THATIANA EVILEN DA SILVA

Pesquisa de mutações no gene *DMRT1* em pacientes portadores de distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) 46,XY por anormalidades gonadais

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Dr^a. Sorahia Domenice

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Thatiana Evilen da Silva

Pesquisa de mutações do gene *DMRT1* em pacientes portadores de distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) 46,XY por anormalidades gonadais / Thatiana Evilen da Silva. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Sorahia Domenice.

Descritores: 1.Gene *DMRT1* 2.Dosagem de genes 3.Desenvolvimento sexual 4.Disgenesia gonadal 46,XY

USP/FM/DBD-133/12

Este trabalho foi realizado na Divisão de Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42 da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP): Bolsa de Mestrado 2009/03872-3.

Dedicatória

*Aos meus queridos pais Darcení e Eliana e àqueles
que me apoiaram desde o princípio e tornaram
minha vida recheada de alegrias.*

Amo vocês!

Epígrafe

“Ora, àquele que é poderoso para fazer tudo muito mais abundantemente além daquilo que pedimos ou pensamos, segundo o poder que em nós opera...” (Efésios 3.20) – *Bíblia Sagrada traduzida em português por João Ferreira de Almeida.*

Agradecimentos

À Deus pelas promessas que se cumpriram até aqui. Por Ele ter preparado pessoas que me ajudaram adquirir o conhecimento científico brando que, dividido em processos, foi exigido durante o aprendizado. Percebi que não era fácil realizar esse trabalho, porém tinha a sensação de que estava no caminho certo e que teria que chegar até o fim desse trajeto. E cá estou, cheguei!

À Profa. Dra. Sorahia Domenice, minha orientadora, a qual foi fundamental para que esse trabalho fosse completo através de ideias inovadoras e científicas adquiridas durante seus anos de experiências. Obrigada pela sua paciência em aceitar os meus erros e pelo carinho ao me corrigir.

À Profa. Dra. Berenice Bilharinho Mendonca por permitir que este trabalho fosse elaborado em seu laboratório, no qual pude receber diversos conselhos e ajudas importantíssimas para o desenvolvimento do trabalho das queridas funcionárias Dra. Miriam Yumi Nishi e Mariana Funari.

Ao Prof. Dr. Alexander Jorge e ao Prof. Dr. Ivo Jorge Prado por estarem sempre dispostos a passar as suas experiências adquiridas durante a sua pesquisa científica.

À Profa. Dra. Maria Cândida M. B. Fragoso e à Profa. Dra. Regina Matsunaga pelo apoio e disponibilidade em ajudar sempre.

À Profa. Dra. Ana Claudia Latronico pelas sugestões e incentivos.

À Profa. Dra. Elaine Maria Frade Costa e ao Prof. Dr. Vinícius Brito pela ajuda, discussões valiosas e pela amizade.

Às Profa. Dra. Luciani de Carvalho (do LIM42) e à Dra. Ane Nunes (do Departamento da Nefrologia da FMUSP) pela sua paciência ao passar o seu conhecimento em biologia molecular e suas experiências de vida.

Às secretárias Nilda e Rosângela e às funcionárias Cidinha, Fran, Cristina e Rosana por apoiarem o desenvolvimento desse trabalho, pela ajuda constante e amizade especial.

À minha querida amiga Vivian Moura que recebeu-me de braços abertos e que honrou-me ao passar os seus inúmeros conselhos. Muito obrigada!

À pós-graduanda Aline Zamboni e à Dra. Mariza Santos pela ajuda nas etapas iniciais desse trabalho.

Aos meus queridos e amados amigos do LIM-42: Cintia Tusset, Daiane Beneduzzi, Fabiana Mendez, Acácio Silveira, Ricardo Paranhos e Ricardo Araújo.

Aos meus irmãos Gleison, Gheyson, Elen e aos meus cunhados Priscilla e Feliph pelo companheirismo, pelo carinho e pelos momentos de alegria.

Aos meus pais Darcení e Eliana pela ajuda, pela dedicação, pelo carinho, pelo amor, pelo apoio e pela torcida. Vocês foram fundamentais para a finalização desse trabalho árduo, porém recompensador! Serei eternamente grata à vocês!

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Fraddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de anexos

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Determinação gonadal.....	3
1.1.1 Genes envolvidos no desenvolvimento testicular	7
Gene <i>Doublesex and mab-3-related transcriptional factor 1</i>	
(<i>Dmrt1</i>)	9
1.2 Diferenciação sexual	12
1.3 Distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS)	13
1.3.1 Distúrbios do desenvolvimento gonadal.....	14
1.4 Síndrome da deleção do braço curto do cromossomo 9	15
1.4.1 <i>DMRT1</i> em Humanos.....	16
2 OBJETIVO	21
3 PACIENTES E MÉTODOS	23
3.1 Casuística	23
3.2 Avaliação clínica e hormonal	24
3.3 Grupo de indivíduos controles	25
3.4 Análise molecular	25
3.4.1 Extração de DNA a partir de sangue periférico	25
3.4.2 Amplificação de DNA genômico por reação de polimerização em	
cadeia (PCR).....	26
3.4.3 Sequenciamento automático	27
3.5 Análise ‘in silico’	29
3.6 Análise estatística.....	30
3.7 “Multiplex ligation-dependent probe amplification” (MLPA).....	30
4 RESULTADOS	35
4.1 Estudo de dosagem gênica do <i>DMRT1</i>	35
4.2 Pesquisa de mutações no gene <i>DMRT1</i>	37
7 ANEXO A.....	52
8 ANEXO B.....	58
9 REFERÊNCIAS	62

LISTAS

Lista de abreviaturas

<i>Amh</i>	<i>Anti-müllerian hormonio</i>
AR	Ácido retinóico
array-CGH	Hibridização genômica comparativa em microarranjos
<i>CBX2</i>	<i>Chromobox homolog 2</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CGP	Células germinativas primordiais
CMP	Células mióides peritubulares
<i>Cyp26b1</i>	<i>Cytocromo P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1</i>
<i>Dax1</i>	<i>Dosage sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenital critical region of the X chrene 1</i>
DDS	Distúrbios do desenvolvimento sexual
DG	Disgenesia gonadal
DGC	Disgenesia gonadal completa
DGP	Disgenesia gonadal parcial
<i>Dhh</i>	<i>Desert Hedgehog</i>
DHT	Dihidrotestosterona
DM	Domínio <i>Doublesex</i> e <i>mab-3</i>
<i>Dmrt1</i>	<i>Doublesex and mab-3-related transcriptional factor 1</i>
<i>Dmrt2</i>	<i>Doublesex and mab-3-related transcriptional factor 2</i>
<i>Dmrt3</i>	<i>Doublesex and mab-3-related transcriptional factor 3</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
dNTP	Desorribonucleotídeo
Dpc	Dias pós coito
EDTA	Ácido etileno diamonitetracético
ESE	Exonic splice enhancer
<i>Fgf9</i>	<i>Fibroblast growth factor 9</i>
<i>Fgfr2</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
<i>Foxl2</i>	<i>Forkhead box L2</i>
<i>GATA4</i>	<i>GATA-binding factor 4</i>
HAM	Hormônio anti-mülleriano

hCG	Hormônio coriogonadotrófico
ISS	Intronic splice silence
LH	Hormônio luteinizante
MLPA	"Multiplex ligation-dependent probe amplification"
<i>Nr0b1</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1</i>
<i>Nr5a1</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 5, group a, member 1</i>
pb	pares de base
PCR	Reação de polimerização em cadeia
RNA	Ácido ribonucleíco
RNA _m	RNA mensageiro
<i>Rspo1</i>	<i>R-spondin homolog 1</i>
<i>Sf1</i>	<i>Steroidogenic factor 1</i>
SLN	Sinal de localização nuclear
<i>Sohlh1</i>	<i>Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1</i>
<i>Sox9</i>	<i>Sry-box containing 9</i>
<i>Sp1</i>	<i>Stimulating protein 1</i>
<i>Sry</i>	<i>Sex determining region on the Y chromosome</i>
<i>Stra8</i>	<i>Stimulated by retinoic acid gene 8 homolog</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus polymerase</i>
TE	Solução de Tris ácido clorídrico + EDTA
UTR	Região não traduzida
<i>Wnt4</i>	<i>Wingless-type mmtv integration site family, member 4</i>
<i>Wt1</i>	<i>Wilms' tumor suppressor gene</i>

Lista de símbolos

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µmol	Micromol
min	Minutos
mM	Milimolar
ng	Nanograma
ng	Nanograma por decilitro
nm	Nanomol
°C	Graus Celsius
pg/mL	Picograma por mililitro
pmol	Picomol
RPM	Rotações por minuto
U	Unidade
UI	Unidades internacionais
UI/L	Unidades internacionais por litro
λ	Lambda

Lista de figuras

- Figura 1** - Esquema de um embrião humano de 5 semanas de gestação, ilustrando a migração das CGPs oriundas do saco vitelino. A migração das CGPs ocorre ao longo do alantoide até o primórdio gonadal, localizado na superfície ventromedial dos mesonefros. Adaptado de Kousta, Papathanasiou e colaboradores (3). 3
- Figura 2** - Representação esquemática da organização celular do testículo fetal em desenvolvimento de camundongos. A, As células somáticas (representadas com núcleos em azul e vermelho) e as CGPs estão presentes na gônada bipotencial fetal, a qual está posicionada abaixo do epitélio celômico adjacente ao mesonefro durante o período embrionário 10 dias pós coito (d.p.c.). B, No período embrionário 12.5 d.p.c, forma-se o cordão testicular a partir da organização das células diferenciadas de Sertoli (verde) e das células mióides peritubulares (CMP; azul) que envolvem as CGPs. O cordão testicular constitui uma estrutura característica do testículo. As células de “Leydig”, originadas a partir das células somáticas, estão representadas na cor rosa. Adaptado de Sekido e Lovell-Badge (6). 4
- Figura 3** - Representação esquemática da interação dos diversos genes envolvidos nas diferentes etapas da diferenciação sexual. A presença de mutações nestes genes pode determinar o desenvolvimento de doenças envolvendo os ductos mullerianos ou wolffianos, gônadas, rins e glândula adrenal como resultado da deficiência ou excesso de expressão destas proteínas. Adaptado de MacLaughlin e Donahoe (13). 6
- Figura 4** - Representação esquemática do gene *DMRT1*. 16
- Figura 5** - Resultado da análise de MLPA de um indivíduo controle que apresenta número normal de cópias do *DMRT1* (éxons 1-5). As análises de MLPA foram feitas utilizando o programa “Coffalyser”. As relações entre 0,7 e 1,3 indicam número normal de cópias, abaixo de 0,7 indicam deleção da região e acima de 1,3 indicam duplicação da região. 35
- Figura 6** - A, Resultado da análise de MLPA de um indivíduo controle que apresenta redução no número de cópias do *DMRT1* (éxons 1-5). B, Paciente que apresenta número normal de cópias do *DMRT1* (éxons 1-5). Análises do MLPA foram feitas utilizando o

programa “Coffalyser”, que gerou os gráficos acima. As relações entre 0,7 e 1,3 indicam número normal de cópias, abaixo de 0,7 indica deleção da região e acima de 1,3 indica duplicação da região. 36

Figura 7 - Eletroferograma da sequência do intron 4 do *DMRT1*, mostrando a região da inserção de oito nucleotídeos anterior ao início do éxon 5, a qual determina uma mudança no quadro de leitura da sequência gênica. Localização da nova variante na região intrônica indicada por uma seta preta..... 37

Figura 8 - Eletroferograma da sequência da região 5' não traduzida e do éxon 1 do gene *DMRT1*. A, Indivíduos controles 1 e 2. B, Pacientes que apresentaram as substituições c.-14T>C e c.133T>A. 38

Figura 9 - Eletroferograma da sequência do éxon 3 do *DMRT1*, mostrando o polimorfismo c.774G>C em heterozigose no paciente 26 e em seu pai. O polimorfismo não foi identificado na mãe. A localização da troca do nucleotídeo está indicada por uma caixa vermelha..... 39

Figura 10 - Eletroferograma da sequência da região 3' não traduzida do *DMRT1*. A localização da sequência com alteração c.*11_*12insT em heterozigose (acima) e em homozigose (abaixo) são indicados pela caixa preta..... 40

Lista de anexos

Anexo A

Tabela 1 - Frequência das deleções restritas e das variantes alélicas no gene *DMRT1*, identificadas em pacientes portadores de DG 46,XY (sindrômicos e não sindrômicos) descritas na literatura. 53

Tabela 2 - Dados clínicos, hormonais e histológicos dos pacientes com disgenesia gonadal completa 46,XY..... 54

