETRIA ESCAPULAR () KLIPPEL-FEIL ()
ESCOLIOSE () LORDOSE () CIFOSE () DESVIO ()
ESPECIF:.....
USO DE COLETE ORTOPÉDICO ()
OBSERVAÇÕES:.....
.....
.....

7.III) MEMBROS:

SINDACTILIA () CLINODACTILIA () ESPECIF:.....
OBSERVAÇÕES:.....
.....
.....

8.- EXAME GINECOLÓGICO:

RESPONSÁVEL:.....
MAMAS ESTÁGIO.....TANNER CARACT. SEX. SECUNDÁRIOS: INFANTIL ()
PILIFICAÇÃO PUBIANA: ESTÁGIO....TANNER. ÚTERO E ANEXOS APALPADOS: ()
VAGINA EM FUNDO CEGO () PROFUNDIDADE VAGINAL:...cm. NEO-VAGINA: ()
OBSERVAÇÕES:.....
.....
.....

9.- OUTROS EXAMES REALIZADOS:

9.I) RAIOS-X ()

COSTELAS BÍFIDAS () FUNDIDA () ESPECIF:.....
VÉRTEBRAS: FUNDIDA () HEMIVÉRTEBRA () ESPECIF:.....
RÁDIO: DISPLASIA () HIPOPLASIA () AUSÊNCIA () UNILATERAL () BILATERAL ()
DEDOS ANORMAIS () ESPECIF:.....
CARPO: AUSENCIA () HIPOPLASIA () ESPECIF:.....
FALANGES: CURTAS () COMPRIDAS () HIPOPLASIA () ESPECIF:.....
FÉMUR: DISPLASIA () HIPOPLASIA () AUSENTE () UNILATERAL () BILATERAL ()

9.II) DOSAGENS HORMONAIS ()

9.III) CITOGENÉTICO () MOLECULAR ()

OBSERVAÇÕES - RESULTADOS:.....
.....
.....

10.- EXAME ULTRASSONOGRÁFICO:

10.I) ÚTERO:

MEDIDAS:.....X.....X.....cm. SEPTADO: TOTAL () PARCIAL ()
TOPOGRAFIA NORMAL () BICÓRNEO: UNICOLIS () BICOLIS ()
ANTEVERSÃO () RETROVERSÃO () HIPOPLÁSICO () DESVIADO ()
MALFORMADO () RUDIMENTAR () BIPARTIDO ()
AGENESIA () ECO ENDOMETRIAL: () ARQUEADO () DIDELFO ()
OBSERVAÇÕES:.....
.....
.....

10.II) VAGINA:

PROFUNDIDADE:.....cm. FUNDO CEGO () AGENESIA () ATRESIA ()
OBSERVAÇÕES:.....
.....
.....

10.III) TROMPAS:

ANORMAIS () SIMÉTRICAS () DISPLÁSICAS () RUDIMENTAIS ()
CLASSIF. STRUBBE: TIPO I () TIPO II ()
OBSERVAÇÕES:.....
.....
.....

10.IV) OVÁRIOS:

MEDIDAS DIR:.....X.....X.....cm. MEDIDAS ESQ:.....X.....X.....cm.
TOPOGRAFIA NORMAL: () PRESENÇA DE FORMAÇÃO POLICÍSTICA: ()
OBSERVAÇÕES:.....
.....
.....

10.V) RINS:

DIREITO:X.....X.....cm.

NORMAL () AGENESIA () DISPLASIA () ECTOPIA () PÉLVICO () SIGMÓIDE ()
TOPOGRAFÍA ANORMAL () CONTORNO ANORMAL () SISTEMA PIELO-CALICIAL ANORMAL ()
DUPLICIDADE PIELO-URETERAL () TRÁNSITO URETERAL LIVRE ()

ESQUERDO:X.....X.....cm.

NORMAL () AGENESIA () DISPLASIA () ECTOPIA () PÉLVICO () SIGMÓIDE ()
TOPOGRAFÍA ANORMAL () CONTORNO ANORMAL () SISTEMA PIELO-CALICIAL ANORMAL ()
DUPLICIDADE PIELO-URETERAL () TRÁNSITO URETERAL LIVRE ()

OBSERVAÇÕES:.....
.....
.....

CONCLUSÃO:.....
.....
.....
.....
.....

DIAGNÓSTICO.....
.....
.....
.....
.....

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (maiores de 18 anos)

ESTUDO: ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO E MOLECULAR DA SÍNDROME DE ROKITANSKY-MAYER-KÜSTER-HAUSER E CONDIÇÕES AFINS

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo, então leia atentamente e caso tenha dúvidas, vá esclarece-las (se não souber ler, eu leio para você). Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início a pesquisa.

Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você ou sua família.

Eu,.....(nome), residente e domiciliado na..... e portador da Cédula de identidade, RG nº, nascido(a) em / / , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do “Estudo Genético-Clínico e molecular da Síndrome de Rokitansky-Mayer-Küster-Hauser e condições afins”. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas da doença denominada Síndrome de Rokitansky-Mayer-Küster-Hauser e outras condições afins.
- II) Será feita uma coleta de 10ml. de sangue.
- III) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará meu tratamento; não vai me curar; não vai me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta.
- IV) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não terá custo algum para mim.
- V) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

- VI) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VIII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa

☐ Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

☐ Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

IX) Observações Complementares.

São Paulo, de de 2004

☐ Paciente / ☐ Responsável _____

Testemunha 1 : _____

Nome
RG
Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome
RG
Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

Dr. RESPONSÁVEL

Telefone para contato: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO:

ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO E MOLECULAR DA SÍNDROME DE ROKITANSKY-MAYER-KÜSTER-HAUSER E CONDIÇÕES AFINS

Seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo, então leia atentamente e caso tenha dúvidas, vá esclarece-las (se não souber ler, eu leio para você). Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início a pesquisa. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você nem ao seu (sua) filho(a), ou sua família.

Eu,.....(nome), residente e domiciliado na..... e portador da Cédula de identidade, RG nº , nascido(a) em / / , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a) nascido(a) em / / , seja voluntário no “Estudo Genético-Clínico e molecular da Síndrome de Rokitansky-Mayer-Küster-Hauser e condições afins”.

Esclareço que obtive todas informações necessárias e fui esclarecido(a) de todas as dúvidas apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas da doença denominada Síndrome de Rokitansky-Mayer-Küster-Hauser e outras condições afins.
- II) Será feita uma coleta de 10ml. de sangue.
- III) Essas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciará no tratamento de meu (minha) filho(a); não vai curá-lo(a); não causará nenhum problema, exceto a dor da picadinha da agulha no local da coleta;
- IV) A participação neste projeto não tem objetivo de se submeter a um tratamento terapêutico e será sem custo algum para mim;

- V) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VI) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu (minha) filho(a), e sem que venha interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu filho sejam mencionados;
- VIII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa

() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

IX) Observações Complementares.

São Paulo, de de 2004

() Paciente / () Responsável _____

Testemunha 1 : _____

Nome
RG
Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome
RG
Telefone

Responsável pelo Projeto: _____
Dr. RESPONSÁVEL

Telefone para contato: _____

VII Anexo

A continuação se listam as temperaturas usadas para triagem dos genes *RAR-G*, *RXR-A*, *WNT-4* e *LHX-1* com a técnica de dHPLC.

Gene\exon	temperaturas (°C)			
	1°	2°	3°	4°
=====				
RAR-G				
exon 1	58	64	65,2	-
exon 2	62	64	-	-
exon 3	61	62,5	-	-
exon 4	61,5	62,5	-	-
exon 5	60	62,5	63	63,5
exon 6	62,5	64	-	-
exon 7	59	62	64	-
exon 8	59	61	63,5	64

Gene\exon	temperaturas (°C)			
	1°	2°	3°	4°
=====				
RXR-A				
exon 1	61	65	-	-
exon 2	64,5	-	-	-
exon 3	63,5	64,5	-	-
exon 4	64	65	66	-
exon 5	63	64	-	-
exon 6	62,5	65,5	-	-
exon 7	63	64	-	-
exon 8	63	64	64,5	-
exon 9	61	62	-	-

Gene\exon	temperaturas (°C)			
	1°	2°	3°	4°
=====				
WNT-4				
exon 1	68	70	71	-
exon 2	63	65	-	-
exon 3	62	65	-	-
exon 4	63,5	-	-	-
exon 5A	62,5	64	-	-
exon 5B	58	62	65	-

Gene\exon	temperaturas (°C)			
	1°	2°	3°	4°
=====				
LHX-1				
exon 1	60	62,5	-	-
exon 2	61	64,5	-	-
exon 3	63,5	64,5	65,5	-
exon 4	66	67	-	-
exon 5	54	65	66	-
=====				

Research Letter

Report of a del22q11 in a Patient With Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) Anomaly and Exclusion of *WNT-4*, *RAR-gamma*, and *RXR-alpha* as Major Genes Determining MRKH Anomaly in a Study of 25 Affected Women

Carola Cheroki,¹ Ana Cristina Krepschi-Santos,¹ Carla Rosenberg,¹ Fernanda Sarquis Jehee,¹ Regina Célia Mingroni-Netto,¹ Ivo Pavanello Filho,² Sebastião Zanforlin Filho,³ Chong Ae Kim,⁴ Vicente R. Bagnoli,⁴ Berenice B. Mendonça,⁴ Karoly Szuhai,⁵ and Paulo A. Otto^{1*}

¹Department of Genetics and Evolutionary Biology, Human Genome Research Center (CEGH/CEPID/FAPESP), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP, Brazil

²Medical Center Bela Vista, SP, Brazil

³CETRUS, Centro de Treinamento em Ultra-sonografia, de São Paulo, SP, Brazil

⁴Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP, Brazil

⁵Department of Human and Clinical Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

Received 21 September 2005; Accepted 15 March 2006

How to cite this article: Cheroki C, Krepschi-Santos AC, Rosenberg C, Jehee FS, Mingroni-Netto RC, Filho IP, Filho SZ, Kim CA, Bagnoli VR, Mendonça BB, Szuhai K, Otto PA. 2006. Report of a del22q11 in a patient with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) anomaly and exclusion of *WNT-4*, *RAR-gamma*, and *RXR-alpha* as major genes determining MRKH anomaly in a study of 25 affected women. *Am J Med Genet Part A* 140A:1339–1342.

