

STELA RACOVIȚĂ¹, V. MOȘIN^{1,3}, SVETLANA CAPCELEA¹, D. PONETENCO³,
K. BOICIUC^{2,3}, MARIANA SPRINCEAN^{1,2}

BĂRBAT 46,XX, RAPORT DE CAZ CLINIC

¹ USMF Nicolae Testemițanu

² IMSP Institutul Mamei și Copilului

³ Centrul Medical Repromed

РЕЗЮМЕ

ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ МУЖЧИНЫ С КАРИОТИПОМ 46, XX

Половой детерминизм у человека представляет собой сложный процесс, включающий систему генов полового развития, из которых ген, расположенный на хромосоме Y – Yp11.32, именуемый SRY (Sex-determining region Y), играет критическую роль.

Цель: Подтвердить важность клинико-генетического обследования для мужчин с азооспермией, с целью точной диагностики мужского бесплодия.

Материалы и методы: Было проведено клинико-генетическое обследование мужчины в возрасте 31 года, с бесплодием в течение 5 лет в анамнезе, с азооспермией и нарушением гормональных маркеров. Было осуществлено цитогенетическое обследование, проведенное по классической методике с окраской по Гимзе. Дополнительно был применен метод FISH (Fluorescence in situ hybridization) с зондами для X-хромосомы (DXZ1, Xp11.1-q11.1) и Y-хромосомы (SRY, Yp11.32 и DYZ1, Yq12). Для молекулярно-генетической диагностики маркеров Y-хромосомы (SY 81, SY 84, SY 127, SY 134, SY 254, SY 255) и внутреннего контроля маркеров sY14/SRY и ZFX/ZFY была использована техника мультиплексной ПЦР (полимеразная цепная реакция).

Результаты: Клиническое обследование показало, что фенотип и психологическая идентичность соответствовали мужскому полу. В то же время, были обнаружены гипогонадизм, азооспермия и бесплодие. Данные цитогенетического обследования показали наличие кариотипа 46, XX, характерного для женского пола. Тест FISH показал наличие двух сигналов хромосомы X и одного сигнала хромосомы Y (SRY, Yp11.32). По результатам молекулярно-генетического анализа было диагностировано наличие гена SRY и отсутствие маркеров Y-хромосомы. Вышеуказанные результаты указывают на клинический диагноз нарушений полового развития (синдром XX, мужской фенотип). Наличие гена SRY, транслоцированного на хромосому X, подтверждает и объясняет мужской фенотип у пациента.

Заключение: Клинико-генетическое обследование мужчин с азооспермией представляет важность для точной диагностики мужского бесплодия.

ABSTRACT

MALE 46, XX, CLINICAL CASE REPORT

Sex determination in humans presents a complex process, that involves a network of genes in which a gene, located on Y-chromosome Yp11.32, named SRY (sex-determining region of the Y), plays a crucial role.

The goal: To confirm the importance of clinical-genetic evaluation in azoospermic men, for the correct diagnosis of male infertility.

Materials and methods: A 31-year old man with a history of 5-years of infertility, azoospermic and hormonal marker changes, was clinical genetic evaluated. For the chromosome analysis, the cytogenetic exam was performed using the classic Giemsa marking technique. The FISH (Fluorescence in situ hybridization) test with X chromosome probes (DXZ1, Xp11.1-q11.1) and Y (SRY, Yp11.32 and DYZ1, Yq12) was also performed. For molecular genetic diagnosis of Y chromosome markers (SY 81, SY 84, SY 127, SY 134, SY 254, SY 255) and internal controls: sY14/SRY and ZFX/ZFY, was used technique Multiplex Polymerase chain reaction (PCR).

Results: Following clinical evaluation, the patient's phenotype and psychological identity were male. Also he presented hypogonadism, azoospermia and infertility. According to the cytogenetic exam, the karyotype was 46,XX, female characteristic. The FISH test highlighted, two signals for chromosome X and a signal for chromosome Y (SRY, Yp11.32). Following molecular genetic examination, the presence of the SRY gene and lack of markers of the Y chromosome was diagnosed. The three related results suggest the clinical diagnosis of sexual development disorder (XX syndrome, male phenotype). The presence of the SRY gene translocated on chromosome X confirms and explains the male phenotype of the patient.

Conclusion: Clinical-genetic evaluation of azoospermic men is important for the correct diagnosis of male infertility.