Tabela 3 - Dados clínicos, hormonais e histológicos dos pacientes com disgenesia gonadal parcial 46,XY. 55

Tabela 4 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos cinco éxons e região reguladora situada na região promotora proximal do *DMRT1*..... 57

Anexo B

Tabela 5 - Variantes alélicas identificadas no gene *DMRT1* nos pacientes portadores de DG 46,XY estudados. 59

Tabela 6 - Frequência genotípica e alélica das variantes alélicas do *DMRT1* identificadas em pacientes com DG46,XY e controles..... 60

Tabela 7 - Frequência alélica das variantes alélicas do *DMRT1* identificadas nos pacientes com DG46,XY e em populações de diferentes origens étnicas. 61

Resumo

Silva TE. *Pesquisa de mutações no gene DMRT1 em pacientes portadores de distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) 46,XY por anormalidades gonadais* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Introdução: O gene *DMRT1* é um fator muito importante, o qual induz a determinação sexual masculina. Estudos mais recentes têm demonstrado que o *Dmrt1* possui um papel significativo no desenvolvimento ovariano. Deleções restritas ao gene *DMRT1* têm sido raramente identificadas em pacientes com disgenesia gonadal (DG) sem outras características sindrômicas. **Objetivo:** Pesquisar a presença de haploinsuficiência do gene *DMRT1* (deleções e/ou mutações inativadoras) em um grupo grande de pacientes não sindrômicos com distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) por anormalidades gonadais. Polimorfismos do *DMRT1*, como fatores potenciais pelas anormalidades gonadais, foram também identificados. **Pacientes e Métodos:** Foram avaliados cerca de 39 pacientes portadores de DDS por anormalidades do desenvolvimento gonadal 46,XY: 24 com disgenesia gonadal parcial e 15 pacientes com disgenesia gonadal completa. As regiões codificadoras do *DMRT1* e o domínio DM (exon 1) foram amplificados e sequenciados. A análise de “Multiplex ligation probe amplification” (MLPA) do *DMRT1* foi realizada usando um kit comercial. **Resultados:** Deleção parcial ou total do *DMRT1* não foi identificada pela técnica de MLPA. Oito variantes alélicas do *DMRT1* foram identificados. Uma nova variante c.968-15insTTCTCTCT foi identificada em 6,4% e em 14,3% dos alelos dos pacientes 46,XY e indivíduos controles, respectivamente. **Conclusão:** Este estudo sugere que deleções parciais ou completas no *DMRT1* e mutações inativadoras não são frequentemente encontradas em pacientes com anormalidades do desenvolvimento gonadal. Além disso, nenhuma das variantes alélicas identificadas neste grupo de pacientes poderia ser considerada como um marcador potencial polimórfico para disgenesia gonadal.

Descritores: 1. Gene *DMRT1* 2. Dosagem de genes 3. Desenvolvimento sexual 4. Disgenesia gonadal 46,XY

Summary

Silva T.E. *Search of mutation on DMRT1 gene in patients with 46,XY disorders of sex development (DSD) by gonads abnormalities* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

Introduction *Dmrt1* gene is a very important factor in inducing male sex determination, and more recently it has been demonstrated that *Dmrt1* plays a significant role in ovary development. *DMRT1* deletions have rarely been identified in patients with 46,XY gonadal dysgenesis (GD) without syndromic features. **Objective-** To screen for the presence of *DMRT1* haploinsufficiency (deletions and/or inactivating mutations) in a large cohort of non-syndromic patients with disorder of sex development (DSD) due to abnormalities of gonadal development. *DMRT1* polymorphisms, as potential susceptibility factors for gonadal abnormalities, were also investigated. **Subjects and Methods-** We evaluated 39 patients with 46,XY GD: 24 patients with the partial, and 15 with the complete form. The entire coding region (éxons 2-5) of *DMRT1* and the DM domain (exon 1) were PCR-amplified and direct sequenced. Multiplex ligation probe amplification (MLPA) analysis of *DMRT1* was carried out using a commercial kit. **Results-** Partial or total deletion of *DMRT1* was not identified by MLPA technique. Eight allelic variants of *DMRT1* were identified. The novel variant c.968-15insTTCTCTCT was identified in 6.4% and in 14.3% of the alleles of 46,XY patients and control subjects, respectively **Conclusion-** This study suggest that complete or partial *DMRT1* deletions and inactivating mutations are not frequently found in patients with abnormalities of gonadal development. Additionally, none of the allelic variants identified in this cohort of patients could be considered a potential polymorphic susceptibility marker for gonadal dysgenesis.

Descriptors: 1. *Doublesex and-mab-3-related transcription factor 1* 2. Gene dosage 3. Sex development 4. 46,XY Gonadal dysgenesis

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sexual em mamíferos consiste num processo complexo que se inicia com o estabelecimento do sexo cromossômico (XX ou XY) na fecundação e completa-se nas duas etapas subsequentes denominadas determinação gonadal e diferenciação sexual.

A gônada fetal, estrutura fundamental no processo do desenvolvimento sexual em mamíferos, permanece indiferenciada até as primeiras semanas de gestação (até a 4ª semana em humanos) e é transformada em um órgão especializado, testículo-ovário, pela interação de inúmeros genes, fatores de transcrição e moléculas sinalizadoras durante o processo da determinação gonadal.

O desenvolvimento da gônada fetal masculina orienta a diferenciação do embrião no sentido masculino, secundariamente à ação dos hormônios produzidos pelo testículo fetal. Por outro lado, na ausência da gônada masculina e na presença de um ovário, de uma gônada disgenética ou na ausência de tecido gonadal, ocorre a diferenciação do embrião no sentido feminino. A diferenciação sexual feminina ocorre devido à ausência dos hormônios produzidos pelo testículo fetal, pela presença dos hormônios ovarianos e pela ação de genes envolvidos na via feminina do desenvolvimento sexual (1).

1.1 Determinação gonadal

A crista urogenital, localizada na superfície ventromedial dos mesonefros embrionários é constituída por células somáticas derivadas do mesoderma intermediário e é reconhecida no embrião humano a partir da 4ª semana após a fertilização. A crista urogenital é o precursor comum do sistema urinário e genital (2, 3).

A partir da 4ª até a 6ª semana de gestação, as células germinativas primordiais (CGPs), que se formaram no epiblasto durante a 2ª semana de gestação, completam a sua migração da base do alantoide, ao longo do tubo digestivo e através dos mesonefros até a região do primórdio genital (Figura 1) (2).

Figura 1 - Esquema de um embrião humano de 5 semanas de gestação, ilustrando a migração das CGPs oriundas do saco vitelino. A migração das CGPs ocorre ao longo do alantoide até o primórdio gonadal, localizado na superfície ventromedial dos mesonefros. Adaptado de Kousta, Papathanasiou e colaboradores (3).

Durante a migração, as CGPs sofrem diversos ciclos de divisão celular e ao alcançarem seu destino no primórdio genital perdem sua capacidade de motilidade (4).

No primórdio genital, originado da proliferação do mesotélio (epitélio celômico) em uma área restrita da face médio-lateral dos mesonefros ocorre gradualmente o desenvolvimento do tecido gonadal indiferenciado e bipotencial (Figura 2A) (5).

O início do desenvolvimento testicular é marcado pelo aparecimento das células de pré-Sertoli, originadas a partir da diferenciação das células do epitélio celômico (denominadas células somáticas) presentes na gônada indiferenciada (Figura 2B).

Figura 2 - Representação esquemática da organização celular do testículo fetal em desenvolvimento de camundongos. A, As células somáticas (representadas com núcleos em azul e vermelho) e as CGPs estão presentes na gônada bipotencial fetal, a qual está posicionada abaixo do epitélio celômico adjacente ao mesonefro durante o período embrionário 10 dias pós coito (d.p.c.). B, No período embrionário 12.5 d.p.c, forma-se o cordão testicular a partir da organização das células diferenciadas de Sertoli (verde) e das células mióides peritubulares (CMP; azul) que envolvem as CGPs. O cordão testicular constitui uma estrutura característica do testículo. As células de "Leydig", originadas a partir das células somáticas, estão representadas na cor rosa. Adaptado de Sekido e Lovell-Badge (6).

Na gônada fetal masculina, as células de pré-Sertoli proliferam e agregam-se ao redor das CGPs, formando uma estrutura semelhante a cordões, que posteriormente darão origem aos túbulos seminíferos. Os cordões testiculares contêm também as células mióides peritubulares (CMP), que migraram do mesonefro até a gônada. As CMPs juntamente com as células de pré-Sertoli desempenham um papel muito importante na formação da estrutura testicular (4). A interação entre as CMP e as células de pré-Sertoli é necessária para a formação da lâmina basal do cordão testicular e para a manutenção da integridade destas estruturas (7). Paralelamente, moléculas sinalizadoras secretadas pelas células de pré-Sertoli induzem a diferenciação das células de “Leydig” fetais (6).

As CGPs envolvidas pelos cordões testiculares permanecem no estágio G0/G1 do ciclo mitótico (ou período de quiescência) até após o nascimento (8, 9).

Especula-se que as células de Sertoli presentes na gônada fetal masculina sejam as responsáveis pelo efeito inibitorio do processo de divisão meiótica das células germinativas testiculares (10). Nos testículos, a enzima *Cyp26b1* (*Cytocromo P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1*), que é expressa pelas células de Sertoli, pode degradar o ácido retinoico (AR), uma molécula sinalizadora, responsável pela indução do processo de divisão celular meiótica. O AR regula a expressão de genes da via feminina, importantes no processo de diferenciação das células germinativas nos ovários embrionários (10).

A organização do testículo e do ovário parece depender do envolvimento das células germinativas. No entanto, experimentos em camundongos demonstraram que o progresso do desenvolvimento do testículo segue normalmente na ausência das células germinativas (11). Ao contrário, as unidades funcionais do ovário fetal (os folículos ovarianos) não se formam na ausência das células germinativas (8). No caso da perda dessas células após a formação dos folículos ovarianos, estes rapidamente se degeneram (12). Estes achados sugerem que as células germinativas são reguladores vitais na organização e manutenção da estrutura ovariana.

Da formação da crista urogenital até a fase final da determinação gonadal inúmeros genes autossômicos e dos cromossomos sexuais são expressos (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática da interação dos diversos genes envolvidos nas diferentes etapas da diferenciação sexual. A presença de mutações nestes genes pode determinar o desenvolvimento de doenças envolvendo os ductos müllerianos ou wolffianos, gônadas, rins e glândula adrenal como resultado da deficiência ou excesso de expressão destas proteínas. Adaptado de MacLaughlin e Donahoe (13).

A análise do padrão temporal e topográfico da expressão desses genes em camundongos indica que eles têm um papel importante na transformação da gônada indiferenciada para a gônada fetal masculina ou feminina (14-19). Alguns destes genes são importantes na regulação da expressão de outros genes que participam da cascata gênica masculinizante, como o *Wt1* (Wilms' tumor suppressor gene) e *Sf1/Nr5a1* (*steroidogenic factor 1/nuclear receptor subfamily 5, group a, member 1*). O *Wt1* parece estar envolvido no controle da expressão do *Sry* (*Sex determining region on the Y chromosome*) e *Amh* (*anti-müllerian hormone*) (20, 21) e age a montante dos genes *Sf1* e *Dax1/Nr0b1* (*Dosage sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenital critical region of the X chromosome 1/nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1*) (22). O *Sf1* prepara o ambiente para a expressão do *Sry* e age também auxiliando a expressão do *Amh*, que é o primeiro marcador da diferenciação testicular. Posteriormente, o gene *Sf1* regula a produção de esteroides pela célula de “Leydig” (23, 24). Na gônada feminina, o *Sf1* é expresso nas células da granulosa e teca e regula a esteroidogênese ovariana e a maturação dos folículos ovarianos (25-27).

1.1.1 Genes envolvidos no desenvolvimento testicular

Em mamíferos, a formação da gônada masculina a partir da gônada indiferenciada tem como fator determinante a presença do gene *Sry*, localizado no braço curto do cromossomo Y próximo da região pseudoautossômica Yp11.3 (28). Porém, o estudo do gene *SRY* nos

pacientes portadores de anormalidades do desenvolvimento gonadal masculino demonstrou que na grande maioria destes pacientes não era possível identificar anormalidades no *SRY*, descartando-o como o único fator causador dos distúrbios do desenvolvimento gonadal em indivíduos 46,XY. Estes achados determinaram a busca de outros genes envolvidos na formação da gônada masculina (6, 28, 29).