To the Editor:

Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome, comprising utero-vaginal atresia in otherwise phenotypically normal women with a normal karyotype (46,XX), has an incidence of about 1/5,000 among newborn girls. Anomalies of the genital tract range from upper vaginal atresia to total Müllerian agenesis (congenital absence of the Fallopian tubes, uterus, and upper vagina). Since the development of the urinary tract takes place concomitantly with the Müllerian ducts, affected women frequently also have renal anomalies. Skeletal and auditory defects are also frequently found, while other associations are rare.

Mendelsohn et al. [1994] and Kastner et al. [1997] described MRKH-like defects in mice with mutations in the genes controlling the synthesis of retinoic acid receptors (*RXR* and *RAR*). In humans, the gene for the *RAR-gamma* receptor is located in 12q; Kucheria et al. [1988] described two unrelated girls with Müllerian duct agenesis who carried an autosomal translocation (12;14)(q14;q31) involving the same region. Recently, Bason-Laubert et al. [2004] described a mutation in the *WNT-4* gene in a woman with Müllerian agenesis and a mild degree of

virilization, a finding not associated with the MRKH phenotype.

We studied 25 women with the MRKH defect. The affected women also had vertebral (7/25) and other skeletal defects (6/25) including Klippel-Feil and Sprengel anomalies, clinodactyly, brachydactyly, and syndactyly of digits and congenital hip dislocation. Kidney defects (10/25), cardiac anomalies (2/25), and hearing impairment (2/25) were also found. All patients had a normal 46,XX karyotype and were normal as to the *RAR-gamma*, *RXR-alpha*, and *WNT-4* genes. The study included clinical and ultrasonographic examination of the urogenital system and radiographs of the vertebral column. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) was performed

Grant sponsor: FAPESP (CEGH/CEPID/FAPESP); Grant sponsor: CNPq; Grant number: 153126/2005-0; Grant sponsor: CAPES.

*Correspondence to: Paulo A. Otto, M.D., Ph.D., Department of Genetics and Evolutionary Biology, Human Genome Research Center (CEGH/CEPID/FAPESP), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 11461, 05422-970 São Paulo, SP, Brazil.

E-mail: otto@usp.br

DOI 10.1002/ajmg.a.31254

as the mutation screening method in PCR products of the *RAR-gamma*, *RXR-alpha*, and *WNT-4* genes. Amplicons that showed altered bands by SSCP analysis were sequenced (MegaBace™), allowing the identification of the following single nucleotide polymorphisms (SNP) previously described: in the *RAR-G* gene a C>T substitution at 7–8 intron zone

(IVS 7+21C>T) in two patients and one relative, and a C>T substitution in exon 8 in six patients (c.1280C>T). For the *WNT-4* gene, base substitutions were also detected in two patients in exon 5 (c.1026C>T). No obviously pathogenic mutation was detected in any of the three genes investigated. The recent report of Clément-Ziza et al. [2005],

FIG. 1. Deletion found in our MBS1 patient, as compared to the maximum region size of the 22q11 deletion thus far reported in the DGS/VCFs showing the mapping of the MLPA probes we used and the location of other genes known to be in the region. The deleted (-), present (+) and unknown (?) regions found in our patient are indicated at the table's last column. The critical regions for DeGeorge syndrome (DGS) and cat eye syndrome (CECS) are also shown.

excluding the *WNT-4* gene as a major gene in determining the MRKH anomaly, is thus fully confirmed by the results here presented.

Five of our patients, with more complex phenotypes (genital, renal, cardiac, and skeletal defects), were selected for comparative genomic hybridization microarrays (array-CGH). Slides containing triplicates of ~3,500 large insert clones spaced at ~1 Mb density over the full genome were produced in the Leiden University Medical Center. The large insert clones set used to produce these arrays was provided by the Wellcome Trust Sanger Institute (UK); information on the contents of the full set is available at the Wellcome Trust Sanger Institute mapping database site, Ensembl (<http://www.ensembl.org/>). In one of these five patients (Fig. 2), microarrays detected a large deletion (~4 Mb in size) at 22q11, which was confirmed and further mapped by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) using the SALSA P023 DiGeorge MLPA kit (Fig. 1), kindly donated by MRC-Holland (Amsterdam, Netherlands), and was used according to the manufacturer's instructions [Schouten et al., 2002]. All probes included in the SALSA P023 DiGeorge kit are described at www.mrc-holland.com. Using five DNA polymorphic markers (D22S1638, D22S1648, D22S944, D22S1623, and D22S1709), we showed that the patient's mother does not carry the deletion. The father was not available for investigation, but the remaining normal five alleles in the patient were not shared by her mother, showing that the *de novo* deletion was maternally derived. She had a rudimentary uterus and vaginal agenesis with normal secondary sexual characteristics, and (17y4mo at examination) mild to moderate learning disabilities, and signs suggestive of 22q11 phenotype including minor craniofacial anomalies (long face, prominent nose, short philtrum, and high palate), slender hands, slight dorso-lumbar scoliosis, and a slight increase of the aortic arch. She was under treatment for hypothyroidism due to Hashimoto's thyroiditis, also present in her otherwise normal older sister. At examination, the patient's height was 161 cm, weight 54 kg, and OFC was 54 cm. A cerebral MRI examination showed minor lesions of white matter, secondary perhaps to ischemic lesions (the patient was born with severe Rh incompatibility problems that required complete blood exchanges 5 days after birth).

Deletions in chromosome 22q11 cause different congenital defects [Ryan et al., 1997]. DiGeorge syndrome (DGS) and velocardiofacial syndrome (VCFS) are the most common congenital anomalies associated with del22q11. Since both conditions are caused by the same deletion, they are often referred to as the DGS/VCFS syndrome. The most common deletion is 3 Mb in size, found in about 90% of the patients. Among patients with this deletion, 7% present a 1.5 Mb deletion; just a few have smaller

Fig. 2. Facial features of the patient with the 22q11 deletion.

deletions, unbalanced translocations or no detectable abnormalities in the region 22q11 [Edelmann et al., 1999]. Although the corresponding phenotype is highly variable, there exists no apparent correlation between the deletion size and the phenotype manifestations.

The deletion found in our patient includes loci responsible for DGS/VCFS. Uterus anomalies are known to occur only in the 'cat-eye' syndrome, located at ~0.6 Mb distance from the deletion zone. To our knowledge, this is the first report of a patient with MRKH anomaly and a deletion in the DGS/VCFS region, if we do not consider as such one case of uterus anomalies previously reported in this region [Devriendt et al., 1997]: a 19-week female fetus with Potter sequence, MRKH anomaly and a 22q11 deletion inherited from the father, with VCFS, but without urological anomalies.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from FAPESP (CEGH/CEPID/FAPESP), CNPq (Grant no. 133126/2003-0), and CAPES. We thank Drs. John M. Opitz and Maria Rita Passos-Bueno for their many helpful suggestions and corrections.

REFERENCES

- Bisson-Lauber A, Konrad D, Nawroth F, Schoenle E. 2004. A *WNT-4* mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *New Eng J Med* 351:792-798.
- Clément-Ziza M, Khen N, Gonzales J, Cretolle-Vastel C, Picard J, Tullio-Pellet A, Besmond C, Munnich A, Lyonnet S, Nihoul-Fékété C. 2005. Exclusion of *WNT4* gene as the major gene in

- Rokitansky-Kuster-Hausen anomaly. *Am J Med Genet Part A* 137A:98–99.
- Dewirandt K, Moerman P, Van Schoonebeck D, Vandenbergh K, Fyfe JP. 1997. Chromosome 22q11 deletion presenting as the Potter sequence. *J Med Genet* 34:423–425.
- Eddmann L, Pandita RK, Spitzer E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RSK, Magenis E, Shprintzen RJ, Morow BE. 1999. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Molec Genet* 8:1157–1167.
- Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezd W, Dupé V, Gaudon J, Chambon P. 1997. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 124, 313–326.
- Kucheta K, Taneja N, Kinra G. 1988. Autosomal translocation of chromosome 12q & 14q in Millerian duct failure. *Indian Med Res* 87:290–292.
- Mendelsohn C, Löhnes D, Décimo D, Iufkin T, LeMear M, Chambon P, Mark M. 1994. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. (II) Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 120:2749–2771.
- Ryan AK, Goodship JA, Wilson DJ, Philip N, Levy A, Seidel H, Schaffhausen BS, Oechsler H, Bednarsky B, Pless M, Axtas A, Raymond FI, Clayton-Smith J, Hatchwell E, McKeown C, Beemer FA, Dallapiccola B, Novelli G, Hurst JA, Ignatius J, Green AJ, Winter RM, Brunton L, Brondum-Nielsen K, Scambler PJ. 1997. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: A European collaborative study. *J Med Genet* 34:798–804.
- Schouten JP, McElgarm CJ, Waayer R, Zwaanenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:e57.

Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations

A.C.V. Krepisch-Santos^a A.M. Vianna-Morgante^a F.S. Jehee^a
M.R. Passos-Bueno^a J. Knijnenburg^b K. Szuhai^b W. Sloos^b J.F. Mazzeu^{a,c}
F. Kok^{a,c} C. Cheroki^a P.A. Otto^a R.C. Mingroni-Netto^a M. Varela^a
C. Koiffmann^a C.A. Kim^d D.R. Bertola^d P.L. Pearson^a C. Rosenberg^a

^aDepartment of Genetics and Evolutionary Biology, University of São Paulo, São Paulo (Brazil)

^bDepartment of Molecular Cell Biology, Leiden University Medical Center, Leiden (The Netherlands)

^cDepartment of Neurology, Hospital das Clínicas, and ^dGenetics Unit, Department of Pediatrics, Instituto da Criança, University of São Paulo, São Paulo (Brazil); ^eRobinson Syndrome Foundation, Anoka, MN (USA)

Manuscript received 15 May 2006; accepted in revised form for publication by A. Geurts van Kessel, 25 May 2006.

Abstract. We report array-CGH screening of 95 syndromic patients with normal G-banded karyotypes and at least one of the following features: mental retardation, heart defects, deafness, obesity, craniofacial dysmorphisms or urogenital tract malformations. Chromosome imbalances not previously detected in normal controls were found in 30 patients (31%) and at least 16 of them (17%) seem to be causally related to the abnormal phenotypes. Eight of the causative imbalances had not been described previously and pointed to new chromosome regions and candidate genes for specific phenotypes, including a connective tissue disease locus on 2p16.3, another for obesity on 7q22.1→q22.3, and a candidate gene for the 3q29 deletion syndrome manifestation. The other causative alterations had already been associated with well-defined phenotypes including Sotos syndrome, and the 1p36 and 22q11.21 microdeletion syndromes. However, the clinical features of these latter pa-

tients were either not typical or specific enough to allow diagnosis before detection of chromosome imbalances. For instance, three patients with overlapping deletions in 22q11.21 were ascertained through entirely different clinical features, i.e., heart defect, utero-vaginal aplasia, and mental retardation associated with psychotic disease. Our results demonstrate that ascertainment through whole-genome screening of syndromic patients by array-CGH leads not only to the description of new syndromes, but also to the recognition of a broader spectrum of features for already described syndromes. Furthermore, on the technical side, we have significantly reduced the amount of reagents used and costs involved in the array-CGH protocol, without evident reduction in efficiency, bringing the method more within reach of centers with limited budgets.

Copyright © 2006 S. Karger AG, Basel

In the last couple of years, it has become evident by whole-genome array-CGH screening of patients with normal G-banded karyotypes and mental retardation as the

cardinal phenotypic feature, that 13–16% present with de novo microdeletions or duplications apparently causing their phenotypes (Visser et al., 2003; Shaw-Smith et al., 2004; Tyson et al., 2005; Menten et al., 2006; Rosenberg et al., 2006). A smaller proportion of patients (5–10%) carried alterations not previously described in normal individuals but which were also present in their phenotypically normal parents, and the significance of such imbalances is still unclear. Copy number variation of large genomic segments has recently been described in normal individuals (Iafrate et al.,

Request reprints from Carla Rosenberg, PhD
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva
Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo, C.P. 11461
05422-970 São Paulo, SP (Brazil)
telephone: +55 11 3091 7591; fax: +55 11 3091 7553
e-mail: carlarosenberg@uol.com.br

KARGER

Box 44, CH 3005 12 34 © 2006 S. Karger AG, Basel
E-Mail: karger@karger.ch 1424–5881/06/1154–0254\$23.50/0
www.karger.com

Accessible online at:
www.karger.com/cgr

2004; Sebat et al., 2004), and information regarding these polymorphic segments has constantly been updated in the Genome Variation Database (<http://projects.icag.ca/variation>). It remains to be determined which proportion of the inherited imbalances represent polymorphisms, and which proportion is causally related to the abnormal phenotypes through more complex mechanisms of manifestation (incomplete penetrance, variable expressivity, uncovering of recessive mutations or genomic imprinting).

Because of the limited number of patients initially described (~400) (Visser et al., 2003; Shaw-Smith et al., 2004; Schoumans et al., 2005; Tyson et al., 2005; Menten et al., 2006; Rosenberg et al., 2006), copy number alterations detected by array-CGH appeared to be distributed randomly across the genome. More recently a pattern of recurrent alterations has begun to emerge, exemplified by the 3q29 (Willatt et al., 2005) and 9q22 (Redon et al., 2006) microdeletion syndromes, thus expanding the category of microimbalances syndromes, such as Charcot-Marie-Tooth (MIM 118220; OMIM, <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>), Smith-Magenis (MIM 182290) and Miller-Dieker syndromes (MIM 247200). The introduction of whole-genome screening is now leading to recognition of patients with dissimilar congenital abnormalities associated with deletions or duplications of the same chromosome regions.

Here we report the results of whole-genome array-CGH screening of 95 Brazilian syndromic patients who had normal G-banded karyotypes. This study was enabled by collaboration with another academic institution that produced the arrays, namely, the Leiden University Medical Center, Netherlands. Some cost-effective changes to the standard protocol were successfully introduced without evident reduction in efficiency. Such modifications will certainly be of interest to other centers like ours with limited financial resources. Because our studies were performed mainly in collaboration with national reference centers for specific diseases, the range of congenital abnormalities represented in our sample is biased. Although most patients presented mental impairment, the primary ascertainment was most often made through other features, namely, heart defects, deafness, obesity, craniofacial dysmorphisms or urogenital tract malformations.

Materials and methods

Patient samples

All patients included in this study presented normal G-banded karyotypes but exhibited a syndromic phenotype, suggesting the presence of a chromosome alteration. These patients were part of samples of specific research/diagnostic groups at the University of São Paulo, and the need to reach a diagnosis due to their phenotype motivated the use of array-CGH to detect cryptic copy number alterations. Although not being the major or only selective criterion, almost all patients presented mental impairment. The 95 syndromic patients studied were selected and grouped according to the following criteria:

Group A (32 patients): Mental retardation and negative for fragile-X syndrome.

Group B (22 patients): Craniosynostosis, negative for mutations in the *TWIST*, *FGFR1*, *FGFR2* and *FGFR3* genes, and for deletions at *TWIST*, 9p24→p22 and 11q23 regions.

Group C (11 patients): Short stature, hypoplastic genitalia and hypotelorism (autosomal dominant Robinow syndrome features).

Group D (9 patients): Mental retardation and obesity. Five of the patients with clinical history compatible with Prader-Willy syndrome showed normal methylation pattern for the PWS region.

Group E (8 patients): Utero-vaginal aplasia with renal defects and negative for mutations in the *RARG*, *RARA*, and *WNT4* genes.

Group F (7 patients): Heart defects, negative for 22q11.21 deletions by satellite marker analysis.

Group G (6 patients): Deafness, negative for mutations in *GJB2* (35delG and 167delT screening tests and SSCP), *GJB6*(delGJB6D13S1830 and delGJB6D13S1854) and the mitochondrial A1555G mutation.

Array-CGH

The array-CGH method used has been described previously (Kuijnenburg et al., 2005; Rosenberg et al., 2006). Briefly, slides containing triplicates of ~3,500 large insert clones spaced at ~1.0 Mb density over the full genome were produced in the Leiden University Medical Center. The large insert clones set used to produce these arrays was provided by the Wellcome Trust Sanger Institute (UK), and information regarding the full set is available at the Wellcome Trust Sanger Institute mapping database site (Ensembl genome Browser: <http://www.ensembl.org/>). DNA amplification and spotting on the slides were based on published protocols (Hegler et al., 2003). Hybridisation followed procedures of the same publication, with the following modifications: we used about half of the sample DNA (200 ng) and labelling reaction than originally described, reducing 2–3-fold the amount of labelling kit, fluorochrome-conjugated nucleotides and C₃t DNA. In addition, the use of columns after random priming labelling reaction to eliminate non-incorporated nucleotides seemed unnecessary since no qualitative differences in results following the use of separated or non-separated products were observed; therefore, this step was eliminated from our protocol. After hybridisation, the slides were scanned with a GenePix Personal 4100A scanner, and the spot intensities measured using GenePix Pro 4.1 software (Axon Instruments, Westburg BV, Leusden, Netherlands). Further analyses were carried out using Microsoft Excel 2000.

Target imbalances were determined based on log₂ ratios of the average of the replicates, and sequences were considered as amplified or deleted when outside the ± 0.33 range. We considered a patient to have a potentially causative chromosome imbalance when the amplification or deletion had not been previously documented in normal controls.

Array-CGH imbalances were validated either by fluorescence in situ hybridisation (FISH) or multiple ligation probe amplification (MLPA). FISH was also used to determine if the imbalance had been inherited. FISH was performed according to standard protocols. For MLPA, the kit P036B by MRC-Holland (Amsterdam, Netherlands) was used according to manufacturer's instructions.