Introducere Determinismul sexual la om prezintă un proces complex care începe cu stabilirea sexului genetic în care ovocitul purtător de cromozomul X este fertilizat de un spermatozoid care poate conține un cromozom X sau unul Y. Această etapă este urmată de dezvoltarea gonadelor și rezultând formarea caracterelor sexuale primare (organele genitale interne și externe). În cursul pubertății au loc o serie de modificări fenotipice suplimentare induse de hormonii gonadali ce au ca rezultat prezentarea caracterelor sexuale secundare și dobândirea capacităților reproductive. În toate aceste etape participă o rețea de gene de sexualizare, printre care o genă localizată pe cromozomul Y- Yp11.32, numită SRY (Sex-determining region Y), joacă un rol crucial [1,2].

Gena SRY codifică o proteină (testis-determining factor) care inițiază diferențierea testiculului, prin activarea unor gene specifice masculinizării ce determină proliferarea și diferențierea celulelor progonadelor bipotente. Această proteină activează gena SOX-9 care induce diferențierea celulelor sertoli, necesare pentru dezvoltarea masculină și/sau reprimă calea feminină prin reglarea transcripției genelor în aval. Atât genele SRY cât și SOX-9 inhibă calea de semnalizare RSPO-1 (R-spondin-1) -Wnt-4-β-catenină-FOXL2 esențială pentru dezvoltarea ovariană [3]. Astfel în embrionii XY, SRY induce gonadele primordiale să se dezvolte ca testicul, după care fenotipul masculin rezultă din influența hormonilor secretați de testiculele în curs de dezvoltare. În contrast, la embrionii 46 XX, în lipsa genei SRY, se determină diferențierea unui ovar de la gonadele bipotente și, în consecință, dezvoltarea caracterelor sexuale feminine [4]. În cazul când celula 46,XY pierde gena SRY determinismul sexual va conduce spre feminizare cu dezvoltarea disgeneziei gonadice (femeile XY sau sindromul Swyer), chiar dacă constituția cromozomică este de tipul XY. Iar când celula 46,XX câștigă gena SRY pe un alt cromozom decât cromozomul Y, determină masculinizare chiar dacă constituția cromozomică este de tipul XX, ducând la apariția anomaliei de bărbați XX.

Scopul: De a confirma importanța evaluării clinico-genetice la bărbații azoospermici, pentru diagnosticul corect al infertilității masculine.

Material și metode

Subiectul și caracteristicile clinice:

Un bărbat de 31 de ani, căsătorit, cu o istorie de 5 ani de infertilitate, a fost îndreptat la examinare genetică.

Conform rezultatelor spermogramei, bărbatul a prezentat azoospermie, efectuată după criteriile Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) din 2010. Markerii endocrini ai pacientului au arătat o creștere ușoară a hormonului foliculostimulant (FSH) de 11 mIU / ml (interval normal de 2,0-10,0 mIU / ml), concentrația de testosteron în ser fiind scăzută 1,3 ng / ml (interval normal de 2,0-6,9 ng / ml), în timp ce hormonul luteinizant (LH) a fost în limitele normale 5.5 mIU / ml (intervalul normal este de 2,0-12,0 mIU / ml). Fenotipul și identitatea psihologică ale pacientului erau de sex masculin, cu o înălțime și greutate în limitele normei. Organele genitale caracteristice sexului masculin, testiculele coborâte în scrot, dimensiunile fiind reduse, de o consistență moale și cu atrofie severă.

Examenul citogenetic: Pentru analiza cromozomilor au fost analizate limfocitele din sângele periferic conform nomenclurii din 2016 – International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Limfocitele din sângele periferic au fost cultivate pe medii speciale, după o perioadă de incubare de 72 de ore, s-a adăugat apoi colchicină, urmată de tratament hipotonic și fixare. Cromozomii au fost obținuți în metafază după care colorați prin tehnica clasică de marcaj G (Giemsa). Numărul de metafaze analizate a fost de 30, dintre care 10 cariotipate, nivelul de rezoluție al benzilor fiind 550-575. S-a practicat suplimentar testul FISH (Fluorescence in situ hybridization) cu sonde pentru cromozomul X (DXZ1, Xp11.1-q11.1) și Y (SRY, Yp11.32 și DYZ1, Yq12), care a evidențiat două semnale pentru cromozomul X și un semnal pentru cromozomul Y (SRY, Yp11.32) .