O gene *Sry* é expresso precocemente (10.5 e 11.5 d.p.c.) nas células de suporte precursoras das células de Sertoli e sua expressão marca o início do desenvolvimento testicular (Figura 3). O fator transcricional autossômico *Sry*-relacionado, *Sox9* (*Sry*,*-box containing 9*), é o principal alvo para a ação do *Sry* e as células que expressam o *Sox9* são capazes de induzir a migração das células somáticas a partir do mesonefro à gônada. Assim, observa-se que a expressão do *Sox9* é fortemente potencializada após o início da expressão do *Sry*. A estreita relação *Sry*-*Sox9* é confirmada por experimentos que mapeiam o destino das células gonadais, nos quais somente as células *Sry*-positivas tornam-se células de Sertoli *Sox9*-positivas (6, 10, 23).

O *Sox9* não é apenas necessário para a diferenciação masculina da gônada indiferenciada, mas parece ser um gene fundamental para ativação do restante da via de masculinização do tecido gonadal após a expressão do *Sry* (10).

Mais recentemente, a interação entre os genes *Sox9*, *Fgf9* (*Fibroblast growth factor 9*), *Fgfr2* (*Fibroblast growth factor receptor 2*), *Wnt4* (*Wingless-type mmtv integration site family, member 4*) e *Rspo1* (*R-spondin homolog 1*)

foi proposta como uma etapa importante na formação gonadal. O gene *Sox9* regula o gene *Fgf9*, que interage com o seu receptor *Fgfr2*, estimulando o aumento de sua expressão, além disso, o *Fgf9* mantém a expressão do *Sox9*, constituindo uma alça de estímulo positivo nas gônadas XY. Nessa situação o balanço entre os sinais *Fgf9* e *Wnt4* desvia-se em favor do *Fgf9*, estabelecendo o domínio da via masculina. Na ausência desta alça de retrocontrole positivo entre *Sox9* e *Fgf9*, o *Wnt4* bloqueia a expressão do *Fgf9*, iniciando a via feminina (10, 30, 31).

Uma vez que as células de Sertoli tenham se diferenciado, outros tipos celulares bipotenciais da gônada são direcionados a seguir a via de diferenciação masculina (32). A diferenciação das células de “Leydig” fetais, por exemplo, depende da sinalização parácrina da proteína extracelular *Dhh* (*Desert Hedgehog*), que é secretada pelas células de Sertoli (33). Em camundongos foi demonstrado que a diferenciação dos miócitos peritubulares e a consequente formação do cordão testicular é regulada pelo *Dhh* (34).

Gene *Doublesex and mab-3-related transcriptional factor 1 (Dmrt1)*

O gene *Dmrt1* pertence à família Dmrts, que nos vertebrados são genes expressos no tecido gonadal em desenvolvimento e na vida adulta e em outros tecidos (ocular, cerebral e medula espinal) (35).

O *Dmrt1* parece exercer a função de indutor testicular em algumas espécies de pássaros e peixes e nos animais invertebrados; função esta equivalente ao do *Sry* nos animais euterianos (36-38). A expressão do *Dmrt1*

regulada pela temperatura pode ser o primeiro sinal da cascata masculina em animais como tartarugas e crocodilos, cujo processo de determinação sexual é dependente deste fator ambiental (39, 40).

O *Dmrt1* é expresso em testículos de camundongos do período de 9.5 d.p.c até o período pós-natal e está envolvido nos processos de proliferação e sobrevivência das células germinativas bem como da organização dos túbulos seminíferos e manutenção funcional das células de Sertoli (41-45).

Nos camundongos XY que não expressam o *Dmrt1* observa-se a presença de testículos hipoplásicos com túbulos seminíferos desorganizados e células de Sertoli imaturas; as células germinativas sofrem apoptose e ocorre degeneração das células de “Leydig” por infiltração de macrófagos. Estes animais não desenvolvem tecido ovariano ou estruturas derivadas dos ductos Müller, nem apresentam anormalidades genitais. Nos camundongos XX que não expressam o gene ou expressam apenas um alelo apresentam ovários normais e são férteis (41). Esse modelo experimental permite sugerir um papel importante do gene *Dmrt1* no momento crítico dos processos de maturação das células de Sertoli e de divisão celular e sobrevivência das células germinativas.

Estudos recentes demonstraram que o *Dmrt1* está envolvido nos mecanismos de controle do ciclo de divisão celular das células germinativas. O *Dmrt1* parece regular a expressão de genes como o *Stra8* (*Stimulated by retinoic acid gene 8 homolog*) e *Sohlh1* (*Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1*) que são importantes na transição do

processo de divisão celular mitótica para a divisão celular meiótica das células germinativas (46).

O *Stra8* é expresso no mesmo período que o *Dmrt1* (13.5 d.p.c) e é o fator responsável pela ativação do ciclo meiótico das células germinativas XX induzido pelo AR. Estudos com camundongos fêmeas mutantes revelaram que a presença do *Dmrt1* leva à redução da expressão do *Stra8*, gerando uma pró-fase meiótica anormal e, conseqüentemente, a formação de um número reduzido de folículos ovarianos (47).

Nos embriões XY, as células germinativas embrionárias permanecem na fase G0/G1 do ciclo celular mitótico e a meiose inicia-se somente após o nascimento, quando o gene *Stra8* é ativado (48). O *Dmrt1* age nas espermatogônias diminuindo a capacidade de resposta ao AR, reprime diretamente a transcrição do *Stra8*, e ativa a transcrição do fator de diferenciação das espermatogônias (Sohlh1) impedindo assim a meiose e promovendo o desenvolvimento das espermatogônias (46) A supressão do *DMRT1* interrompe o desenvolvimento das células germinativas antes da formação das espermatogônias, causando azoospermia completa (44, 49).

Assim, sugere-se que o *Dmrt1* nos mamíferos tem um papel regulador chave do controle do desenvolvimento e diferenciação das espermatogônias, estabelecendo a opção da divisão celular por mitose versus divisão celular meiótica para as células germinativas masculinas dos mamíferos (46).

No período pós-natal, a ausência do *Dmrt1* na gônada masculina permite um aumento na expressão do gene *Foxl2* (*Forkhead box L2*), o que determina a diferenciação das células de Sertoli em células da granulosa,

célula típica do folículo ovariano. Por outro lado, na presença de uma falha na expressão gênica da via feminina, com a perda do gene *Foxl2*, as células da granulosa são capazes de diferenciar-se em células de Sertoli (50, 51). Portanto, o *Dmrt1* parece ser um antagonista do *Foxl2*, e vice-versa, o que representa mais uma etapa crítica do complexo equilíbrio da expressão gênica das vias masculina e feminina do desenvolvimento gonadal.

1.2 Diferenciação sexual

Durante a formação gonadal bipotencial, os ductos genitais internos de Wolff (mesonéfrico) e Müller (paramesonéfrico) originam-se de estruturas pareadas sendo idênticos até 7ª semana de gestação (52).

A regressão dos ductos de Muller ocorre pela ação do hormônio anti-mülleriano (HAM) secretado pelas células de Sertoli do testículo fetal. A partir da 8ª semana de gestação, as células de “Leydig” secretam a testosterona, que induz a masculinização das estruturas genitais internas pela ação local deste hormônio nos ductos de Wolff (5). Até a 13ª semana de gestação, a diferenciação da genitália interna masculina se completa com a formação do epidídimo, vasos deferentes, vesículas seminais e próstata (53).

Na ausência dos hormônios secretados pelo testículo fetal, os ductos de Müller se desenvolvem originando os órgãos genitais internos femininos (útero, trompas uterinas e porção superior da vagina) e os ductos de Wolff não se diferenciam e regridem (12, 54, 55).

A genitália externa fetal primariamente idêntica em ambos os sexos vai se diferenciar em masculina ou feminina pela ação ou ausência de ação hormonal masculina respectivamente. Pela ação da dihidrotestosterona (DHT), hormônio resultante da conversão da testosterona pela ação da enzima 5-alfa-redutase, o turbéculo genital dá origem à glândula do pênis e alonga-se juntamente com as pregas uretrais para formar o corpo do pênis, enquanto as pregas labioescrotales crescem unindo-se na linha mediana formando a bolsa escrotal (55-57).

Na ausência de ação androgênica ocorre o desenvolvimento da genitália externa feminina. O turbéculo genital alonga-se levemente formando o clitóris. O seio urogenital permanece aberto e um septo vesicovaginal é formado entre as porções genital e uretral, separando a abertura da vagina posterior e da uretra anteriormente. As pregas uretrais formarão os pequenos lábios e as pregas labioescrotales aumentam sem se fundirem dando origem aos grandes lábios (58, 59). O processo de formação da genitália externa masculina e feminina se completa na 12ª semana de gestação (53, 55).

1.3 Distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS)

O termo distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) inclui as condições congênitas nas quais o desenvolvimento do sexo cromossômico, sexo gonadal ou do sexo anatômico é atípico (60).

1.3.1 Distúrbios do desenvolvimento gonadal

Disgenesia gonadal 46,XY

As disgenesias gonadais (DG), subgrupo dos DDS 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal, são classificadas nas formas completa e parcial.

A forma completa é caracterizada pela presença de genitália externa e interna feminina, ausência do desenvolvimento de caracteres sexuais secundários, estatura normal ou alta e presença de gônadas disgenéticas (“em fita”) bilaterais.

A forma parcial é caracterizada pelo desenvolvimento parcial dos testículos, com consequente deficiência na produção dos hormônios testiculares fetais. Como resultado do déficit da produção hormonal testicular ocorre o desenvolvimento das estruturas derivadas dos ductos de Müller, por falta da ação adequada do hormônio antimulleriano, além de uma virilização incompleta da genitália externa por deficiência androgênica. O fenótipo de ambiguidade genital com um largo espectro de apresentação ocorre nestes pacientes (61).

A disgenesia gonadal constitui um distúrbio heterogêneo e pode estar associada a outras características sindrômicas como malformações esqueléticas, renais, cardíacas e deficiência mental entre outras. Mutações inativadoras nos genes *SRY* e *SF1/NR5A1* são os diagnósticos moleculares mais comumente identificados nos pacientes com DG 46,XY não sindrômica (23, 62-64). Mutações nos genes *WT1* (Síndrome de Denys-Drash, Síndrome de Fraiser e WAGR), *SOX9* (Displasia campomélica), *GATA4*

(*GATA-binding factor 4*; Doença cardíaca congênita), *DHH* (Neuropatia minifascicular), entre outros genes, foram identificadas em pacientes com DG 46,XY associadas a outras manifestações sindrômicas (61).

1.4 Síndrome da deleção do braço curto do cromossomo 9

Pacientes portadores da síndrome da deleção do braço curto do cromossomo 9 (9p) ou monossomia do 9p apresentam como características comuns: anomalias cranifaciais típicas (trigonocefalia, nariz triangular e pequeno, pescoço curto e largo, fissuras palpebrais pequenas), anormalidades gonadais (genitália externa feminina ou masculina com criptorquidismo nos pacientes 46,XY), cardíacas (valvulopatia ou defeitos septais) e retardo mental moderado a grave (65-67). Deleções completas ou parciais no cromossomo 9p foram descritas em indivíduos XY com disgenesia gonadal (DG) sindrômica e não-sindrômica (68).

Os avanços nas técnicas de citogenética e de investigação molecular possibilitaram localizar na região 9p21 a 9p24 o sítio deletado responsável pelas anormalidades presentes na síndrome. A haploinsuficiência dos genes contidos nesta região estaria relacionada à etiologia da doença.

Dentre os genes presentes na região 9p21 a 9p24 estão três membros da família dos *DMRTs*, os genes *DMRT1*, *DMRT3* e *DMRT2*. Alterações limitadas ao gene *DMRT1* foram identificadas em pacientes portadores de disgenesia gonadal 46,XY, ratificando seu envolvimento no desenvolvimento testicular humano (69-72).

1.4.1 *DMRT1* em Humanos

Raymond e colaboradores mapearam, pela técnica de hibridização 'in situ' fluorescente (FISH), o gene *DMRT1* na região 9p24.3 (36).

O *DMRT1* (NM_021951; ENSG00000137090) possui 5 éxons que codifica três transcritos: o primeiro com o tamanho de 2.222 pares de bases (pb) que é traduzido numa proteína de 373 aminoácidos (aa), o segundo de 1385 pb que é traduzido em uma proteína de 215 aa e o terceiro de 692 pb que é traduzido numa proteína de 174 aa (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática do gene *DMRT1*.