Table 1. Frequency of copy number imbalances detected by array-CGH in 95 syndromic patients shown according to ascertainment group (see Materials and methods)

Ascertainment group	No. of patients investigated	No. of chromosome imbalances	No. of alterations probably causative of the phenotype
A	32	12	4
B	22	4	2
C	11	3	2
D	9	2	2
E	8	4	2
F	7	3	3
G	6	1	0
Total	95	29 (30%)	15 (16%)

Results

Through array-CGH analysis we detected 29 chromosome imbalances not previously described in normal individuals (Genome Variation Database) in our sample of 95 syndromic patients. A description of the imbalances and associated phenotypes was included in the database DECIPHER (<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher>).

Table 1 summarizes the frequency of alterations found in the array-CGH screening for each ascertainment group.

Tables 2 and 3 present the clinical features of the patients carrying chromosome imbalances, as well as the maximum size, position and mode of inheritance of the chromosome alterations.

Table 2 shows the chromosome imbalances considered as probably causative of the patients' abnormal phenotypes. We considered a chromosome imbalance as probably causative of the abnormal phenotype (patients 1–15) when it overlapped an already well-described deletion/duplication region for given phenotypes (patients 1–7), when it was de

Table 2. Description of probably causative chromosome imbalances: clinical features of the patients, ascertainment group, maximum size, position and mode of inheritance of the imbalances

Patient	Clinical description	Group	Type and maximum extent of genomic imbalance	Parental origin
1	12-year-old female with developmental delay, seizures, failure to thrive, dolichocephaly, hypertelorism, midface hypoplasia, coloboma of the right iris and coroid, depressed nasal bridge, macrostomia, micrognathia, 5 th finger clinodactyly, hypoplasia of the labia minora, anteriorly displaced anus, patent ductus arteriosus and dextrocardia.	F	del 3.3 Mb at 1p36.32 (RP4-785P20)	de novo
2	13-year-old male with moderate mental retardation, low weight (<3 rd centile) and short stature (3 rd centile), microcephaly, low frontal hairline, long narrow face, myopia, large ears, narrow high-arched palate, simian palmar crease at left.	A	del 1.0 Mb at 3q29 (RP11-114F20)	de novo
3	3-year-old female with mental retardation, seizures, short stature, microcephaly, mesomelic shortening of limbs, radio-ulnar fusion, pectus excavatum, hypoplastic genitalia.	C	del 10.2 Mb at 4pter→p16.1 (GS-118-B13 – RP11-117J13) dup 8.0 Mb at 8pter→p23.1 (GS-77-L23 – CTD-2629116)	de novo den(4)t(4;8)(p16.1;p23.1)
4	3-year-old female with developmental delay, frontal bossing and receding hair implantation, narrow palpebral fissures, hypertelorism, incompletely rotated large ears, kidney agenesis at left.	E	del 2.5 Mb at 5q35 (CTB-87L24 – RP11-564G9)	de novo
5	23-year-old female with mental retardation and schizophrenia, high-set malformed ears and full cheeks.	A	del 4.0 Mb at 22q11.21 (XX-91c)	de novo
6	4-year-old male with mild developmental delay, hypocalcaemia seizures, epicanthal folds and short neck, common truncus arteriosus, multicystic kidney at left and thymus agenesis.	F	del 4.0 Mb at 22q11.21 (XX-91c)	de novo
7	17-year-old female with learning disabilities, hypothyroidism, microcephaly, long face, prominent tubular blunt nose, short philtrum, high palate, slight dorso-lumbar scoliosis, slight aortic arch ectasy, upper vaginal agenesis, very rudimentary uterus, kidney agenesis at right.	E	del 4.0 Mb at 22q11.21 (XX-91c)	de novo (Cheroki et al., 2006)
8	1-year-old male with developmental delay, short stature, hypotonia, hemiparesis at right, cleft palate, micropenis, hemivertebrae.	C	del 3.3 Mb at 1q41→q42.12 (RP11-308L13 – RP11-105I12)	de novo
9	7-year-old male with mental retardation, joint hyperextensibility with tendency to dislocation suggestive of connective tissue disease.	A	del 4.7 Mb at 2p16.3 (RP11-19A8 – RP11-335O22)	de novo
10	14-year-old female with developmental delay, mild mental retardation, abdominal obesity, hyperphagia, hypothyroidism.	D	del 2.7 Mb at 7q22.1→q22.3 (RP4-672O11 – RP11-148A10)	de novo
11	1-year-old female with developmental delay, hypotonia, weight and height <2.5 percentile, hypertelorism, atrial septal defect and patent ductus arteriosus.	F	del 15.0 Mb at 8q21.11→q21.3 (RP11-48D4 – RP5-1089C20)	N.D.
12	4-year-old female with mental retardation, episode of seizures, brachycephaly, occipital groove, facial dysmorphisms, strabismus, hypopigmented skin, atrial septal and ventricular septal defects, and persistent ductus arteriosus.	A	del 1.0 Mb at 17q21.31 (RP5-843B9)	de novo (Varela et al., 2006)
13	2-year-old male severely hypotonic with mental retardation, microcephaly, trigonocephaly, facial dysmorphisms and hypospadias (FG syndrome). Deceased at the age of 4 years due to a generalized infection.	B	dup 5.8 Mb at Xq22.3 (RP11-230E14 – RP5-820B18)	Inherited from normal mother (Jehee et al., 2005)
14	8-year-old male with developmental delay and bilateral coronal craniosynostosis.	B	del 1.1 Mb at Xq27.2 (RP11-518F7)	Inherited from normal mother
15	14-year-old male with mental retardation, dolichocephaly, obesity, hypogonadism.	D	dup ? Mb at Xq28 (RP11-402H20)	Inherited from normal mother

N.D. = Not determined.

novo in non-familial cases (patients 8–12) or when a maternally inherited alteration was located on the X chromosome in a male (patients 13–15).

Table 3 lists the patients whose chromosome imbalances could not be clearly associated with the abnormal phenotypes. These were (a) de novo alterations that were not present in a similarly affected parent or sib (patients 16–19) and were considered as non-causative for the familial phenotype; (b) imbalances inherited from a normal parent (patients 20–29). Although several mechanisms can be invoked to explain the manifestation of aberrant phenotypes in unbalanced affected children but not in their phenotypically

normal carrier parents, we are not considering such alterations as being causative at this juncture. Equally we cannot exclude this possibility.

Discussion

We report 29 chromosome imbalances in a cohort of 95 syndromic patients not previously described as polymorphisms. We considered 15 of these copy number alterations as probably causative (patients 1–15; Table 2) while the significance of the imbalances in the remaining patients (Ta-

Table 3. Description of chromosome imbalances inherited from a normal parent or not present in similarly affected relatives: clinical features of the patients, ascertainment group, maximum size, position and mode of inheritance of the imbalances

Patient	Clinical description	Group	Type and maximum extent of genomic imbalance	Parental origin
16	4-year-old female with mental retardation, hydrocephaly, severe visual impairment. Deceased at the age of 4 years (unknown cause).	A	dup 0.8 Mb at 3p25.2 (RP11-163D23)	de novo, not present in brother with mental retardation, hydrocephaly and multiple malformations
17	Infant female with acrocephaly, skull asymmetry, syndactyly.	B	dup 0.4 Mb at 3q26.33 (RP11-534H15)	de novo, not present in similarly affected mother
18	6-year-old male with short stature, hypertelorism and shawl scrotum (Aarskog syndrome).	C	dup 0.5 Mb at 5q23.3 (CTB-104P14)	de novo, not present in similarly affected father
19	16-year-old male child with learning disabilities, cryptorchidism, perineo-scrotal hypospadias, macroorchidism at left, polycystic kidneys.	E	del 3.2 Mb at 22q11.22 (RP11-50L23)	de novo, not present in mother with urogenital abnormalities
20	3-year-old female with uterovaginal atresia, genital labia fusion, undescended ovaries at US examination, syndactyly of 2 nd /3 rd toes	E	dup 4.0 Mb at 1q21.1 (RP11-315I20 – RP11-301M17)	inherited from normal mother
21	2-year-old male with severe mental retardation, hypotonia, seizures, severe visual impairment, lissencephaly, genital hypoplasia (micropenis). Alterations in ARX (mutation analyses) and MDGR (FISH) genes excluded.	A	dup 0.8 Mb at 3p25.2 (RP11-163D23)	inherited from normal mother
22	17-year-old female with mental retardation, short stature, primary amenorrhea, brachydactyly.	A	dup 2.3 Mb at 5p15.2 (RP11-44C2)	inherited from normal father
23	2.5-year-old female with poor sucking, neonatal hypotonia, severe mental retardation, microcephaly, brachycephaly, mild to moderate hearing impairment, macrostomia, club feet.	A	del 1.3 Mb at 5q21.1 (RP11-560F8)	inherited from normal mother
24	3-year-old female with mild mental retardation, severe hearing impairment, ataxic gait, short stature (<3 rd percentile), convergent strabismus, epicanthic folds, low-set ears, bifid nose, high-palate.	G	dup 1.5 Mb at 6q27 (RP3-470B24)	inherited from normal mother
25	7-year-old male with mental retardation, seizures, dysphagia, and marked motor and speech delay, thin long face, large ears with hypoplastic cartilage, high arched palate, bilateral cryptorchidism	A	dup 1.0 Mb at 9pter→p24.3 (BG-41-L13 – GS-43-N6)	inherited from normal mother
26	Infant female with developmental delay, hypoplasia of corpus callosum, hypertelorism, palpebral ptosis at left, cleft palate, inguinal herniae, duplicated left kidney, clubfeet, and hip joint dysplasia. Deceased at the age of 9 months (cardio-respiratory arrest).	A	dup 1.2 Mb at 11q22.3 (RP11-531F16)	inherited from normal father
27	5-year-old male with acrocephaly, trigonocephaly, skull asymmetry and syndactyly.	B	dup 0.5 Mb at 12q13.11 (RP3-432E18)	inherited from normal father
28	12-year-old male with developmental delay, narrow frontal bone, synophrys, frontal herniation, congenital cataract, severe visual impairment, nystagmus, small lop ears, high palate, joint hyperextensibility.	A	del 2.4 Mb at 16p13.11 (RP11-489O1 – CTD-2504F3)	inherited from normal mother
29	9-month-old male with developmental delay, lessening of white matter and enlargement of subarachnoidal space (MRI), square head with flat occipital and posterior asymmetry, prominent frontal bossing.	A	dup 3.8 Mb at Xp22.33 (RP11-457M7 – RP11-418N20)	inherited from normal father; FISH showed that the duplicated segment is translocated to Ypter both in father and child