Examenul molecular – genetic al markerilor cromozomului Y și SRY (Sex determining region Y):

ADN-ul genomic a fost extras din limfocitele din sângele periferic al pacientului pentru a fi analizat prin metoda multiplex, reacția de polimerizare în lanț (PCR). S-au folosit situsuri marcate cu secvență (STS) care sunt markeri specifici pentru cromozomul Y pentru genele ce controlează spermatogeneza din locusul azoospermia factor (AZF): SY 81, SY 84 pentru AZFa; SY 127, SY 134 pentru AZFb; SY 254 și SY 255 pentru AZFc. Drept control intern a fost utilizat un primer pentru amplificarea genei SRY, de asemenea un primer special pentru amplificarea unui fragment unic atât în cromozomii Y, cât și în cromozomii X ai genei ZFY/ZFX. Produsele PCR s-au electroforezat pe gel de agaroză 2,5%, s-au examinat în proiectorul ultraviolet, apoi s-au fotografiat.

Rezultate

În urma examenului citogenetic, pacientul în vârstă de 31 de ani cu fenotip masculin a prezentat un cariotip 46,XX, caracteristic feminin (fig. 1), fără dovezi de mozaicism, anomalii cromozomiale structurale sau numerice. Testul FISH cu sonde pentru cromozomul X (DXZ1, Xp11.1-q11.1) și Y (SRY, Yp11.32 și DYZ1, Yq12) a evidențiat două semnale pentru cromozomul X și un semnal pentru cromozomul Y (SRY, Yp11.32).

Analiza moleculară (tab. 1) a markerilor specifici ai cromozomului Y- SY 81, SY 84 din regiunea AZFa; SY 127, SY 134 din regiunea AZFb; SY 254 și SY 255 din regiunea AZFc a evidențiat absența lor în ADN-ul pacientului, totuși, prezența ZFX și SRY a apărut clar. Aceste rezultate confirmă faptul că pacientul este un bărbat de sex masculin XX, cu prezența genei SRY fără nici un marker specific cromozomului Y.



Fig. 1. Cariotipul 46,XX la bărbatul investigat

Tabelul 1. Examenul molecular – genetic al markerilor cromozomului Y și SRY la bărbatul investigat

STS	Regiunea crs.Y	Locus	Secvența primer	Rezultat
SY14	Yp	ZFY	F- ACCRCTGACTGACTGTGATTACAC R- GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT	+
SY14	Yp	SRY	F- GAATATTCCTCGCTCTCCGGA R- GCTGGTGCTCCATTCTTGAG	+
sY84	AZFa	DYS 388	F- AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT R- GCCTACTACCTGGAGGCTTC	-
sY86	AZFa	DYS 148	F- GTGACACACAGACTATGCTTC R- ACACACAGAGGGACAACCCT	-
sY127	AZFb	DYS 218	F- GGCTCACAAACGAAAAGAAA R- CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	-
sY134	AZFb	DYS 224	F- GTCTGCCTCACCATAAAAACG R- ACCACTGCCAAAACCTTCAA	-
sY254	AZFc	DAZ	F- GGGTGTACCAGAAGGCAAA R- GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	-
sY255	AZFc	DAZ	F- GTTACAGGATTCGGCGTGAT R- CTCGTCATGTGGCAGCCAC	-

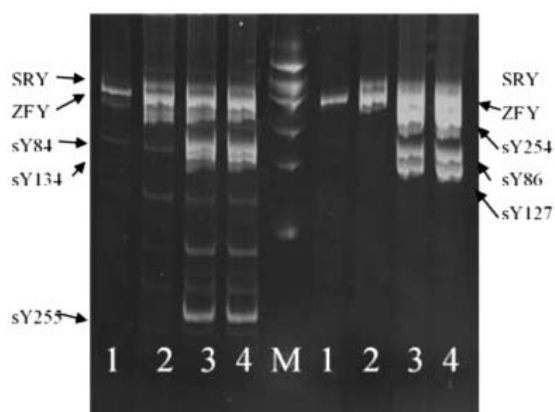


Fig. 2. Electroforeograma analizei multiplex PCR a regiunilor AZF de pe cromozomul Y: 1 - control feminin; 2 - pacient 46, XX cu deleția regiunilor AZF (a, b, c); 3, 4 - control masculin