A proteína DMRT1 possui um domínio de ligação ao DNA conhecido como domínio DM que compreende a sequência de aminoácidos 72-118 (36, 73). Este domínio DM consiste numa sequência de ligação ao DNA rica em cisteínas, que possui uma estrutura com dois átomos de zinco localizada na porção N terminal de alta afinidade ao DNA. Na proteína DMRT1 humana, os dois zínco estão presentes na região do DM denominada sinal de localização nuclear (SLN), situada entre os aminoácidos 89 e 104. Essa

região é reconhecida pela importina beta, proteína responsável pelo transporte do DMRT1 do citoplasma para o núcleo da célula (73). A proteína DMRT1 também possui uma região rica em serina e prolina (Ser/Pro), localizada na porção C terminal (na posição 322-347 aa), conhecida como domínio de transativação (36). A proteína DMRT1, dimeriza-se por meio do reconhecimento da região C terminal pelo domínio DM, resultando em aumento de afinidade ao DNA e da especificidade da reação. A homodimerização ou heterodimerização entre as proteínas DMRTs contribui para a regulação transcricional (74).

A região promotora proximal do *DMRT1* é pouco conhecida. Diversos sítios regulatórios (inibitórios e estimulatórios) foram identificados na região 5' não traduzida do *Dmrt1* de camundongos. Um sítio regulador para a ligação do fator transcricional *Sp1* (*Stimulating protein 1*) foi identificado nesta região e é uma sequência homóloga em humanos. O Sp1 parece estar envolvido na manutenção da expressão do *Dmrt1* nas células de Sertoli (75).

Raymond e colaboradores descreveram a primeira mutação de ponto (p.P295L) no gene *DMRT1* em um indivíduo Afro-Americano com DG 46,XY não sindrômica (70). A atividade funcional da proteína DMRT1 mutada não foi estudada.

Posteriormente, Calvari e colaboradores identificaram a primeira deleção submicroscópica (com cerca de 700 kilobases) restrita ao gene *DMRT1* em dois irmãos com DGC 46,XY. Essa mesma deleção foi encontrada na mãe dos pacientes que apresentava fenótipo normal (71). Vinci e colaboradores descreveram uma família portadora de uma deleção

restrita ao gene *DMRT1*. O paciente apresentava DG 46,XY e autismo, e sua mãe portadora da mesma deleção desenvolveu falência ovariana prematura (76).

Mais recentemente, Mello e colaboradores identificaram uma pequena inserção (c.*11_*12insT) na região 3' não traduzida do *DMRT1* em um paciente com DGP 46,XY (77). Essa inserção está localizada numa região altamente conservada e os estudos nos programas de predição sugerem que a nova variante alélica poderia comprometer a estabilização do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) ou formar uma proteína DMRT1 alterada que poderia ocorrer secundariamente a esta inserção, devido a uma modificação do sítio de "splicing".

A haploinsuficiência dos genes da região 9p, envolvidos no processo de determinação gonadal, aparentemente podem causar anormalidades no desenvolvimento sexual tanto em indivíduos XX (78, 79) como em indivíduos XY (67) com um amplo espectro de apresentação fenotípica desses pacientes secundário a graus variados de comprometimento da função gonadal.

As descrições na literatura de pacientes com DG portadores de deleções restritas ao gene *DMRT1* são pouco frequentes e os achados de mutações neste gene ainda mais raros (Anexo A, Tabela 1).

Apesar das fortes evidências em estudos com modelos animais da importância do gene *Dmrt1* no processo do desenvolvimento gonadal em mamíferos, o real papel do *DMRT1* no desenvolvimento testicular e ovariano em humanos ainda não foi completamente esclarecido (41, 42, 80). Como

relatamos anteriormente, as descrições de pacientes com anormalidades no gene *DMRT1* na literatura ainda são esporádicas, apesar do aprimoramento das técnicas laboratoriais utilizadas na pesquisa clínica (Anexo A, Tabela 1) (68, 70, 71, 81).

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Pesquisar variações no número de cópias gênicas e mutações inativadoras na região codificadora no gene *DMRT1* em pacientes portadores de DDS 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3 PACIENTES E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM-42) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), após da aprovação pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do HC e da FMUSP, protocolo nº 0649/09.

Todos os pacientes participantes deste estudo ou seus responsáveis assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido segundo as normas do Comitê de Ética permitindo a coleta de amostras de sangue e análise do DNA delas extraído.

3.1 Casuística

Trinta e nove pacientes com diagnóstico de DDS 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal foram selecionados no ambulatório de Endocrinologia do Desenvolvimento (A1MN1003) da Disciplina de Endocrinologia do HCFMUSP para o estudo. Este diagnóstico baseou-se na avaliação clínica, hormonal, citogenética, radiológica e histológica dos pacientes (Anexo A, Tabelas 2 e 3).

Os pacientes foram divididos nos subgrupos:

- Disgenesia Gonadal XY – forma completa (DGC) = 15
 - Disgenesia Gonadal XY – forma parcial (DGP) = 24
-

Todos os pacientes apresentavam cariótipo 46,XY no estudo realizado em linfócitos de sangue periférico pela técnica de coloração convencional e bandamento G (50 células analisadas) (82).

Alterações nos genes: *SRY*, *SF1*, *WT1*, *DHH*, *GATA4*, *WNT4/RSPO1*, *DAX1* foram excluídas nestes pacientes em estudos anteriores.

3.2 Avaliação clínica e hormonal

Todos os pacientes selecionados para o estudo foram submetidos ao exame clínico geral, com cuidadosa avaliação da genitália externa. A pesquisa da presença de consanguinidade e de outros indivíduos afetados na família foi realizada durante o interrogatório dos antecedentes familiares dos pacientes.

A avaliação hormonal dos pacientes foi realizada pelas dosagens basais de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e testosterona (T). O teste de estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG) foi realizado na maioria dos pacientes. Dados apresentados nas Tabelas 2 e 3 (Anexo A).

O teste de estímulo com gonadotrofina coriônica humana extraída (hCG) consistiu na aplicação intramuscular (IM) de uma única dose de 6000 UI de hCG nos pacientes púberes e na aplicação IM de 4 doses da medicação nas doses de 50 a 100 UI/kg de peso por dose com intervalos de 4 dias em pacientes pré-púberes. As dosagens hormonais foram realizadas previamente ao uso da medicação (basal) e 72 ou 96 horas após a última injeção IM de hCG, conforme teste padronizado neste hospital (83).

3.3 Grupo de indivíduos controles

Cem homens e cinquenta mulheres adultos normais foram selecionados para constituir o grupo controle para análise de variantes alélicas e/ou numéricas identificadas no estudo do gene *DMRT1*. O DNA destes indivíduos está armazenado no banco de DNAs do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM-42) HC-FMUSP.

Uma paciente portadora da síndrome de deleção do 9p, cujo cariótipo era 46,XY,der(9)t(2;9)(p21;p24), foi utilizada como controle positivo na análise de variantes numéricas do gene *DMRT1*. Esta paciente não é acompanhada no Hospital das Clínicas da FMUSP.

3.4 Análise molecular

3.4.1 Extração de DNA a partir de sangue periférico

As amostras do DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos pacientes e familiares selecionados. Foram colhidos 15 mL de sangue venoso em ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM) e submetidos ao método de extração com NaCl saturado modificado (84). Esta técnica consiste em duas etapas de lise de hemácias (NH_4Cl 114 mM; NH_4HCO_3 1 mM) e uma etapa de lise de leucócitos (NaCl 150 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0) utilizando SDS (0,2%) e proteinase K (160 $\mu\text{g/mL}$). A precipitação do DNA foi feita com etanol absoluto gelado seguida de 3 lavagens com etanol 70%, finalizando com sua suspensão em TE (10 mM TrisHCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0).

A concentração do DNA foi medida em espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Alemanha) no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260 = 50 µg/mL). A relação acima de 1,75 entre as leituras 260 e 280 nm foi considerada ideal para caracterizar a pureza do material (85). As amostras foram mantidas a 4°C até sua utilização.

3.4.2 Amplificação de DNA genômico por reação de polimerização em cadeia (PCR).

A análise da sequência do gene *DMRT1* foi realizada pela amplificação do DNA genômico por reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando-se pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos localizados em regiões intrônicas seguido do sequenciamento direto das amostras amplificadas.

Os oligonucleotídeos para os 5 éxons traduzidos do gene *DMRT1* (Anexo A, Tabela 4) foram construídos a partir do estudo de Vinci et al. (76) e revisados utilizando-se a sequência genômica do *DMRT1* (NM_021951.2/ENSG00000137090) do banco de dados “Ensembl” (www.ensembl.org/index.html). Os oligonucleotídeos para a região promotora proximal do *DMRT1* (Anexo A, Tabela 4), situada entre -304 pb e -316 pb na região reguladora do Sp1 antes do início da transcrição de acordo com o programa “MotifFinder”, foram construídos a partir do programa “Primer3” (<http://frodo.wi.mit.edu/>).

As reações foram realizadas num volume final de 25 µL utilizando-se 100-300 ng de DNA genômico, 200 µmol de dNTPs, 10 pmol de cada

oligonucleotídeo iniciador, KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; Tris-HCl 10 mM pH 9,0 e 1,25 U da enzima “Taq DNA polimerase” (Promega, Corporation, WI, EUA). As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador Veriti ou um ABI 9700 (Life Technology, Foster City, CA, EUA).

As PCRs da região promotora proximal e de todos os éxons do *DMRT1* seguiram o seguinte protocolo: um ciclo inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos compostos por: 95 °C por 1 minuto, uma etapa de hibridação dos oligonucleotídeos com temperatura (53 a 68° C) e tempo variáveis (30 segundos a 1,30 minutos) dependendo do par de oligonucleotídeos (Anexo A, Tabela 4) e uma fase de extensão a 72 °C por 1 minuto, finalizando com um ciclo a 72 °C por 10 minutos (76).

Os produtos amplificados foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbada, CA, EUA) a 1% em TAE (Tris 0,004 M; ácido acético glacial; EDTA 0,001 M; pH 8,0) contendo 0,01% de “SYBR Safe DNA Gel Stain” (Invitrogen, Eugene, USA), visualizados em um transiluminador com luz ultravioleta e documentados em um sistema de documentação de imagens (Ultra Lum Inc., CA, EUA).

3.4.3 Sequenciamento automático

A concentração de DNA dos produtos gerados pela PCR foi determinada pela comparação entre a intensidade de sinal emitido pelos fragmentos amplificados e a intensidade de sinal dos fragmentos de 500 ng do marcador de peso molecular Φ X174/*HaeIII* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em gel de agarose.

Cerca de 30 ng dos produtos de PCR foram submetidos à purificação enzimática com 10 U da enzima “ExoSAP-IT” (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 15 minutos a uma temperatura de 37 °C, seguida por 15 minutos a 80 °C.

Após a purificação, estes produtos foram submetidos ao sequenciamento direto utilizando-se o “kit” “ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1” (Life Technology, Foster City, CA, EUA). Trinta nanogramas de produto de PCR purificado, 1 µL de “BigDye Terminator”, 1 µL de tampão de sequenciamento, 10 pmol de um dos oligonucleotídeos iniciadores para cada éxon (Tabela 4, Anexo A) e 3,5 µL de água Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) foram submetidos ao protocolo de sequenciamento que consistiu em 25 ciclos a 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos, realizado em um termociclador Veriti ou ABI 9700 (Life Technology, Foster City, CA, EUA).

Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados conforme o protocolo do isopropanol/etanol. Para isso, os produtos foram transferidos para uma placa de 96 poços (“MicroAmp optical 96-well Reaction Plate”, Life Technology, Foster City, CA, EUA) e 80 µL de isopropanol a 75% foram acrescentados a cada poço. Após permanecer 10 minutos em repouso, essas amostradas foram submetidas a uma centrifugação a 3.700 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa e 150 µL de etanol 70% foi adicionado a cada poço. A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos a 3.700 rpm a temperatura ambiente e o sobrenadante foi

descartado. A placa permaneceu invertida em temperatura ambiente, protegida da luz, até que o álcool evaporasse totalmente.

Quinze μL de formamida (Life Technology, Foster City, CA, EUA) foram acrescentados a cada poço, em seguida esse material foi submetido a uma eletroforese capilar no sequenciador automático “ABI Prism 3100 Genetic Analyzer” (Life Technology, Foster City, CA, EUA). A análise dos dados foi realizada utilizando o programa “Sequencher v.4,8” (Genecodes Corporation, Ann Arbor MI, EUA).

3.5 Análise ‘in silico’

Os programas de predição que foram utilizados para analisar as novas variantes alélicas encontradas entre os pacientes selecionados foram os seguintes: “Human Splice Finder” (86), “Mutation Taster” (87) e “1000 Genomes” (88).