Fig. 1. The figure shows the 3q29 deletion syndrome region and the two imbalances: The deletion in patient 2 and the duplication in a patient previously reported (Rosenberg et al., 2006). Figure based on display of the Ensembl Genome Browser.

ble 3) is still unclear. None of the patients had abnormalities detected through karyotyping or routine screening for gene mutations related to their specific clinical phenotypes. Array-CGH has provided the basis for diagnosis and genetic counselling in the informative families. However, two of these cases should have been diagnosed in the previous routine investigations: Patient 6 would not have been included among the patients with idiopathic cardiologic problems if the screening for 22q11 deletions had not missed it; in fact, the patient exhibited a typical DiGeorge phenotype. The second case involved a 15-Mb deletion of chromosome 8 (patient 11) which was well within the resolution of classical cytogenetics (400–600 bands resolution); however, sub-optimal metaphase preparations or imperfect cytogenetic analyses may lead to such errors, and large alterations (>10 Mb) first detected by microarray, and then retrospectively in G-banded preparations have been reported in most published array-CGH screens (Shaw-Smith et al., 2004; de Vries et al., 2005; Schoumans et al., 2005; Menten et al., 2006; Rosenberg et al., 2006). Table 1 suggests that the highest frequency of causative alterations in syndromic patients is found in individuals referred because of congenital heart abnormalities (group F). However, the two cases that were missed in the routine screening belonged to this group and resulted in overrepresentation of causative alterations associated with heart defects. Taking that into consideration, differences in frequencies of causative alterations observed among the clinical groups were not significant, given the small size of each sample.

The genomic alterations in individuals 1–7 have previously been associated with specific syndromes. However, the phenotypes of our patients were either not specific enough or were even atypical for these disorders, and there was insufficient reason to test them for alterations in the given chromosome regions purely on clinical grounds:

Patient 1 had an interstitial deletion fully contained in the 1p36 syndrome region (Shapira et al., 1997; Redon et al., 2005). Although she exhibited some features of this syndrome, she also showed some atypical signs such as coloboma of the right iris and coroid, dextrocardia, hypoplasia of labia minora and anteriorly displaced anus.

Patient 2 had the smallest deletion documented so far in the recently recognized 3q29 microdeletion syndrome region. Most of his clinical features (mental retardation, long face, microcephaly) are compatible with this disorder (Willatt et al., 2005), but are also common findings in many other genetic conditions. We have previously reported a duplication at 3q29 (Rosenberg et al., 2006), which is slightly distal to the 3q29 deletion in patient 2 (Fig. 1). A large gene, *DLG1* (synapse-associated protein 97), is certainly disrupted in both rearrangements. The duplication patient exhibited mental retardation, facial dysmorphism and ataxia, the latter also present in some patients with 3q29 deletion. The *DLG1* gene encodes a scaffolding protein with multiple domains, probably involved in development, and appears as a strong candidate gene for the clinical manifestations of the 3q29 syndrome (MIM 601014).

The rearrangement carried by patient 3 has been described both in Pitt-Rogers-Danks (PRDS; MIM 262350) and Wolf-Hirschhorn (WHS; MIM 194190) syndromes. Although the size of the alterations (8–10 Mb) is within cytogenetics resolution, the presence of a duplicated segment of chromosome 8 on der(4) impairs the detection of the rearrangement. In addition to PRDS typical features, the patient exhibited some clinical signs less frequent or even never reported in PRDS syndrome, such as genital hypoplasia, radioulnar synostosis and mesomelic limb shortness.

Patient 4 was primarily investigated by array-CGH because the combination of mental retardation and renal agenesis was suggestive of chromosomal imbalance. Array-

Fig. 2. De novo deletion at 5q35 from patient 4 demonstrated by array-OGH and confirmed by FISH. (A) Chromosome 5 array-OGH profile shows a deletion of three clones at 5q35. The figure also displays the relative position of the *NSD1* gene and the region commonly deleted in Sotos syndrome. (B) FISH using two of the deleted clones, CTC-286C20 (green) and RP11-564G9 (red), to metaphase chromosomes of patient 4. The signals from the two probes co-localize and are present in only one of the chromosomes 5 (arrow). The three unlabelled B-group chromosomes (chromosomes 4 and 5) are indicated by asterisks.

CGH disclosed a de novo 5q35 microdeletion (Fig. 2) encompassing the whole *NSD1* gene. Haploinsufficiency of *NSD1* is the cause of Sotos syndrome, a childhood disorder characterized by pre- and postnatal overgrowth, macrocephaly, developmental delay and typical craniofacial appearance (MIM 117550). Our patient did not present overgrowth or macrocephaly (at the age of 3 years, her weight was in the 25th centile, height in 50th centile and OFC between 25th and 50th centile). It is possible that the concomitant deletion of *NSD1* and *PRO1* (pituitary-specific homeo-domain factor, associated with deficiency of growth hormone) genes balances the overgrowth effect in our and other patients with deletions in the 5q35 region. Retrospectively, after the deletion of *NSD1* gene had been detected in

our patient, her characteristic facial gestalt of Sotos syndrome could be recognized (Fig. 3). Although renal anomalies have sporadically been reported in Sotos syndrome patients (Nagai et al., 2003; Tatton-Brown et al., 2005), this is the first case with renal agenesis.

Patients 5–7 had deletions of clone XX-91c at 22q11.21, in the velocardiofacial/DiGeorge (VCFS/DGS) syndrome region. While patient 6 had clinical features typical of DiGeorge syndrome (DGS; MIM 188400), patients 5 and 7 were unlikely to be tested for deletion in the region based only on their phenotypes. Patient 5 was referred for mental retardation and psychotic disorder and, although schizophrenia is present in ~20% of 22q11 deletion syndrome patients, this adult woman had nothing else on her medical

Fig. 3. Typical Sotos facial gestalt of patient 4 at the age of three years.

records suggestive of the syndrome. Patient 7, who was described in detail elsewhere (Cherokhi et al., 2006), was referred because of primary amenorrhea and urogenital abnormalities that were not among the described signs of VCFS/DGS.

The detection of previously described imbalances in patients whose phenotypes are not strongly suggestive of associated syndromes is not too surprising when we consider that patients without the main features of a syndrome usually are not investigated for alterations in the candidate areas. Array-CGH provides an unbiased whole-genome screening of patients with congenital abnormalities, which will probably lead to a broadening of the phenotypic criteria associated with genetic changes at given loci.

The rearrangements of patients 8, 9, 10 and 12 were considered as probably causative because they were *de novo*. We still do not know, however, how often DNA segment copy number changes upon transmission from parents to children in normal individuals, and cannot exclude that this event in some cases is unrelated to the children's abnormal phenotypes. Assuming that these imbalances are in fact causative, the corresponding chromosome regions should indicate relevant genes for the specific phenotypes. Most of these rearrangements are too large to allow pinpointing major candidate genes. However, below we discuss some genes contained in the altered chromosome regions that seem to be interesting candidates for the patients' phenotypes:

In patient 9, in spite of the large size of the alteration (3.3–4.7 Mb at 2p16.3), the *NRX1B* gene (Neurexin 1) seems to be a suitable candidate for mental impairment in the patient: it codes for a neuronal cell surface protein and seems to play a role in the formation or maintenance of synaptic junctions. In addition, this gene is probably involved in the assembling of collagen, and its deletion might be connected to the abnormalities of conjunctive tissue observed in the patient (Fallahi et al., 2005).

Patient 10 had a small deletion at 7q22.1→q22.3 (1.1–2.7 Mb) encompassing the *RELN* gene, which, when mutated in mice, causes disruption of neuronal migration in several brain regions and gives rise to function deficits such as ataxic gait and trembling. It also seems to affect neuronal migration outside the brain (Yip et al., 2000). In addition, a

mutation in the *RELN* gene has been described in three brothers with cerebral and cerebellar malformations and congenital lymphedema (Hourihane et al., 1993).

Patient 12 has a small deletion at 17q21.31, including the *MAPT* gene (microtubule-associated protein tau), for which variants are associated with late-onset neurodegenerative disorders, including Alzheimer and Parkinson-Dementia syndrome (MIM 260540). This patient is described in detail elsewhere (Varela et al., 2006).

