ROSANA BARBOSA SILVA

**Distúrbio do desenvolvimento sexual 46,XX testicular
SRY negativo sindrômico devido à mutação *missense* no
gene *RSPO1*: estudo clínico, molecular e histológico de
grande família consanguínea brasileira**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Elaine Maria Frade Costa

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Rosana Barbosa

Distúrbio do desenvolvimento sexual 46, XX testicular *SRY* negativo sintômico devido à mutação *missense* no gene *RSPO1*: estudo clínico, molecular e histológico de grande família consanguínea brasileira / Rosana Barbosa Silva. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Elaine Maria Frade Costa.

Descritores: 1.Transtornos testiculares 46, XX do desenvolvimento sexual
2.Processos de determinação sexual 3.Ceratoderma palmar e plantar 4.Genética 5.Via de sinalização Wnt 6.Beta catenina 7.Fatores de transcrição SOX9 8.Imuno-histoquímica 9.Expressão gênica 10.Modelos moleculares

USP/FM/DBD-265/15

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42, Divisão de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Auxílio à Pesquisa Regular, processo nº 2011/10089-3) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; bolsa de doutorado, processo nº 33002010062P5)

Dedicatória

Aos meus pais, Antônio e Auta,
ao meu esposo Bruno e
aos meus filhos Helena e David.

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Elaine Maria Frade Costa, agradeço a atenção dedicada, o apoio e a confiança em mim depositados. Pessoa afável e de convívio agradável, mulher dedicada à família e aos pacientes, realizada no exercício de suas atividades profissionais e na vida pessoal, me ensinou que é possível equilibrar vida pessoal e profissional e desempenhar as duas funções, de mãe e profissional médica.

À Prof.^a Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, pelas discussões e sugestões sempre muito pertinentes e, principalmente, pela oportunidade de desenvolver o projeto de doutorado no Grupo de Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios. A realização desse projeto de doutorado não seria possível sem o apoio de dezenas de profissionais que compõem a sua equipe, os quais me ajudaram muito ao longo de todas as etapas deste trabalho.

À Dra. Sorahia Domenice, profissional competente, dedicada e generosa, agradeço por todos os momentos de discussão profissional e por ter me proporcionado momentos de grande aprendizado pessoal.

À Dra. Luciani Carvalho, pesquisadora dedicada e competente, que me contagiou com seu amor à pesquisa científica. Sua orientação foi imprescindível para a realização dos estudos funcionais.

À bióloga Dra. Mirian Nishi, profissional competente e sempre muito solícita, que ajudou direta e indiretamente na exceção de inúmeras técnicas, exercendo papel importantíssimo para concretização do projeto.

À Maria das Graças Cavalcanti, funcionária dedicada e competente, agradeço pela sua imensa ajuda durante a coleta das amostras de sangue e a caracterização clínica da família para o estudo de segregação.

Ao Dr. Ivo Arnhold, pelo tempo dedicado e pelas sugestões sempre muito úteis e construtivas. À Prof.^a Dra. Ana Claudia Latronico, pelas sugestões e incentivo. À Dra. Maria Helena Sircili, às psicólogas Marlene Inácio e Elisa Verduguez e à colega Dra. Flávia Cunha, pelo cuidado com os pacientes portadores de distúrbios do desenvolvimento sexual.

Aos assistentes Dra. Maria Candida Fragoso, Prof.^a Dra. Tânia Bachega, Prof. Dr. Alexander Lima Jorge, Dr. Vinícius Brito, Dra. Letícia

Gontijo, Dra. Luciana Brito, Dra. Regina Matsunaga, pelas sugestões e considerações relevantes que muito ajudaram na elaboração teórica e na execução prática do projeto.

Ao Dr. Antonio Lerario, pela realização do tratamento de bioinformática do exoma. Ao Dr. Juliano Dettoni, pela leitura das reações de imuno-histoquímica. Ao Dr. Frederico M. Ferreira, pela realização dos estudos de dinâmica molecular e pelas sugestões e considerações durante a escrita do artigo.