O programa de predição “Human Splice Finder” (<http://www.umd.be/HSF/>) foi utilizado para a identificação e análise de sítios de “splicing” alternativos. O programa “Mutation taster” (<http://neurocore.charite.de/MutationTaster/index.html>) foi utilizado para analisar se a região é conservada entre as espécie, predizer um novo sítio de “splice” e se a estrutura da proteína pode ser comprometida e identifica SNPs. O programa “1000 Genomes” (<http://www.1000genomes.org/ensembl-browser>) foi utilizado para pesquisar a frequência das variantes alélicas previamente descritas e compará-las com os achados deste estudo.

O programa “MotifFinder” (<http://www.genome.jp/tools/motif/>) foi utilizado para identificar sítios de ligação dos elementos reguladores na região promotora proximal do gene *DMRT1*.

3.6 Análise estatística

Estudos da associação entre os polimorfismos do *DMRT1* e os pacientes portadores de DG 46.XY e o grupo controle foram realizados pelo teste do qui-quadrado (χ^2) para amostras categóricas, como apropriado. O valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa “SigmaStat” para Windows (version 2.03; SPSS, Inc., San Rafael, CA, USA). Todos os polimorfismos estavam dentro dos valores de proporção de Hardy-Weinberg.

3.7 “Multiplex ligation-dependent probe amplification” (MLPA)

As etapas para a realização da técnica de MLPA (89) seguiram as instruções do “kit SALSA MLPA P334-A1 Gonadal Development Disorder” (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda). Este “kit” contém 10 sondas para a análise do gene *DMRT1* (duas sondas para cada éxon), além das sondas para *CYP17A*, *SRD5A2*, *HSD17B3* e “sondas referência”. Este “kit” também possui 9 fragmentos controles para avaliar a eficiência da reação: 4 para verificar se a quantidade de DNA genômico foi suficiente para a reação (fragmentos com tamanhos de 64, 70, 76 e 82 nucleotídeos), 3 para analisar se a desnaturação do DNA foi completa ou não (88, 92 e 96 nucleotídeos), 2

para identificar a presença dos cromossomos sexuais (X - 100 nucleotídeos e Y - 105 nucleotídeos).

As amostras de DNA utilizadas para o MLPA foram previamente submetidas à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 1% em TAE (Tris 0,0004 M; Ácido Acético Glacial; EDTA 0,001 M pH 8,0) contendo 10% de “SYBR Safe DNA Stain” e 500 ng do marcador de peso molecular λ HindIII e 20 ng do λ DNA, sendo observadas num transiluminador com luz ultravioleta a fim de verificar sua integridade e concentração.

Cerca de 100 ng de DNA genômico dos pacientes foi diluído em água Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) em um volume final de 5 μ L. Em um termociclador (9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), os tubos com 5 μ L de DNA diluído foram incubados por 10 minutos a 98 °C, a fim de ocorrer a desnaturação. A temperatura foi diminuída para 25 °C e foram acrescentadas 3 μ L do “mix” de sondas, preparado a partir de 1,5 μ L do “Salsa probe mix” e 1,5 μ L do tampão MLPA. Essa mistura foi submetida por um minuto a temperatura de 95 °C, seguida por 16 horas a 60 °C, para que as sondas hibridassem aos seus respectivos alvos.

Após as 16 horas de incubação, a temperatura foi reduzida para 54 °C. Nesta temperatura, 32 μ L do “mix ligase-65”, preparado a partir 3 μ L do tampão ligase-65 A, 3 μ L do tampão ligase-65 B, 1 μ L da ligase-65 e 25 μ L de água Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) foram adicionados a cada tubo. Estes foram incubados a 54 °C por 15 minutos para ocorrer a

ligação das sondas previamente hibridadas e, em seguida, a 98 °C por 5 minutos, para a inativação das enzimas restantes.

Dez µL do produto de ligação foram transferidos para um novo tubo contendo 30 µL do “mix PCR”, preparado a partir de 4 µL do tampão “Salsa PCR” e 26 µL de água Milli-Q. Este tubo foi colocado no termociclador a 60 °C e mantido nesta temperatura enquanto se adicionou 10 µL do “mix polimerase”, que contém 2 µL de “Salsa PCR primers”, 2 µL do tampão “Salsa enzyme dilution”, 0,5 µL da enzima “Salsa polimerase” e 5,5 µL de água Milli-Q. Nessa etapa, se iniciou a reação de amplificação por PCR das sondas ligadas. O protocolo de amplificação consistiu em 35 ciclos de 95 °C, temperatura de hibridação dos “primers” de 60 °C e 72 °C, durante 30 segundos para cada temperatura, mais um ciclo final de extensão a 72 °C por 20 minutos.

Todas as amostras amplificadas foram submetidas a uma eletroforese capilar no sequenciador automático “ABI Prism 3100 Genetic Analyzer” (Life Techonolgy, Foster City, CA, EUA) e analisadas pelo programa análise de fragmentos “GeneScan” (Life Technology, Foster City, CA, EUA). Os dados obtidos pelo “GeneScan” foram analisados pelo programa “MCR Coffalyzer” (MCR Holland, Amsterdam, Holanda), que determina a relação das áreas dos picos de interesse com as áreas dos picos das regiões controle, considerando um pico como sendo normal quando a razão entre essas áreas estiver entre 0,7 e 1,3, perda no número de cópias (deleção) quando for inferior a 0,7 e ganho no número de cópias (duplicação) quando for superior a 1,3.

Quatro indivíduos foram utilizados como grupo controle para validação da reação e análise dos pacientes, sendo três indivíduos normais (como controle negativo) e uma paciente portadora de síndrome da deleção do 9p e comprovada redução do número de cópias de genes da região 9p (como controle positivo).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Estudo de dosagem gênica do *DMRT1*

O estudo de dosagem do gene *DMRT1* pela técnica de MLPA nestes 39 pacientes portadores DDS 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal não identificou nenhuma alteração de dosagem, deleções ou amplificações, nesse gene. Os resultados estão representados nas Figuras 5 e 6.

Figura 5 - Resultado da análise de MLPA de um indivíduo controle que apresenta número normal de cópias do *DMRT1* (éxons 1-5). As análises de MLPA foram feitas utilizando o programa “Coffalyser”. As relações entre 0,7 e 1,3 indicam número normal de cópias, abaixo de 0,7 indicam deleção da região e acima de 1,3 indicam duplicação da região.

Figura 6 - A, Resultado da análise de MLPA de um indivíduo controle que apresenta redução no número de cópias do *DMRT1* (éxons 1-5). **B,** Paciente que apresenta número normal de cópias do *DMRT1* (éxons 1-5). Análises do MLPA foram feitas utilizando o programa “Coffalyser”, que gerou os gráficos acima. As relações entre 0,7 e 1,3 indicam número normal de cópias, abaixo de 0,7 indica deleção da região e acima de 1,3 indica duplicação da região.

4.2 Pesquisa de mutações no gene *DMRT1*

Identificamos 8 variantes alélicas do gene *DMRT1* em 18 dos 39 pacientes estudados, sendo uma variante alélica nova (c.968-15insTTCTCTCT) e sete variantes previamente descritas (Anexo B, Tabela 5).

Uma nova variante alélica, c.968-15insTTCTCTCT, no gene *DMRT1* foi identificada em heterozigose em cinco pacientes com DG 46,XY (pacientes 2, 14, 21, 24, 30) (Anexo B, Tabela 5) e em 43 dos 150 indivíduos controles. As frequências genotípica e alélica estão apresentadas nas Tabelas 6 e 7 (Anexo B).

Essa variante resulta da inserção de oito pares de bases (pb) antes da posição 968 do início do éxon 5 (Figura 7). A análise ‘in silico’ desta variante alélica realizada no programa “Human Splice Finder” sugere uma alteração no sítio de “splice” (“Intronic splice silence” – ISS) na sequência intrônica do gene *DMRT1*.

Figura 7 - Eletroferograma da sequência do intron 4 do *DMRT1*, mostrando a região da inserção de oito nucleotídeos anterior ao início do éxon 5, a qual determina uma mudança no quadro de leitura da sequência gênica. Localização da nova variante na região intrônica indicada por uma seta preta.

As duas variantes c.-14C>T (rs373984) e c.133T>A (rs372983) foram identificadas em heterozigose em sete pacientes (pacientes 7, 21, 22, 26, 32, 35, 39) e em homozigose em um paciente (paciente 30) (Anexo B, Tabela 5, 6 e 7). A variante c.-14C>T resulta na troca de uma citosina por uma timina na posição 14 antes do códon de início de transcrição (ATG). Por sua vez, a variante c.133T>A resulta na troca de uma timina para adenina na posição 133 do cDNA, acarretando a troca benigna do aminoácido serina por uma treonina na posição 45 da proteína (p.Ser45Thr) (Figura 8). Análise de predição 'in silico' sugeriu que essa variante (c.133T>A) altera o sítio de "splice" na região exônica do gene *DMRT1*. As frequências genotípica e alélica estão apresentadas nas Tabelas 6 e 7 (Anexo B).

Figura 8 - Eletroferograma da sequência da região 5' não traduzida e do éxon 1 do gene *DMRT1*. **A**, Indivíduos controles 1 e 2. **B**, Pacientes que apresentaram as substituições c.-14T>C e c.133T>A.

Outra variante alélica previamente descrita, c.774G>C (rs146975077), foi identificada em heterozigose em apenas um paciente com DGP 46,XY (paciente 26), não sendo identificada em nenhum dos indivíduos controles. Essa variante c.774G>C está localizada no éxon 3 do gene *DMRT1* e resulta na troca de uma guanina por uma citosina na posição 774 do cDNA, não alterando a sequência da proteína DMRT1 (p.Arg258=) (Figura 9, Tabela 5, 6 e 7). Análise de predição ‘in silico’ sugeriu que essa variante resultaria na alteração de um sítio de “splice” (“Exonic splice enhancer” – ESE) na região exônica deste gene. As frequências genotípica e alélica estão apresentadas nas Tabelas 6 e 7 (Anexo B).

Figura 9 - Eletróferograma da sequência do éxon 3 do *DMRT1*, mostrando o polimorfismo c.774G>C em heterozigose no paciente 26 e em seu pai. O polimorfismo não foi identificado na mãe. A localização da troca do nucleotídeo está indicada por uma caixa vermelha.

A análise de segregação familiar mostrou que somente o pai do paciente apresentava as variantes alélicas c.774G>C, c.-14C>T e

c.*11_*12insT no gene *DMRT1*. Todas as 4 variantes alélicas foram identificadas em heterozigose no paciente.

Esse paciente é filho de pais consanguíneos (primos de segundo grau) e possui em seus antecedentes a presença de um irmão natimorto com fenótipo sindrômico (malformações anais e renais) e ambiguidade genital.

A variante alélica c.*11_*12insT (rs112920071) foi identificada em heterozigose em três pacientes com DGP 46,XY (pacientes 25, 26 e 29) e em homozigose em outros três pacientes (pacientes 4, 27, 28), sendo identificada em heterozigose em 28,2% (11/150) e em homozigose em 5% (2/150) dos indivíduos controles (Anexo B, Tabela 6). A variante resulta na inserção de uma timina entre os nucleotídeos 11 e 12 após o códon de terminação (Figura 10). As frequências genotípica e alélica estão apresentadas nas Tabelas 6 e 7 (Anexo B). Os dados clínicos e hormonais do paciente 26 estão descritos nas Tabelas 3 (Anexo B).

Figura 10 - Eletroferograma da sequência da região 3' não traduzida do *DMRT1*. A localização da sequência com alteração c.*11_*12insT em heterozigose (acima) e em homozigose (abaixo) são indicados pela caixa preta.

As demais variantes alélicas, c.663T>C (rs16925431), c.783C>T (rs34946058) e c.1037A>G (rs35846503) foram identificadas nos éxons 3 e 5, respectivamente. A frequência genotípica e alélica dessas variantes esta apresentada nas Tabelas 6 e 7 (Anexo B).

Nenhuma alteração foi identificada na sequência reguladora, sítio de ligação do Sp1, localizada entre as posições entre -304 pb e -316 pb na região promotora proximal do gene *DMRT1*.

5 DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Apesar da disponibilidade das novas técnicas de pesquisa de anormalidades gênicas, a etiologia molecular dos distúrbios do desenvolvimento sexual é esclarecida em aproximadamente 20% dos casos (60).

Nos DDS 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal não relacionados a quadros sindrômicos, as mutações inativadoras nos genes *SRY* e *SF1/NR5A1* são as causas moleculares mais frequentemente identificadas (23, 62-64). Mutações ou alterações no número de cópias de outros genes envolvidos na cascata gênica da determinação gonadal como *WT1*, *DHH*, *GATA4*, *DAX1*, *CBX2* (*Chromobox homolog 2*), entre outros, também são identificadas em um pequeno número de pacientes portadores de DG 46,XY isolada (90-94).