Although the imbalances shown by patients 13–15 were inherited from their normal mothers, they were considered as possibly causative because they could behave as X-linked recessive, i.e., normal female carriers with affected male children. The large duplication at Xq22.3 in patient 13 is described elsewhere and contains a new locus for the FG syndrome (Jehee et al., 2005). The duplication carried by patient 15 is in accordance with the presence of genes associated with mental retardation, obesity and hypogonadism at Xq28. However, there is still some uncertainty regarding the precise mapping of this BAC: our FISH studies confirmed the location at Xq28 of the duplicated probe RP11-402H20 (data not shown), but another clone from our array, RP11-296N8, co-localizes with this probe and showed normal copy number in our patient, indicating that there is a problem with mapping in this region. In fact, the information in the Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/>) shows that sequencing of BAC-ends only confirmed the location of one side of RP11-402H20. According to the present mapping, this duplication is immediately distal to or may overlap the *MECP2* gene, which could be related to our patient's phenotype. However, other mental retardation genes have been described in the region, such as *GDI2*. Without a precise mapping of the alteration, the relationship of the patient's phenotype to chromosome alteration is highly speculative.

The alterations described in Table 3 were inherited from a normal carrier or were not present in other affected relatives. At this point, we have no evidence that these alterations are causative. Although other mechanisms of manifestation can be postulated to occur, such as incomplete penetrance, variable expressivity, uncovering of recessive mutations or genomic imprinting, these mechanisms combined with large segment copy number alterations detected by array-CGH so far have not been demonstrated. Genomic array is still a new tool, and the alterations with a dominant pattern of manifestation are likely to be described first. Patients 16 and 21 have duplications of the same BAC, RP11-163D23. In the first case, the alteration was not present in an affected brother; we suspect that the phenotypes of these affected sibs were not the same, and since the patient is now deceased we could not investigate the matter further. Patient 21 inherited the alteration from his normal mother. We did not uncover any additional alterations in the child that would explain his abnormal phenotype and the complete absence of any clinical phenotype in his mother. However, the presence of a never-previously described duplication in two affected individuals made us uncomfortable about whether genetic counselling should disregard the alteration

or take it into account. We trust that public databases that compile information on 'polymorphic' and pathogenic copy number alterations, such as DECIPHER (<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher>) and ECARUCA (<http://agserver01.azn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>) will allow clarification of the relevance of these inherited rearrangements and facilitate counselling in such complex cases.

Acknowledgements

The authors wish to thank the patients and their families for contributing to this study. We thank Ana Lucia Catelani, Fátima L.P.C. Baptista, Ligia S. Vieira, Maralza de Castro Sebastião, Maria R.L.S. Pinheiro and Teresa Auricchio for technical assistance.

References

- Cheroki C, Krepisch-Santos AC, Rosenberg C, Jhees FS, Mingroni-Netto BC, et al: Report of a del22q11 in a patient with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) anomaly and exclusion of WNT-4, SRS-gamma, and RFX-alpha as major genes determining MRKH anomaly in a study of 25 affected women. *Am J Med Genet A* 140:1339-1342 (2005).
- de Vries BB, Pfandt R, Leisink MA, Koolen DA, Vissers LE, et al: Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* 77: 606-616 (2005).
- Fallahi A, Kroll B, Warner LB, Oxford RJ, Irwin KM, et al: Structural model of the amino propeptide of collagen XI alpha1 chain with similarity to the LNS domains. *Protein Sci* 14:1526-1537 (2005).
- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, et al: DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 36:361-374 (2003).
- Houhans O, Bennett CP, Chaudhuri R, Robb SA, Martin ND: A sibship with a neuronal migration defect, cerebellar hypoplasia and congenital lymphedema. *Neuropediatrics* 24:43-46 (1993).
- Iafraite AJ, Feak L, Rivera MN, Litewnik ML, Donahoe DK, et al: Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36:949-951 (2004).
- Jhees FS, Rosenberg C, Krepisch-Santos AC, Kok F, Knijnenburg J, et al: An Xq22.3 duplication detected by comparative genomic hybridization microarray (array-CGH) defines a new locus (FG55) for FG syndrome. *Am J Med Genet A* 139:221-226 (2005).
- Knijnenburg J, Szukai K, Giltay J, Molenaar L, Sloos W, et al: Insights from genomic microarrays into structural chromosome rearrangements. *Am J Med Genet A* 132:36-40 (2005).
- Menten B, Maas N, Thienpont B, Boyse K, Vandesompele J, et al: Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalances in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet* 43: 625-633 (2006).
- Nagai T, Matsumoto N, Karotaki N, Harada N, Nishikawa N, et al: Sotos syndrome and haploinsufficiency of NSD1: clinical features of intragenic mutations and submicroscopic deletions. *J Med Genet* 40:285-289 (2003).
- Redon R, Rio M, Gregory SG, Cooper EA, Fiegler H, et al: Tiling path resolution mapping of constitutional 1p36 deletions by array-CGH: contiguous gene deletion or 'deletion with positional effect' syndrome? *J Med Genet* 42: 166-171 (2005).
- Redon R, Bujat G, Sanlaville D, Le Merrer M, Vekemans M, et al: Interstitial 9q22.3 microdeletion: clinical and molecular characterization of a newly recognized overgrowth syndrome. *Eur J Hum Genet* 14:759-767 (2006).
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante A, Sloos WC, et al: Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: Clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet* 43:180-186 (2006).
- Schoemans J, Raivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjöld M: Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridization (array-CGH). *J Med Genet* 42:699-705 (2005).
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, et al: Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305:525-528 (2004).
- Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FF, et al: Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet* 61:642-650 (1997).
- Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, et al: Microarray based comparative genomic hybridization (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 41:241-248 (2004).
- Tatton-Brown K, Douglas J, Coleman K, Bujat G, Cole TB, et al: Genotype-phenotype associations in Sotos syndrome: an analysis of 266 individuals with NSD1 aberrations. *Am J Hum Genet* 77:193-204 (2005).
- Tyson C, Harvard C, Locker E, Friedman JM, Langlois S, et al: Submicroscopic deletions and duplications in individuals with intellectual disability detected by array-CGH. *Am J Med Genet A* 139:173-185 (2005).
- Varda MC, Krepisch-Santos ACV, Paz JA, Knijnenburg J, Smidai K, et al: A 17q21.31 microdeletion encompassing the MAPT gene in a mentally retarded patient. *Cytogenet Genome Res* 114:89-92 (2006).
- Vissers LE, de Vries BB, Oosagawa K, Janzen IM, Feuth T, et al: Array-based comparative genomic hybridization for the genome-wide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 73:1261-1270 (2003).
- Willatt L, Cox J, Barber J, Cabanas ED, Collins A, et al: 3q29 microdeletion syndrome: clinical and molecular characterization of a new syndrome. *Am J Hum Genet* 77:154-160 (2005).
- Yip JW, Yip YP, Nakajima K, Capriotti C: Retin controls position of autonomic neurons in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8612-8616 (2000).

Original article

Genomic imbalances associated with müllerian aplasia

C Dierki,¹ A C V Krepschi Santos,¹ K Szuhai,² V Brenner,³ C A E Kim,⁴ P A Otto,¹ C Rosenberg¹

¹Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, Brazil; ²Department of Molecular Cell Biology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; ³Oxford Gene Technology, Begbroke Science Park, Oxford, UK; ⁴Genetics Unit, Department of Pediatrics, Children Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence to:
Dr C Rosenberg, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB, USP, Rua do Matão, 279, 2º andar, sala 337, 05422-970, São Paulo, SP, Brazil; carosberg@uol.com.br

CC and ADK contributed equally to this work.

Received 23 May 2007
Revised 8 November 2007
Accepted 12 November 2007
Published Online First
26 November 2007

ABSTRACT

Background: Aplasia of the müllerian ducts leads to absence of the uterine corpus, uterine cervix, and upper (superior) vagina. Patients with müllerian aplasia (MA) often exhibit additional clinical features such as renal, vertebral and cardiac defects. A number of different syndromes have been associated with MA, and in most cases its aetiology remains poorly understood.

Objective and methods: 14 syndromic patients with MA and 46,XX,G banded karyotype were screened for DNA copy number changes by ~1 Mb whole genome bacterial artificial chromosome (BAC) array based comparative genomic hybridisation (CGH). The detected alterations were validated by an independent method and further mapped by high resolution oligo arrays.

Results: Submicroscopic genomic imbalances affecting the 1q21.1, 17q12, 22q11.21, and Xq21.31 chromosome regions were detected in four probands. Presence of the alterations in the normal mother of one patient suggests incomplete penetrance and/or variable expressivity.

Conclusion: 4 of the 14 patients (29%) were found to have cryptic genomic alterations. The imbalances on 22q11.21 support recent findings by us and others that alterations in this chromosome region may result in impairment of müllerian duct development. The remaining imbalances indicate involvement of previously unknown chromosome regions in MA, and point specifically to *LMNB1* and *KLF14* as candidate genes.

Müllerian aplasia (MA) is characterised by absent or rudimentary uterus and upper vagina (müllerian derived structures) in 46,XX females with normal secondary sexual development.¹ In a proportion of women with MA (12–30%), the failure or arrest of development of the müllerian system occurs in conjunction with other developmental defects.² Renal and skeletal anomalies are the most frequently found but a range of other malformations has been reported. Simpson³ describes at least eight complex disorders which might present MA, and the patients studied by us may overlap with different entities.