Às colegas de pós-graduação do grupo de DDS, Maira P. Brandão, Tatiane E. Silva, Aline Z. Machado e Milena P. do Vale, pela amizade, pelas experiências compartilhadas e pela fundamental ajuda nos primeiros passos de bancada. Agradeço também à Ericka Trabach, Beatriz Marinho, Mariana Funari e Luciana Montenegro pelas inúmeras vezes que me auxiliaram, discutindo questões técnicas e me ajudando na execução dos trabalhos de bancada.

Agradeço aos funcionários Maria Aparecida Medeiros, Cristina Rossi, Nilda, Fran, Neide e Rosangele, que trabalham árdua e continuamente para garantir o bom funcionamento do laboratório e, direta e indiretamente, ajudam, ao longo de vários anos, todos os pós-graduandos.

Agradeço a amiga e colega de pós-graduação Mariana T. Reis, pela amizade e pelo estímulo nos momentos de dificuldade.

Agradeço aos familiares que gentilmente me receberam em suas residências, pela confiança em mim depositada.

Especialmente agradeço aos meus familiares: aos meus pais, pelo amor, pela confiança e pelo exemplo de vida; aos meus irmãos Eduardo, Viviane e André e as minhas tias, Alcinéia e Avani, pelo carinho e apoio.

Agradeço imensamente ao meu marido Bruno, companheiro para a vida, com o qual compartilho o amor pela profissão e pelo estudo, e com quem me associei para a realização do mais audacioso e gratificante projeto de vida, nossos filhos Helena e David.

Finalmente e mais importante, agradeço a Deus, que sempre iluminou os meus caminhos e permitiu que eu realizasse esse projeto.

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

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

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

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

Sumário

Lista de siglas e abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Distúrbio do desenvolvimento sexual 46,XX Testicular	4
1.2 Patogênese molecular do DDS 46,XX Testicular <i>SRY</i> negativo	5
1.3 <i>R-spondina 1</i>	7
1.3.1 <i>R-spondinas</i> e a via de sinalização Wnt/ β -catenina	8
1.3.2 <i>R-spondina 1</i> e o desenvolvimento sexual	10
1.3.2.1 DDS 46,XX associado à mutação no gene <i>R-spondina 1</i>	11
1.3.2.2 Modelos animais	13
1.3.3 Outras manifestações clínicas associadas à mutação no gene <i>R-spondina 1</i> : correlações fisiopatológicas	16
1.4 Hipótese	17
2 OBJETIVOS.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Aspectos éticos	22
3.2 Casuística	22
3.3 Avaliação clínica.....	24
3.4 Avaliação hormonal e citogenética	24
3.5 Análise do DNA	25
3.5.1 Extração do DNA.....	25
3.5.2 Amplificação e sequenciamento gênico	25
3.5.3 Avaliação do número de cópias.....	28
3.5.4 Avaliação do exoma	29
3.6 Análise do RNA	31
3.6.1 Preparação das amostras.....	31
3.6.2 Extração do RNA.....	32
3.6.3 Amplificação e sequenciamento do cDNA.....	33
3.6.4 Avaliação de expressão gênica	35
3.7 Imuno-histoquímica	37
3.8 Estudo funcional	39
3.8.1 Plasmídios	39