Discuții

În cazul prezentat, fenotipul masculin, azoospermia, infertilitatea în cuplu de 5 ani, disfuncția erectilă și testele

hormonale ne conduc la diagnosticarea insuficienței testiculare primare cu suspectia sindromului Klinefelter. Diagnosticul diferențial a fost efectuat prin analiza cariotipului și testelor moleculare – genetice. În urma evaluării clinice a pacientului, ținând cont de rezultatul citogenetic, cariotipul 46,XX, rezultatul testului FISH, ce a prezentat două semnale pentru cromozomul X și un semnal pentru cromozomul Y (SRY, Yp11.32), al celui molecular – genetic, care a indicat prezența genei SRY și lipsa markerilor specifici cromozomului Y, s-a stabilit inversia de sex la bărbatul XX investigat, sau sindromul de la Chapelle. Sindromul de la Chapelle este o afecțiune congenitală rară, cu o frecvență de 1:20000 nou-născuți cu fenotip masculin [5]. Datele din literatură de specialitate descriu cazuri sporadice ale acestui sindrom, deși au fost raportate și cazuri familiale. Cazul descris de noi a fost de asemenea considerat sporadic, în baza istoricului familial. În majoritatea cazurilor (80%) patologia se produce printr-un crossing-over inegal între cromozomii X și Y în timpul recombinării materialului genetic din profaza I a meiozei și are ca rezultat translocarea genei SRY de

pe cromozomul Y pe cromozomul X sau pe cromozomii autozomali [6]. Astfel se explică cele două categorii ale acestui sindrom, SRY pozitivi 80% din pacienți și 20% SRY negativi. Cazul prezentat se referă de asemenea la categoria SRY pozitivi fiind depistată gena SRY prin examenul molecular – genetic multiplex PCR, și prin testul FISH gena SRY translocată pe cromozomul X.

Diagnosticarea timpurie a acestui sindrom este dificilă datorită dezvoltării relativ normale a organelor sexuale, după pubertate se observă hipogonadismul, azoospermia și infertilitatea. Cazul nostru a fost diagnosticat la vârsta de 31 de ani din cauza aceleiași cauze menționate anterior – azoospermie și infertilitate. Azoospermia este cel mai probabil cauzată de absența genelor din regiunea AZF a cromozomului Y- Yq11.23. În acest caz, nu se recomandă extragerea spermei testiculare, spermatogeneza reziduală nu poate fi prezentă în testicule. În alte studii de specialitate, după evaluarea histologică a țesutului testicular al bărbaților XX, se atestă prezența sindromului celulelor Sertoli și hiperplazia celulelor Leydig [7].

Majoritatea persoanelor din grupul SRY-negativ prezintă evoluție sexuală ovotesticulară. La pacienții cu tulburări de dezvoltare sexuală ovotesticulară, gonadele au atât țesut ovarian, cât și țesut testicular, în timp ce la pacienții cu tulburări de dezvoltare sexuală testiculară ambele gonade au numai țesut testicular. Diagnosticul tulburării testiculare SRY-negative a dezvoltării sexuale se face adesea în copilărie – în timpul examinării genitale și a ginecomastiei [6, 7].

46, XX la bărbați este o anomalie a cromozomului de sex rar întâlnită, care este dificil de diagnosticat la adulți. În tratamentul pacienților 46, XX cu insuficiență testiculară, trebuie avută în vedere abordarea multidisciplinară. Suportul psihologic este o parte importantă a abordării holistice. În concluzie, în cazurile de hipogonadism, prezența a azoospermiei și infertilitate, efectuarea testelor citogenetice și celor moleculare – genetice prezintă importanță clinică, în diagnosticul diferențial al acestor sindroame rare. Cunoștințele actuale privind mecanis-

mele diferențierii sexuale sunt importante teoretic și utile practic pentru diagnostic și abordarea corectă a bărbaților cu infertilitate.

Bibliografie

1. A.H. Sinclair, P. Berta, M.S. Palmer, J.R. Hawkins, B.L. Griffiths, A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif *Nature*, 346 (1990), pp. 240-244
2. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990;346:240.
3. Parma P, Radi O, Vidal V, et al. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 2006;38:1304-9
4. Juan Carlos Zenteno-Ruiz, Susana Kofman-Alfaroa and Juan Pablo Méndezb, REVIEW ARTICLE 46,XX Sex Reversal, *Archives of Medical Research* 32 (2001) 559–566
5. Ergun-Longmire B, Vinci G, Alonso L, et al. Clinical, hormonal and cytogenic evaluation of 46 XX male and review of the literature. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2005;18:739-48
6. Ahmet Anık, Gönül Çatlı, Ayhan Abacı, Ece Böber, 46,XX Male Disorder of Sexual Development: A Case Report, *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2013;5(4):258-260
7. Elena Vorona, Michael Zitzmann, Jörg Gromoll, Andreas N. Schüring, Eberhard Nieschlag. Clinical, Endocrinological, and Epigenetic Features of the 46,XX Male Syndrome, Compared with 47,XXY Klinefelter Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 92, Issue 9, 1 September 2007, Pages 3458–3465