Most women affected by MA are isolated cases, but descriptions of familial aggregates indicate that this trait may be transmitted as autosomal dominant with incomplete penetrance and variable expressivity.^{1,4} Chromosomal alterations⁵ and mutations in the *WNT6*⁶ gene in females with MA have been sporadically reported. It has been suggested,^{1,8} however, that the *WNT6* mutations associated phenotypes represent a separate genetic category; this proposal conforms to the lack of *WNT6* mutations in 25 females with the MRKH

anomaly studied by us.⁴ For the majority of cases, the aetiology of MA remains poorly understood.

Array based comparative genomic hybridisation (array CGH) allows ascertainment of cryptic chromosomal imbalances that escape detection by routine chromosome analysis. It provides a genome wide screening by hybridising differentially labelled test and reference DNAs to arrays consisting of thousands of genomic clones. This approach has proved useful in determining the aetiology of 15–20% of mental retardation of unknown causes,⁷ and has led to the identification of novel genes involved in malformation syndromes.⁸

We report the results of an array CGH screening in 14 women exhibiting MA and additional features, including urinary tract anomalies, cardiac and skeletal defects, hearing impairment, and mental retardation.

METHODS

Patient's ascertainment

The patients were selected for exhibiting MA, additional clinical signs and a normal G band karyotype. They were ascertained in public health services from the University of São Paulo (São Paulo, Brazil), namely the Human Genome Research Center and the School of Medicine Hospital.

Screening for genomic imbalances by 1 Mb array CGH

Genomic DNA from patients and normal individuals were hybridised to slides containing triplicate arrays of ~2500 large insert clones evenly spaced at ~1 Mb density over the full genome. The clones were provided by the Wellcome Trust Sanger Institute (UK), and are fully described in the Ensembl Genome Database. Array production, DNA labelling and hybridisation have been previously described.⁸ Target imbalances were determined based on log2 ratios of the average of the replicates, and sequences were considered as amplified or deleted when outside the + 0.33 range. Copy number variations (CNVs) that are fully contained in regions previously described as normal variants in the Database of Genomic Variants in Human Genome (DGV) were disregarded.

Validation of the chromosome imbalances detected by 1 Mb array CGH

The microdeletions and microduplications detected by array CGH were validated either by fluorescence in situ hybridisation (FISH) on metaphase spreads from patients' cultured lymphocytes or by

Table 1 Description of the clinical features of the patients, with their chromosome imbalances and mode of inheritance.

Patient	Clinical description of patients	Type and extension of the imbalance	Parental origin
1	3-year-old female child presenting complete uterine and vaginal agenesis, fused external labia and ovaries undetectable by ultrasound examination	dup 2.7 Mb at 1q21.1 dup 0.6 Mb at 22q11.22 del 2.6 Mb at 22q11.21	Both inherited from normal mother de novo*
2	18-year-old female with mild to moderate learning disabilities; vaginal agenesis and a very rudimentary uterus (bilateral muscular buds); long face, prominent nose, short philtrum, high palate, slender hands, slight dorsal/lumbar scoliosis; unilateral kidney agenesis at right; slight increase of the aortic arch and hypothyroidism.		
3	45-year-old female with mental impairment, complete absence of the uterus and vagina, sick since the age of 1 year, mild facial asymmetry, slight deviation of the nasal root and meath, high palate, long and slender arms and legs, long and thin hands and feet, horizontal nystagmus and anophthalmos.	del 1.2 Mb at 17q12	de novo
4	32-year-old female with absence of uterus and upper third of the vagina, Sprengel deformity of the shoulder, short neck with limited motion, low posterior hairline, high palate, moderate to severe hearing impairment at right, and discrete brachydactyly in upper limbs	del 1 Mb at Xq21.31	Unknown—parents unavailable

multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands).²⁸

Fine mapping of the alterations ascertained by 1 Mb array-CGH
More detailed mapping of the macroimbalances was performed with the "Syndrome Plus" arrays containing 105K oligonucleotides from Oxford Gene Technology (<http://www.ogt.co.uk>)

with whom we collaborate. The X chromosome alteration (patient 4) was finely mapped using an X chromosome tiling path array developed by the MRC University (MRC, The Netherlands). Labelling and hybridisations were performed according to their protocols.²⁹

Image acquisition and intensity measurements were made using a Laser Scanner GenePix 4000B and the GenePix software

Figure 1 This figure shows the detection by array based comparative genomic hybridisation (CGH) and further characterisation of the alterations found in patient 3 (1A) and in patient 2 (1B). (A) Array CGH profile of chromosome 17 shows a deletion (arrow and red dots); fluorescence in situ hybridisation (FISH) results confirm the deletion by showing that only one chromosome 17 (red arrows) hybridises with the bacterial artificial chromosome (BAC) from the deleted area. (B) Array CGH profile of chromosome 22 shows a deletion (arrow and red dots), which was finely mapped by oligo arrays. The deletion was found to be interrupted by an undetected segment containing the *TBX1* gene. The deleted segments (marked by the red bar) are shown as bubbles due to the superposition of the graphic representation of two hybridisations with dye swap.

Original article

(Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA). Bacterial artificial chromosome (BAC) arrays were analysed using *torus*[®] built up in Excel by W Sloos (Department Molecular and Cellular Biology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands), while oligo array analyses were performed using the CytoSure Viewer software from Oxford Gene Technology.

RESULTS AND DISCUSSION

Five submicroscopic copy number alterations were identified in four out of 14 (29%) patients with MA tested. These alterations were all independently ascertained and do not overlap. Table 1 presents the clinical features of the affected probands carrying chromosome imbalances, as well as the size, position and mode of inheritance of the chromosome alterations. Figure 1 illustrates the process of detecting chromosome alteration by 1 Mb array screening, its confirmation by FISH and its fine mapping by oligo arrays. Figure 2 displays the physical map of the four chromosome regions exhibiting genomic imbalances.

Patient 1

This patient carries two duplications, one at 1q21.1 and the other at 22q11.21. Both imbalances were inherited from her phenotypically normal mother. The 1q21.1 duplication (Fig. 2A) region spans ~3.5 Mb, and contains small segments scattered in the area which have been previously described as normal variation (DCV). However, polymorphic variation has not been reported in the distal area of the duplication, which encompasses both the recurrent microdeletion/microduplication (Ensembl Genome Database) and the thrombocytopenia absent radius syndrome (TAR; OMIM 27400) susceptibility segments. A recent study²⁰ showed that 30 investigated TAR syndrome patients had variable deletions within this 1q21.1 region, including a common 200 kb segment that is duplicated in our patient. The majority of these TAR patients (75%) inherited the chromosome alteration from a phenotypically normal parent. Interestingly, some cases of TAR syndrome have been reported in conjunction with MA.² These data suggest that genetic factors for TAR and MA phenotypes map to this 1q21.1 area, and that incomplete penetrance and variable expressivity probably occur.

As a complicating factor, patient 1 exhibits an additional ~1 Mb duplication that partially overlaps the distal segment of the 22q11.21 microdeletion/microduplication syndromes region (Fig. 2C). This area is partially covered by CNVs, except for a ~200 kb segment containing several genes. The 22q11 duplication syndrome presents variable phenotype, often very mild to normal, but the absence of midline derivatives was never recorded.²¹

Patient 2

This patient has been previously reported by us⁴ for presenting uterus agenesis associated with a de novo 22q11.21 deletion in the DiGeorge/velocardiofacial syndrome region (DC/VCFs; OMIM 188400/192430). Deletions in this region had only been previously associated with MA in female fetuses,²² but recently two other reports of females with absent uterus and deletions in this region strengthen our results.²³ We have now further mapped the rearrangement in our patient, which revealed that the deletion spans 2.5 Mb but is in fact interrupted by a small chromosome segment with apparently normal copy number (Fig. 1B, Fig. 2C). The non-deleted segment contains the *TBX1* gene, the main gene responsible for five

major clinical features associated with the del 22q11.21 syndrome, namely: conotruncal anomaly face, cardiac defects, thymic hypoplasia, velopharyngeal insufficiency with cleft palate, and parathyroid dysfunction with hypocalcaemia. Accordingly, our patient does not present features of *TBX1* deletion. Further, she displays features often present in DC/VCFs but not linked to alterations of the *TBX1* gene, namely: learning disabilities, a facial type suggestive of 22q deletion, scoliosis, and kidney agenesis.

Patient 3

This patient has a de novo ~1.8 Mb deletion on 17q12, which includes the region of the renal cyst and diabetes syndrome (RCAD; OMIM 137920) (Fig. 1A, Fig. 2B). This syndrome is caused by mutations or deletions of one copy of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1β (*TCF2*), and is characterized by renal anomalies, with or without diabetes.²⁴ In spite of her *TCF2* haploinsufficiency, patient 3 has neither diabetes nor renal malformations. Further, she presents severe learning disabilities, seizures, absent uterus, and other clinical features that are not part of the RCAD syndrome. Anomalies of the genital tract, including rudimentary or locuminate uterus, have sporadically been described in patients with *TCF2* mutations, and the deletion of *TCF2* in our patient has possibly added to her MA. However, other genes map within her 17q12 deletion and likely contributed to her phenotype, particularly the *LHX1* gene. No phenotype has ever been associated with alterations of the *LHX1* gene in humans,²⁵ but studies in mice²⁶ show that *lmx1*, which is 99.5% homologous to the human *LHX1* gene (GeneCards), is expressed in the epithelium of the developing müllerian duct during its formation. Female *lmx1* null mice present normal ovaries but completely lack all derivatives of the müllerian ducts (oviducts, uterus, cervix and the upper region of the vagina); similarly, our patient has complete absence of uterus and vagina (she refused oviduct investigation) but displays normal ovaries and secondary sexual characteristics. On the other hand, it is important to observe that the *lmx1*^{+/−} mice, which would correspond to our patient's *LHX1* haploinsufficiency, do not show any müllerian phenotype. Conversely, *lmx1* null mice usually die before birth, and escapees, in addition to MA, also lack anterior head and kidney formation; our patient has no kidney abnormalities and, although she exhibits some syndromic features, her phenotype is far milder than the one manifested by the *lmx1* null mice. If we postulate that *LHX1* is causally connected to MA, then humans must have a different dosage threshold response than mice to its product, manifesting MA even when the gene is in haploinsufficiency.