A presença de anormalidades gonadais em pacientes 46,XY portadores da síndrome da deleção do 9p, com perda da região 9p24.3, onde o gene *DMRT1* está localizado, é bem conhecida (60), porém são raros os relatos de pacientes com DG XY sem outras características sindrômicas e com deleções restritas ao *DMRT1* (68, 71, 72).

Um estudo recente utilizando a técnica de detecção por hibridização genômica comparativa em microarranjos de DNA (Array-CGH) avaliou a presença de microdeleções e duplicações numa coorte de 87 pacientes sindrômicos e não-sindrômicos portadores de DG 46,XY e estabeleceu a causa da doença em 25% (4/16) dos pacientes sindrômicos e em 5,6% (4/71) dos pacientes não sindrômicos (Anexo A, Tabela 1). As alterações

mais frequentemente encontradas neste estudo foram deleções na região cromossômica 9p, sítio do *DMRT1*, porém dos 4 casos identificados, em apenas uma paciente com DGC isolada foi identificada uma deleção restrita aos éxons 1 e 2 do *DMRT1* (68).

Alterações no número de cópias do gene *DMRT1* não foram identificadas nos 39 pacientes com DG 46,XY isolada avaliados pela técnica de MLPA neste estudo, confirmando os relatos prévios de que deleções submicroscópicas do *DMRT1* são achados incomuns nos pacientes com DG 46,XY não sindrômica.

A presença de mutações inativadoras no gene *DMRT1* também constitui um achado raro. Uma única variante alélica, a p.Pro773Leu (no éxon 4 no *DMRT1*), foi associada à etiologia de pacientes portadores de sexo reverso 46,XY por Raymond e colaboradores. Porém, apesar desta variante não ter sido encontrada em nenhum indivíduo controle da população Americana estudada, não é possível descartar a possibilidade de tratar-se de uma variante alélica polimórfica, já que estudos funcionais desta proteína *DMRT1* não foram realizados (70).

Diversas variantes alélicas no *DMRT1* foram identificadas e algumas destas variantes têm sido associadas a um risco aumentado para o desenvolvimento de tumores de células germinativas testiculares em humanos (95, 96).

Neste estudo, foram identificadas 8 variantes alélicas no *DMRT1*, 7 das quais previamente descritas na literatura.

A nova variante alélica identificada, c.968-15insTTCTCTCT, foi analisada no programa “Human Splice Finder” e a análise ‘in silico’ sugeriu a possível criação de um novo sítio de “splice” (“Intronic splice silence” – ISS) na sequência intrônica do *DMRT1*. Este novo sítio de “splice” poderia determinar a formação de um novo transcrito da proteína DMRT1, que poderia interferir no desenvolvimento gonadal normal.

Um complexo padrão de expressão da proteína DMRT1, envolvendo a produção de transcritos alternativos, foi demonstrado em gônadas masculinas de camundongos (97). Alguns destes transcritos foram gerados por “splicing” alternativo no 3'UTR ou como resultado da exonização de introns. Além disso, múltiplas isoformas de transcritos do DMRT1 foram caracterizadas em testículos humanos por Cheng e colaboradores, sugerindo a participação de diferentes isoformas do DMRT1 no processo de formação testicular (98).

A variante c.968-15insTTCTCTCT foi identificada com maior frequência nos indivíduos controles (frequência genotípica de 28,6% e alélica de 14,3%) do que nos pacientes (frequência genotípica de 12% e alélica de 6,4%), porém sem significância estatística ($p=0,07$ para a frequência genotípica e $p=0,09$ para a frequência alélica).

Na análise de segregação familiar observou-se (na família 2, pacientes 14 e 15) que esta variante foi identificada em apenas uma das irmãs portadoras de DGC (paciente 15), o que afasta a possível associação desta variante no gene *DMRT1* como a causa etiológica do distúrbio gonadal nesta família.

As variantes c.-14T>C e c.133T>A foram identificadas com maior frequência nos indivíduos controles (frequência genotípica de 84% e alélica de 16%) do que nos pacientes (frequência genotípica de 88,5% e alélica 11,5%) e a análise estatística de associação entre estes dois polimorfismos e os pacientes estudados não revelou significância estatística ($p=0,59$ e $p=0,42$ para a frequência genotípica e frequência alélica respectivamente). Na análise de segregação familiar observou-se (na família 4, pacientes 34 e 35) que estas variantes foram identificadas em apenas um membro da família (paciente 35), o que afasta a possível associação destas variantes com o fenótipo dos pacientes.

A análise 'in silico' das variantes alélicas c.-14C>T e c.133T>A, realizada nos programas "Human Splice Finder" e "Mutation Taster", sugeriu a formação de um novo sítio de "splice" apenas para a variante c.133T>A (escore 0.95 no "Mutation Taster") o qual poderia determinar a formação de um novo transcrito da proteína DMRT1.

A variante alélica c.774G>C (rs146975077) foi identificada em apenas um paciente portador de DGP (paciente 26). A análise 'in silico' desta variante nos programas "Human Splice Finder" e "Mutation Taster" sugeriu a formação de um novo sítio de "splice" que, como na variante anteriormente descrita, poderia determinar a formação de um novo transcrito da proteína DMRT1.

Esta variante alélica é rara e predomina na população africana numa frequência de 2,6%. Ela está descrita no banco de dados "1000 Genomes", com uma frequência do alelo C de 0.006 contra 0.994 do alelo G e uma

frequência do genótipo C/G de 0.011 contra 0.988 do G/G. Corroborando com a descrição do banco de dados, a frequência do alelo C encontrada em nossos pacientes foi de 0.013 contra 0.987 do alelo G e o genótipo C/G tem a frequência de 0.026 contra apenas 0.974 do G/G.

Na análise de segregação familiar do paciente (número 26) observamos que o pai e o filho afetado são heterozigotos para a mesma variante. Pai e filho ainda apresentam outras duas variantes (c.-14C>T e c.*11_*12insT) no gene *DMRT1*. Os achados no estudo de segregação familiar não sugerem uma associação da variante c.774G>C no *DMRT1* com a etiologia da anomalia testicular neste paciente. As possíveis repercussões da presença dos vários polimorfismos do *DMRT1* neste paciente não foram esclarecidas.

A variante alélica c.*11_*12insT (rs112920071) foi anteriormente identificada por Mello e colaboradores em um paciente portador de DGP 46,XY (77). A inserção da base timina está localizada numa região muito conservada da 3'UTR do *DMRT1*, uma pequena sequência conservada (CUGCUGCCGAU), que participa do processo de estabilização do RNAm durante o desenvolvimento gonadal (99). A região onde ocorre a variante c.*11_*12insT é reconhecida como um "Exonic Splicing Enhancer" pelo algoritmo "PSEX" ("Putative Exonic Splicing Enhancers/Silencers") (100). A análise 'in silico' da variante alélica utilizando o programa "ESEfinder 3.0" (101, 102) indica a abolição de um sítio de reconhecimento da proteína SC35 ("Splicing Component-35"). A proteína SC35 é membro da família de proteínas ricas em serina e prolina que são importantes reguladores do

“splicing” alternativo e participam dos processos do metabolismo do RNAm (103).

Baseados nestes estudos, Mello e colaboradores sugeriram que esta variante alélica poderia alterar o processo normal de formação das isoformas do DMRT1 e/ou interferir na estabilização do RNAm secundariamente a uma anormalidade na ligação proteica na região mutada, levando à degradação do RNAm. Estas alterações na proteína DMRT1 causariam o desenvolvimento anormal do testículo e o fenótipo do paciente descrito (77).

De acordo com o banco de dados “1000 Genomes”, a frequência do alelo T é de 0.500 contra a frequência do alelo –T de 0.500; entretanto, os dados foram baseados na avaliação de apenas 2 indivíduos africanos. Em nossos pacientes a frequência alélica dessa variante foi maior (11%) do que encontrada nos indivíduos controles (5%). Nos controles, a variante alélica foi identificada em heterozigose (28%) e em homozigose (5%). Embora o alelo T inserido tenha sido encontrado mais frequentemente nos indivíduos afetados do que na população controle, a análise estatística não revelou uma diferença significativa entre os grupos ($p=0,08$ para a frequência genotípica e $p=0,06$ para frequência alélica), indicando que essa variante é um polimorfismo presente na população brasileira. Estes achados enfraquecem a hipótese de que a variante alélica c.*11_*12insT esteja associada à etiologia molecular da disgenesia gonadal 46,XY.

Semelhantemente às demais variantes identificadas no *DMRT1*, a análise estatística não demonstrou associação dos polimorfismos c.-14C>T e c.133T>A e aumento no risco de desenvolvimento de disgenesia gonadal

($p=0,59$ e $p=0,42$ para a frequência genotípica e frequência alélica respectivamente).

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. Este estudo confirma os relatos da literatura de que deleções parciais ou completas no *DMRT1*, bem como mutações inativadoras, não são causas comuns de DG 46,XY.
 2. Nenhuma das 8 variantes alélicas identificadas nesta coorte de pacientes pode ser associada a um risco aumentado para o desenvolvimento de disgenesia gonadal 46,XY.
 3. As regiões reguladoras e intrônicas do gene *DMRT1* não foram avaliadas neste estudo; portanto, não é possível excluir definitivamente sua participação na etiologia do desenvolvimento testicular anormal destes pacientes.
-

7 ANEXO A

Tabela 1 - Frequência das deleções restritas e das variantes alélicas no gene *DMRT1*, identificadas em pacientes portadores de DG 46,XY (sindrômicos e não sindrômicos) descritas na literatura.

Referência	Deleções n(%)	Mutações (<i>missense</i>) n(%)
Raymond et al. 1999 (70)	0/87	1/87 (1,1%)
Calvari et al. 2000 (71)	2/30 (6,7%)	0/42
Ledig et al. 2010 (68)	1/87 (1,1%)	NA
Mello et al. 2010 (77)	NA	1/1 (100%)
Tannour-Louet et al. 2010 (72)	1/116 (0,9%)	NA

* NA: Não Avaliado

Tabela 2 - Dados clínicos, hormonais e histológicos dos pacientes com disgenesia gonadal completa 46,XY.

Caso	Sexo social	Idade da 1ª avaliação	Consaguinidade familiar	Genitália externa	LH UI/L	FSH UI/L	Testo basal ng/dL	Testo após hCG ng/dL	AP Gônada	Der Muller	Der Wolff
1	F	17	S	F	27	81	NR	NR	D(bilat)	+	+
2	F	24	N	F	23*	65*	22	22	D(bilat)	+	-
3	F	24	S	F	9	41	<14	NR	D(bilat)	+	+
4	F	23	N	F	21	76	35	NR	D(bilat)	+	-
5	F	22	N	F	18	75	<14	NR	D(bilat)	+	-
6	F	19	S	F	14	75	14	NR	D(bilat)	+	+
7 ^a (f1)	F	16	N	F	5,5	27	11	NR	ND	+	ND
8 ^a (f1)	F	11	N	F	2	3	<10	NR	ND	+	ND
9	F	45	S	F	14*	56*	34	<14	D(bilat)	+	+
10	F	25	N	F	32	47	55	NR	D(bilat)	+	A
11	F	32	NI	F	13	44	NR	NR	D(bilat)	+	+
12	F	21	N	F	36	68	51	NR	A	+	A
13	F	20	N	F	9	80	NR	NR	D(bilat)	+	A
14 ^a (f2)	F	21	S	F	72	184	22	NR	D(bilat)	+	+
15 ^a (f2)	F	13	S	F	34	159	22	NR	D(bilat)	+	+
Valores		Normais	IFME*	Crianças	0,6-1,3*	1,0-3,1*					
				Adultos	1,4-9,2*	1,0-12*					
			RIE	Crianças	1,0-10	1,0-10	<30	391±129			
				Adultos	1,0-10	1,0-10	441-925	1306±577			

^a casos familiares; F-feminino; NI- não informado; * IFME- método imunofluorométrico; método radioimunoensaio; NR - exame não realizado; N- Não; S- Sim; LH- Hormônio Luteinizante; FSH- Hormônio Folículo Estimulante; hCG- Gonadotrofina coriônica humana; Testo: Testosterona; AP- Anátomo Patológico; Der Müller- Derivados Müllerianos; Der Wolff- Derivados Wolffianos; D: Gônada disgenética; ND- material não disponível; bilat- bilateral.

Tabela 3 - Dados clínicos, hormonais e histológicos dos pacientes com disgenesia gonadal parcial 46,XY.