Patient 4

The patient carried a ~1 Mb deletion on Xq21.31, which was finely mapped using a tiling path array for chromosome X.²⁷ The lost segment encompasses a single gene, *KLHL6*, which therefore appears as candidate for the phenotype (Fig. 2D). This gene is widely expressed in fetal tissues, and has also been detected in the female reproductive system and kidney, but its function is still unknown. Alternatively, the adjacent genes *DACH2* and *POF91*, related to organogenesis and premature ovarian failure (POF), respectively, may have altered expression due to their close proximity of the rearrangement. Association between POF and müllerian developmental anomalies has been previously reported.²⁸ One could argue that preferential inactivation of the X carrying the deletion may lead to the manifestation of any recessive gene present in its normal homologue, but the X

Figure 2 Physical map of the chromosome regions found duplicated or deleted in four patients. The chromosome bands, corresponding phenotypes and candidate genes are represented.

Original article

Web resources

The URLs for data presented herein are as follows:

- Ensembl Genome Database (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html)
- Database of Chromosomal Imbalances and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER), <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher>
- Database of Genomic Variants (DGV), <http://projects.tcag.ca/variation/>
- GeneCards, <http://www.genecards.org/index.shtml>
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/>

macroscopic pattern of this patient did not indicate a major skew, at least in blood (data not shown).

CONCLUSIONS

Two patients presented de novo chromosome alterations, namely patients 2 and 3. The parental origin of the deletion on chromosome Xq21.31 in patient 4 could not be determined because the patient refused her parents to be investigated. Our data implicate the altered regions in MA, and point in particular to *LSX1* and *KLHL4* as candidate genes.

The chromosome alterations in patient 1, which were inherited from her phenotypically normal mother, have unclear significance and represent a problem for genetic counselling. In the last 2 years, a number of papers have documented the unexpected large-scale CNV occurring in normal individuals.²⁰ It is possible that some of these variants represent increased risk factors for particular phenotypic anomalies whose clinical manifestation may be dependent on other genetic and environmental factors. The MA in this patient has been associated to the 1q21.1 region, which is also implicated in the TAR syndrome; the additional documentation of patients presenting both MA and TAR² indicates that the same or contiguous genetic factors contribute to these phenotypes. Furthermore, it becomes increasingly evident that alterations in copy number do not always behave as dominants with complete penetrance and non variable expressivity.

Multifactorial/polygenic inheritance of MA has long been postulated,¹⁴ and our study supports the multiplicity of genetic factors probably involved in the genesis of müllerian defects. Our data point to new chromosome regions possibly harbouring genes related to MA, although the genotype-phenotype correlation becomes more difficult to establish as we move further away from simple monogenic dominant patterns of inheritance. In this regard, mutations such as DECIPHER, which compile copy number alterations in specific phenotypes, are becoming essential for understanding the phenotypic sequelae of such variations.

Acknowledgements. The authors wish to thank the patients and their families for the participation in this study and Peter L.P. Olson and Angela M. Vianello Morgante for suggestions on the manuscript. In particular, we would like to thank the anonymous reviewer for the significant criticisms and time spent in the revision of the manuscript. We thank Dorien Lugenberg and Hans Bokhoven for providing the full coverage X chromosome arrays.

Funding. This study was supported by grants from the State of São Paulo Foundation for Support of Research (FAPESP/CNPQ 03/10254-2) and the Brazilian National Research Council (CNPq).

Competing interests. None declared.

Patient consent. Informed consent was obtained for publication of the patient's details in this report.

REFERENCES

1. Simpson JL. Genetics of the female reproductive ducts. *Am J Med Genet* 1999;93:324-33.
2. Behre RM, Couchman G, Wehner D, Price TM. Müllerian agenesis and androgen/androgen receptor deficiency syndrome: a case report and review of syndromes associated with Müllerian agenesis. *Obstet Gynecol Surv* 2005;60:453-61.
3. Pavesio RCM, Eiger A, Otto PA. Relationship between Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) anomaly and hereditary distal achylasia (HRA). *Am J Med Genet* 2002;22:245-9.
4. Baston-Lauber A, Konrad D, Marzall F, Schoenle EI. A *WNT4* mutation associated with müllerian-duct agenesis and vitellina in a 46,XX woman. *N Engl J Med* 2004;351:702-3.
5. Baston-Lauber A, De Rijppo C, Konrad D, Scanno C, Mazzoni A, Schoenle EI. *WNT4* deficiency – a clinical phenotype distinct from the classic Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a case report. *Hum Reprod* 2007;22:224-9.
6. Chendri C, Knapich-Santoro JC, Rosenburg C, Jhae FS, Mingos-Hato FC, Pavesio RCM, Zambelli Filho S, Kim CA, Bagatell VR, Mendonça BB, Souza K, Otto PA. Report of a *WNT4* mutation in a patient with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) anomaly and exclusion of *WNT4*, *PAX6*, *POU3F1*, and *POU3F2* as major genes determining MRKH anomaly in a study of 25 affected women. *Am J Med Genet A* 2006;140:1339-42.
7. Merz B, Meier M, Thümpert B, Buysse K, Vanderschuerpe J, Molteni C, de Ruiter T, Van Veenen S, Bolkowicz, Bader L, Janssens S, De Paupe A, De Meirau V, Marynen P, Fryns JP, Mortier G, Devriendt K, Spelkenen F, Vermeesch JR. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalances in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet* 2006;43:325-32.
8. Vissers LE, van Rensenwoude CM, Adriaens R, Hurst JR, de Vries BB, Jansen IM, Van der Vliet AH, Huys EH, de Jong PJ, Harrel BE, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA, van Kessel AG. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet* 2004;36:955-7.
9. Rosenburg C, Knapich-Santoro JC, Böhler E, Vianello-Morgante A, Sloos WE, Otto PA, Kish M, Hanson K, Knapich-Santoro JC, Regier H, Carter NP, Blijm BE, Van Heeringen A, Souza K, Tenke HJ. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet* 2006;43:180-8.
10. Schauben JP, McQuinn CJ, Wülfert R, Zweijenberg D, Disperso F, Palz G. Relative quantification of 40 nucleotide sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Mol Cell Probes* 2002;16:257.
11. Veltman JA, Vianello-Morgante A, Lugenberg D, Aerts H, Brielis S, Huys BH, Oosterga K, de Jong P, Brunner HG, Geurts van Kessel A, van Edhoven H, Schoenmakers EF. High resolution profiling of X chromosomal aberrations by array comparative genomic hybridization. *J Med Genet* 2004;41:425-32.
12. Hagiwara E, Schube H, Stokoe C, Ott CE, Hall J, Trödel F, Kleinthaler S, Gieseler H, Hübner-Bob R, Maunula LM, Heberich R, König R, Szechenyi Z, Megret A, Rogers RH, Ullrich R, Han D, Mundlos S. Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance: involving a microdeletion in thymopoietin-absent rat syndrome. *Am J Hum Genet* 2007;80:222-40.
13. Grossmaier RE, Adyinka A, Ryan HC, Michels WJ, Underhill DM, Dawson DB, Thorland EC, Lonardo CP, Goldstein JL, McDonald MT, Smith ME, Simon-Favre E, Alexander AJ, Kulkarni AS, Katsirji RP, Clark RD. *3q13.3* Microdeletion (3q13.3), an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet* 2005;75:1027-40.
14. Devriendt K, Morin P, Van Schaubroek D, Vanderschuerpe K, Fryns JP. Chromosome 22q11 deletion presenting as the Potter sequence. *J Med Genet* 1997;34:402-5.
15. Le Gaignes G, Bocano M, Saugier-Veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, Febouty T, Rivd JM. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridization in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet* 2005;42:121-3.
16. Sundler UT, McDonald-McGinn DM, Huff D, Emanuel BS, Zachai BH, Driscoll DA, Bodurtha J. Primary amenorrhea and absent uterus in the 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet* 2007;145:216-8.
17. Edgill EL, Bingham C, Elbed S, Hazzard AT. Mutations in hepatocyte nuclear factor-1 β and their related phenotypes. *J Med Genet* 2006;43:24-30.
18. Hunter CS, Rhodes SJ. Uthmaniyadin genes in mammalian development and human disease. *Molecular Biology Reports* 2005;32:67-77.
19. Hibiyauchi A, Shewell W, Kania A, Behringer R. Requirement of *Gdf1* for female reproductive tract development. *Dev Biol* 2004;131:539-49.
20. Levens E, Gustafson RL, Siggers JH, Armstrong NY. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hausen syndrome and premature ovarian failure: a rare combination. *Reprod Sci* 2005;13(Suppl 1):342S-6.
21. Jeffries AJ, Fook L, Rivis MH, Lissenden ML, Donohoe PK, Oly S, Schenck SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 2004;36:949-51.