Caso	Sexo social	Idade da 1ª avaliação	Consanguinidade familiar	Genitália externa	LH UI/L	FSH UI/L	Testo basal ng/dL	Testo após hCG ng/dL	AP Gônada	Der Muller	Der Wolff
16 ^a (f3)	F	10	N	Amb	5*	50*	116	NR	T(bilat)	+	-
17 ^a (f3)	F	0,2	N	Amb	1	<1	98	574	T(bilat)	+	+
18	F	2	N	Amb	27	98	25	15	D(bilat)	+	+
19	M	5	N	Amb	<0,6*	<1*	<14*	494	ND	+	-
20 ^b	M	0,9	N	Amb	<0,6	<1	<14	800	D(dir)	+	-
21	M	23	N	Amb	11	29	420	468	D(esq) +T(dir)	+	+
22 ^b	M	34	S	Amb	10	78	75	NR	ND	+	+
23 ^b	M	16	NI	Amb	NR	NR	NR	NR	ND	+	ND
24	F	1,7	N	Amb	<0,6*	3*	11	107	T(bilat)	-	+
25 ^b	M	7,3	N	Amb	NR	NR	NR	NR	T(bilat)	-	+
26	M	0,8	S	Amb	NR	NR	310	NI	T(bilat)	+	-
27	M	21	N	Amb	16,5	49	<14	<14	A	A	A
28 ^a	M→F	1,8	N	Amb	NR	NR	<10	14	A(esq) +D(dir)	+	+
29	M	1,8	N	Amb	28	87	16	9	A(bilat)	+	+
30 ^b	F	38	N	Amb	8	42	24	NR	ND	ND	ND
31 ^b	F	43	N	Amb	32	52	324	NR	A(esq) +T(dir)	+	+
32 ^b	M	3,5	N	Amb	3*	88*	<10	29	A(bilat)	-	+

33	F	15	N	Clitorom	74	96	36	40	A(esq) +T(dir)	+	+
34 ^a (f4)	M	11,5	N	Amb	20	41	<7	NR	A(bilat)	-	+
35 ^a (f4)	F	18	N	Clitorom	43	97	14	NR	T(esq) +A(dir)	-	+
36	M→F	4	S	Amb	3,5	87	30	<10	D(esq) +A(dir)	+	-
37	M	34	N	Amb	NR	NR	42	493	T(esq) +D(dir)	ND	ND
38	M	15	N	Amb	12	28	24	197	T+D(dir)	+	+
39	M	14	N	Amb	3,5	87,5	<10	29	A(bilat)	+	+
Valores		Normais	IFME*	Crianças	0,6-1,3*	1,0-3,1*					
				Adultos	1,4-9,2*	1,0-12*					
			RIE	Crianças	1,0-10	1,0-10	<30	391±129			
				Adultos	1,0-10	1,0-10	441-925	1306±577			

^a casos familiares; ^b manipulação cirúrgica prévia; F- Feminino, M-Masculino, M→F- mudança de sexo social de masculino para feminino; NI- não informado; NR - exame não realizado; Amb: genitália ambígua; Clitorom- clitoromegalia; LH - Hormônio Luteinizante; FSH; Hormônio Folículo Estimulante; Testo- Testosterona; hCG- Gonadotrofina coriônica humana; * IFME- método imunofluorométrico; RIE-método radioimunoensaio; AP-Anátomo patológico; T- Testículo disgenético; D- Gônada disgenética; A- Gônada ausente; ND- material não disponível; Der Müller- Derivados Müllerianos; Der Wolff: Derivados Wolffianos; bilat- bilateral; dir-direito; esq-esquerdo

Tabela 4 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos cinco éxons e região reguladora situada na região promotora proximal do *DMRT1*

Exon	DMRT1 F 5' 3'	DMRT1 R 5' 3'	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura para hibridação
RP	GTATCTCTCGGTGCGCTTG	GGTTGTGCCTTTTCTTTTGG	204	60
1	GGC AGA CCT CGC CAC TCC AG	AAG GCT GAA CCC GGG CTC CC	544	68
2	TCT GTG TTT TGG CAA AGC TG	CTG CTT CTG TGG CTG CAA	321	57
3	GCA GGT CTT GGG TAG GAA GG	CAT GTG GCT TTC ACA CAA CC	422	62
4	CAA GGT GTC GGG AAC ATA GG	CTC TCT CAA CCC CAA ATC CA	319	57
5	GGA GAG CGT CAC TTT CTT TGT T	CCA TGC AGA TGG TAG TCA CG	467	53

RP: região promotora; F: Forward; R: Reverse

8 ANEXO B

Tabela 5 - Variantes alélicas identificadas no gene *DMRT1* nos pacientes portadores de DG 46,XY estudados.

Pacientes	Localização	ID da variante alélica*	Troca nucleotídica (cDNA)	Troca de aminoácido	SIFT	Polyphen
7, 21, 22, 26, 30, 32, 35, 39	5' UTR	rs3739584	-14C>T			
7, 21, 22, 26, 30, 32, 35, 39	Exon 1	rs3739583	133T>A	Ser45Thr	benigna	benigna
15, 25, 27, 35	Exon 3	rs16925431	663T>C	Tyr221=		
26		rs146975077	774G>C	Arg258=		
25		rs34946058	783C>T	Pro261=		
2, 14, 21, 24, 30	Intron 4	Nova	968-15insTTCTCTCT			
9	Exon 5	rs35846503	1037A>G	Lys346Arg	benigna	benigna
4, 25, 26, 27, 38, 29	3' UTR	rs112920071	*11_*12insT			

UTR: região não traduzida; ID: identificação; SIFT (Sorting of tolerant and intolerant) e Polyphen (Polymorphism phenotyping): programas de predição dos efeitos funcionais de variantes alélicas.

Tabela 6 - Frequência genotípica e alélica das variantes alélicas do *DMRT1* identificadas em pacientes com DG46,XY e controles.

ID da variante alélica	Troca nucleotídica	Genótipo						Alelo			
		Pacientes n(%)			Controles n(%)			Pacientes n(%)		Controles n(%)	
rs3739584	-14C>T	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	C	T	C	T
		31 (79,5%)	7 (17,9%)	1 (2,6%)	107 (71,3%)	38 (25,3%)	5 (3,3%)	69 (88,5%)	9 (11,5%)	252 (84%)	48 (16%)
rs3739583	133T>A	A/A	A/T	T/T	A/A	A/T	T/T	A	T	A	T
		31 (79,5%)	7 (17,9%)	1 (2,6%)	107 (71,3%)	38 (25,3%)	5 (3,3%)	69 (88,5%)	9 (11,5%)	252 (84%)	48 (16%)
rs16925431	663T>C	T/T	T/C	C/C	T/T	T/C	C/C	T	C	T	C
		35 (89,7%)	4 (10,2%)		146 (97,3%)	4 (26,6%)		74 (94,9%)	4 (5,2%)	296 (98,6%)	4 (13,3%)
rs146975077	774G>C	G/G	G/C	C/C				G	C		
		38 (97,4%)	1 (2,6%)					77 (98,7%)	1 (1,3%)		
rs34946058	783C>T	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	C	T	C	T
		38 (97,4%)	1 (2,6%)		148 (98,6%)	2 (1,3%)		77 (98,7%)	1 (1,3%)	298 (99,3%)	2 (0,6%)
Nova	968-15insTTCTCTCT	C/C	-/TTCTCTCT	-	C/C	/TTCTCTCT	-	C	-	C	-
		34 (87,2%)	5 (12,8%)		107 (71,3%)	43 (28,6%)		73 (93,6%)	5 (6,4%)	257 (85,6%)	43 (14,3%)
rs35846503	1037A>G	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	A	G	A	G
		38 (97,4%)	1 (2,6%)		144 (96%)	6 (4%)		77 (98,7%)	1 (1,3%)	294 (98%)	6 (2%)
rs112920071	*11_*12insT	T/T	-/T	-	T/T	/T	-	T	-	T	-
		33 (84,6%)	3 (7,7%)	3 (7,7%)	137 (91,3%)	11 (28,2%)	2 (5%)	69 (88,5%)	9 (11,5%)	285 (95%)	15 (5%)

ID: identificação

Tabela 7 - Frequência alélica das variantes alélicas do *DMRT1* identificadas nos pacientes com DG46,XY e em populações de diferentes origens étnicas.

ID da variante alélica	Troca nucleotídica	Africanos		Caucasianos		Asiáticos		Dados deste estudo	
		n	Frequência	n	Frequência	n	Frequência	n	Frequência
rs3739584	-14C>T	492	13%	361	19%	572	45%	78	11%
rs3739583	133T>A	492	13%	361	2%	572	45%	78	11%
rs16925431	663T>C	492	8%	361	2%			78	5%
rs146975077	774G>C	492	2,6%	361	0,3%			78	1%
rs34946058	783C>T	492	6%	361	3%			78	1%
Nova	968-15insTTCTCTCT							78	6%
rs35846503	1037A>G	492	8%	361	0,8%			78	1%
rs112920071	*11_*12insT	4	50%					78	11%

ID: identificação; Todos os dados populacionais foram retirados do banco de dados "1000 Genomes"

9 REFERÊNCIAS

1. Jost A. A new look at the mechanisms controlling sex differentiation in mammals. *Johns Hopkins Med J.* 1972;130(1):38-53.
2. Sadler TW. *Embriologia médica*. 11 ed. Koogan G, editor. Rio de Janeiro; 2010.
3. Kousta E, Papathanasiou A, Skordis N. Sex determination and disorders of sex development according to the revised nomenclature and classification in 46,XX individuals. *Hormones.* 2010;9(3):218-131.
4. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev.* 2007;87(1):1-28.
5. Cummings AM, Kavlock RJ. Function of sexual glands and mechanism of sex differentiation. *J Toxicol Sci.* 2004;29(3):167-78.
6. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends Genet.* 2009;25(1):19-29.
7. Piprek RP. Molecular and cellular machinery of gonadal differentiation in mammals. *Int J Dev Biol.* 2010;54(5):779-86.
8. McLaren A. Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol.* 1984;38:7-23.
9. McLaren A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol.* 2003;262(1):1-15.
10. Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):509-21.

11. Merchant H. Rat gonadal and ovarioan organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev Biol.* 1975;44(1):1-21.
12. Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, Palmiter RD, Brinster RL. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance. *Nature.* 1990;345(6271):167-70.
13. MacLaughlin DT, Donahoe PK. Sex determination and differentiation. *N Engl J Med.* 2004;350(4):367-78.
14. Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, et al. The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature.* 2000;403(6772):909-13.
15. Pelletier J, Schalling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman D. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev.* 1991;5(8):1345-56.
16. Viger RS, Mertineit C, Trasler JM, Nemer M. Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Mullerian inhibiting substance promoter. *Development.* 1998;125(14):2665-75.
17. De Grandi A, Calvari V, Bertini V, Bulfone A, Peverali G, Camerino G, et al. The expression pattern of a mouse doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation. *Mech Dev.* 2000;90(2):323-6.
18. Pellegrini M, Pantano S, Lucchini F, Fumi M, Forabosco A. Emx2 developmental expression in the primordia of the reproductive and excretory systems. *Anat Embryol.* 1997;196(6):427-33.

19. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*. 1994;77(4):481-90.
20. Miyamoto Y, Taniguchi H, Hamel F, Silversides DW, Viger RS. A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol Biol*. 2008;9:44.
21. Bradford ST, Wilhelm D, Bandiera R, Vidal V, Schedl A, Koopman P. A cell-autonomous role for WT1 in regulating Sry in vivo. *Hum Mol Genet*. 2009;18(18):3429-38.
22. Wilhelm D, Englert C. The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev*. 2002;16(14):1839-51.
23. Kashimada K, Koopman P. Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development*. 2010;137(23):3921-30.
24. Pilon N, Daneau I, Paradis V, Hamel F, Lussier JG, Viger RS, et al. Porcine SRY promoter is a target for steroidogenic factor 1. *Biol Reprod*. 2003;68(4):1098-106.
25. Hinshelwood MM, Repa JJ, Shelton JM, Richardson JA, Mangelsdorf DJ, Mendelson CR. Expression of LRH-1 and SF-1 in the mouse ovary: localization in different cell types correlates with differing function. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;207(1-2):39-45.
26. Tajima K, Dantes A, Yao Z, Sorokina K, Kotsuji F, Seger R, et al. Down-regulation of steroidogenic response to gonadotropins in human

- and rat preovulatory granulosa cells involves mitogen-activated protein kinase activation and modulation of DAX-1 and steroidogenic factor-1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(5):2288-99.
27. Pelusi C, Ikeda Y, Zubair M, Parker KL. Impaired follicle development and infertility in female mice lacking steroidogenic factor 1 in ovarian granulosa cells. *Biol Reprod.* 2008;79(6):1074-83.
 28. Sinclair A, Berta P, Palmer M, Hawkins J, Griffiths B, Smith M, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 1990;346(6281):240-4.
 29. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature.* 1991;351(6322):117-21.
 30. Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier MC, et al. Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol.* 2006;4(6):e187.
 31. Kim Y, Bingham N, Sekido R, Parker KL, Lovell-Badge R, Capel B. Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(42):16558-63.
 32. McLaren A, Southee D. Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev Bio.* 1997;187(1):107-13.
 33. Yao HH, Whoriskey W, Capel B. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev.* 2002;16(11):1433-40.

34. Clark AM, Garland KK, Russell LD. Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod.* 2000;63(6):1825-38.
35. Hong CS, Park BY, Saint-Jeannet JP. The function of Dmrt genes in vertebrate development: it is not just about sex. *Dev Biol.* 2007;310(1):1-9.
36. Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J, et al. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature.* 1998;391(6668):691-5.
37. Guo Y, Cheng H, Huang X, Gao S, Yu H, Zhou R. Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish Dmrt1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;330(3):950-7.
38. Zhao Y, Lu H, Yu H, Cheng H, Zhou R. Multiple alternative splicing in gonads of chicken DMRT1. *Dev Genes Evol.* 2007;217(2):119-26.
39. Anand A, Patel M, Lalremruata A, Singh A, Agrawal R, Singh L, et al. Multiple alternative splicing of Dmrt1 during gonadogenesis in Indian mugger, a species exhibiting temperature-dependent sex determination. *Gene.* 2008;425(1-2):56-63.
40. Kettlewell JR, Raymond CS, Zarkower D. Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation. *Genesis.* 2000;26(3):174-8.

41. Raymond C, Murphy M, O'Sullivan M, Bardwell V, Zarkower D. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* 2000;14(20):2587-95.
42. Lei N, Hornbaker KI, Rice DA, Karpova T, Agbor VA, Heckert LL. Sex-specific differences in mouse DMRT1 expression are both cell type- and stage-dependent during gonad development. *Biol Reprod.* 2007;77(3):466-75.
43. Morrish BC, Sinclair AH. Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction.* 2002;124(4):447-57.
44. Kim S, Bardwell VJ, Zarkower D. Cell type-autonomous and non-autonomous requirements for Dmrt1 in postnatal testis differentiation. *Dev Biol.* 2007;307(2):314-27.
45. Fahrioglu U, Murphy M, Zarkower D, Bardwell V. mRNA expression analysis and the molecular basis of neonatal testis defects in Dmrt1 mutant mice. *Sex Dev.* 2007;1(1):42-58.
46. Matson CK, Murphy MW, Griswold MD, Yoshida S, Bardwell VJ, Zarkower D. The mammalian doublesex homolog DMRT1 is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells. *Dev Cell.* 2010;19(4):612-24.
47. Krentz AD, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D. DMRT1 promotes oogenesis by transcriptional activation of Stra8 in the mammalian fetal ovary. *Dev Biol.* 2011;356(1):63-70.
48. Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(8):2474-9.

49. Krentz A, Murphy M, Kim S, Cook M, Capel B, Zhu R, et al. The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009.
50. Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, et al. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*. 2009;139(6):1130-42.
51. Matson CK, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*. 2011;476(7358):101-4.
52. Parker KL, Schimmer BP. Genes essential for early events in gonadal development. *Ann Med*. 2002;34(3):171-8.
53. Moore KL, Hay JC. The developing human; clinically oriented embryology. Philadelphia: Saunders; 1973.
54. Drews U, Sulak O, Oppitz M. Immunohistochemical localisation of androgen receptor during sex-specific morphogenesis in the fetal mouse. *Histochem Cell Biol*. 2001;116(5):427-39.
55. Sajjad Y. Development of the genital ducts and external genitalia in the early human embryo. *J Obstet Gynaecol Res*. 2010;36(5):929-37.
56. Siiteri PK, Wilson JD. Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1974;38(1):113-25.
57. Wilson JD, Griffin JE, Russell DW. Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Endocr Rev*. 1993;14(5):577-93.

58. O'Rahilly R. The development of the vagina in the human. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1977;13(2):123-36.
59. Sobel V, Zhu YS, Imperato-McGinley J. Fetal hormones and sexual differentiation. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2004;31(4):837-56, x-xi.
60. Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA, Group LWPESESfPEC. Consensus statement on management of intersex disorders. *J Pediatr Urol.* 2006;2(3):148-62.
61. Mendonca B, Domenice S, Arnhold I, Costa E. 46,XY disorders of sex development (DSD). *Clin Endocrinol.* 2009;70(2):173-87.
62. Paliwal P, Sharma A, Birla S, Kriplani A, Khadgawat R. Identification of novel SRY mutations and SF1 (NR5A1) changes in patients with pure gonadal dysgenesis and 46,XY karyotype. *Mol Hum Reprod.* 2011;17(6):372-8.
63. Köhler B, Lin L, Ferraz-de-Souza B, Wieacker P, Heidemann P, Schröder V, et al. Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46,XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency. *Hum Mutat.* 2008;29(1):59-64.
64. Lin L, Philibert P, Ferraz-de-Souza B, Kelberman D, Homfray T, Albanese A, et al. Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46,XY disorders of sex development with normal adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(3):991-9.
65. Alfi OS, Donnell GN, Allderdice PW, Derencsenyi A. The 9p-syndrome. *Ann Genet.* 1976;19(1):11-6.

-
66. Huret JL, Leonard C, Forestier B, Rethoré MO, Lejeune J. Eleven new cases of del(9p) and features from 80 cases. *J Med Genet.* 1988;25(11):741-9.
 67. Swinkels ME, Simons A, Smeets DF, Vissers LE, Veltman JA, Pfundt R, et al. Clinical and cytogenetic characterization of 13 Dutch patients with deletion 9p syndrome: Delineation of the critical region for a consensus phenotype. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(11):1430-8.
 68. Ledig S, Hiort O, Scherer G, Hoffmann M, Wolff G, Morlot S, et al. Array-CGH analysis in patients with syndromic and non-syndromic XY gonadal dysgenesis: evaluation of array CGH as diagnostic tool and search for new candidate loci. *Hum Reprod.* 2010;25(10):2637-46.
 69. Veitia R, Nunes M, Brauner R, Doco-Fenzy M, Joanny-Flinois O, Jaubert F, et al. Deletions of distal 9p associated with 46,XY male to female sex reversal: definition of the breakpoints at 9p23.3-p24.1. *Genomics.* 1997;41(2):271-4.
 70. Raymond CS, Parker ED, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, Kusz K, et al. A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum Mol Genet.* 1999;8(6):989-96.
 71. Calvari V, Bertini V, De Grandi A, Peverali G, Zuffardi O, Ferguson-Smith M, et al. A new submicroscopic deletion that refines the 9p region for sex reversal. *Genomics.* 2000;65(3):203-12.
 72. Tannour-Louet M, Han S, Corbett ST, Louet JF, Yatsenko S, Meyers L, et al. Identification of de novo copy number variants associated with

- human disorders of sexual development. PLoS One. 2010;5(10):e15392.
73. Ying M, Chen B, Tian Y, Hou Y, Li Q, Shang X, et al. Nuclear import of human sexual regulator DMRT1 is mediated by importin-beta. Biochim Biophys Acta. 2007;1773(6):804-13.
74. Murphy MW, Zarkower D, Bardwell VJ. Vertebrate DM domain proteins bind similar DNA sequences and can heterodimerize on DNA. BMC Mol Biol. 2007;8:58.
75. Lei N, Heckert LL. Sp1 and Egr1 regulate transcription of the Dmrt1 gene in Sertoli cells. Biol Reprod. 2002;66(3):675-84.
76. Vinci G, Chantot-Bastaraud S, El Houate B, Lortat-Jacob S, Brauner R, McElreavey K. Association of deletion 9p, 46,XY gonadal dysgenesis and autistic spectrum disorder. Mol Hum Reprod. 2007;13(9):685-9.
77. Mello MP, Coeli FB, Assumpção JG, Castro TM, Maciel-Guerra AT, Marques-de-Faria AP, et al. Novel DMRT1 3'UTR+11insT mutation associated to XY partial gonadal dysgenesis. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2010;54(8):749-53.
78. Ogata T, Muroya K, Ohashi H, Mochizuki H, Hasegawa T, Kaji M. Female gonadal development in XX patients with distal 9p monosomy. Eur J Endocrinol. 2001;145(5):613-7.
79. Fujimoto Y, Okuyama T, Iijima M, Tanaka T, Horikawa R, Yamada K, et al. Genitourinary phenotype in XX patients with distal 9p monosomy. Mol Genet Metab. 2004;82(2):173-9.

80. Matson CK, Zarkower D. Sex and the singular DM domain: insights into sexual regulation, evolution and plasticity. *Nat Rev Genet.* 2012;13(3):163-74.
81. Tannour-Louet M, Han S, Corbett ST, Louet JF, Yatsenko S, Meyers L, et al. Identification of de novo copy number variants associated with human disorders of sexual development. *PLoS One.* 2010;5(10):e15392.
82. Beiguelman B. *Citogenética Humana* 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.
83. Mendonca BB, Inacio M, Costa EM, Arnhold IJ, Silva FA, Nicolau W, et al. Male pseudohermaphroditism due to steroid 5alpha-reductase 2 deficiency. Diagnosis, psychological evaluation, and management. *Medicine.* 1996;75(2):64-76.
84. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
85. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 3, editor. New York; 2001.
86. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(9):e67.
87. Schwarz JM, Rödelberger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods.* 2010;7(8):575-6.

88. Consortium GP. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010;467(7319):1061-73.
89. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(12):e57.
90. Das DK, Sanghavi D, Gawde H, Idicula-Thomas S, Vasudevan L. Novel homozygous mutations in Desert Hedgehog gene in patients with 46,XY complete gonadal dysgenesis and prediction of its structural and functional implications by computational methods. *Eur J Med Genet*. 2011; 54(6):e529-34.
91. Lourenco D, Brauner R, Rybczynska M, Nihoul-Fekete C, McElreavey K, Bashamboo A. Loss-of-function mutation in GATA4 causes anomalies of human testicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(4):1597-602.
92. Melo KF, Martin RM, Costa EM, Carvalho FM, Jorge AA, Arnhold IJ, et al. An unusual phenotype of Frasier syndrome due to IVS9 +4C>T mutation in the WT1 gene: predominantly male ambiguous genitalia and absence of gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(6):2500-5.
93. Domenice S, Correa RV, Costa EM, Nishi MY, Vilain E, Arnhold IJ, et al. Mutations in the SRY, DAX1, SF1 and WNT4 genes in Brazilian sex-reversed patients. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(1):145-50.
94. Biason-Lauber A, Konrad D, Meyer M, DeBeaufort C, Schoenle EJ. Ovaries and female phenotype in a girl with 46,XY karyotype and mutations in the CBX2 gene. *Am J Hum Genet*. 2009;84(5):658-63.

95. Turnbull C, Rapley EA, Seal S, Pernet D, Renwick A, Hughes D, et al. Variants near DMRT1, TERT and ATF7IP are associated with testicular germ cell cancer. *Nat Genet.* 2010;42(7):604-7.
96. Kanetsky PA, Mitra N, Vardhanabhuti S, Vaughn DJ, Li M, Ciosek SL, et al. A second independent locus within DMRT1 is associated with testicular germ cell tumor susceptibility. *Hum Mol Genet.* 2011;20(15):3109-17.
97. Lu H, Huang X, Zhang L, Guo Y, Cheng H, Zhou R. Multiple alternative splicing of mouse Dmrt1 during gonadal differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;352(3):630-4.
98. Cheng HH, Ying M, Tian YH, Guo Y, McElreavey K, Zhou RJ. Transcriptional diversity of DMRT1 (dsx- and mab3-related transcription factor 1) in human testis. *Cell Res.* 2006;16(4):389-93.
99. Herpin A, Nakamura S, Wagner T, Tanaka M, Scharf M. A highly conserved cis-regulatory motif directs differential gonadal synexpression of Dmrt1 transcripts during gonad development. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(5):1510-20.
100. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3568-71.
101. Zhang XH, Chasin LA. Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing. *Genes Dev.* 2004;18(11):1241-50.

102. Zhang XH, Kangsamaksin T, Chao MS, Banerjee JK, Chasin LA. Exon inclusion is dependent on predictable exonic splicing enhancers. *Mol Cell Biol.* 2005;25(16):7323-32.
103. Manley JL, Tacke R. SR proteins and splicing control. *Genes Dev.* 1996;10(13):1569-79.