3.8.2	Cultura celular	42
3.8.3	Ensaio de luciferase	43
3.9	Modelagem e simulação de dinâmica molecular	44
3.10	Análise estatística	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Caracterização clínica, hormonal e molecular	47
4.2	Estudo de segregação	54
4.3	Caracterização da nova variante alélica do gene <i>RSPO1</i>	54
4.4	Avaliação das isoformas de <i>RSPO1</i>	57
4.5	Dinâmica molecular	61
4.6	Estudo funcional	67
4.7	Avaliação de expressão gênica	71
4.8	Avaliação de expressão proteica	73
4.9	Pesquisa de genes modificadores de fenótipo	77
4.9.1	Caracterização da variante rs17109924	78
4.9.2	Revisão da literatura: estudos clínicos de associação da variante rs17109924 com câncer	79
5	DISCUSSÃO	80
5.1	Caracterização clínica da síndrome	82
5.2	Avaliação do perfil hormonal e dos estudos de expressão	84
5.3	Avaliação do efeito funcional da variante c.305G>A	92
5.4	Pesquisa de genes modificadores de fenótipo	94
6	CONCLUSÕES	97
7	ANEXOS	100
	Termos de consentimento livre e esclarecido	101
	Figura 1 - Interactoma do gene <i>RSPO1</i>	113
	Figura 2 - Vetor TOPFLASH	114
	Figura 3 - Vetor de expressão pCMV6-XL5	115
	Figura 4 - Estrutura ternária do complexo LGR5-Rspo1-RNF43	116
	Figura 5 - Sobreposição dos modelos do complexo LGR5-Rspo1- RNF43 selvagem e mutante	117
8	REFERÊNCIAS	118
	APÊNDICE	132

Listas

SIGLAS E ABREVIATURAS

aa	aminoácido
<i>Amh</i>	<i>anti-Mullerian hormone</i>
AMH	<i>anti-müllerian hormone</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
<i>Bmp2</i>	<i>bone morphogenetic protein 2</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CCE	carcinoma de células escamosas
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CKI	<i>Casein Kinase I</i>
<i>Ctnnb1</i>	<i>catenin (cadherin associated protein), beta 1</i>
<i>Cyp26b1</i>	<i>cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1</i>
DDS	distúrbio do desenvolvimento sexual
<i>Dhh</i>	<i>desert hedgehog</i>
DKK1	<i>Dickkopf-1</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphates</i>
dpc	dia pós-coito
E2	estradiol
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
<i>Fgf9</i>	<i>fibroblast growth factor 9</i>
<i>FoxL2</i>	<i>forkhead box L2</i>
FSH	<i>follicle-stimulating hormone</i>
<i>Fst</i>	<i>follistatin</i>
Fzd	<i>Frizzled</i>

GSK3B	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
HPP	hiperceratose palmoplantar
InB	inibina B
Kb	kilobase
LB	Luria Bertani
LEF	<i>Lymphoid enhancer-binding factor</i>
LGR	<i>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor</i>
LH	<i>luteinizing hormone</i>
LRP	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein</i>
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
pb	pares de bases
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PGD2	<i>prostaglandin D2 synthase</i>
<i>Ptgds</i>	<i>prostaglandin D2 synthase</i>
RMSD	<i>root-mean-square distance</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAm	<i>messenger ribonucleic acid</i>
RNF43	<i>Ring finger protein 43</i>
<i>Rspo1</i>	<i>Roof plate-specific spondin-1 ou R-spondin 1</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription PCR</i>
<i>Sf1</i>	<i>steroidogenic factor 1</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
Sox3	<i>SRY-box containing gene 3</i>
Sox9	<i>SRY-box containing gene 9</i>

Sry	<i>sex determining region of Chromosome Y</i>
T	testosterona
TAE	tampão Tris-Acetato-EDTA
TCF	<i>Transcription factor</i>
TESCO	<i>testis enhancer sequence core element</i>
TK	<i>thymidine kinase</i>
TM	transmembrana
TSP-1	domínio tipo trombospondina
Wnt	<i>wingless-int</i>
<i>Wnt4</i>	<i>wingless-related MMTV integration site 4</i>
Wnt/ β -catenina	via canônica Wnt
WT	<i>wild type</i>
ZNRF3	<i>Zinc and ring finger 3</i>

SÍMBOLOS

>	maior que
<	menor que
%	porcentagem
Å	angstrom
°C	graus Celsius
fs	fentossegundo
g	grama
k	quilo
L	litro
M	molar
cm ²	centímetro quadrado
J	joule
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
mol	mol
ng	nanograma
pH	potencial hidrogeniônico
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar

FIGURAS

Figura 1 -	Modelo simplificado das vias reguladoras da determinação sexual	3
Figura 2 -	Localização de Severiano Melo e Apodi no Rio Grande do Norte	23
Figura 3 -	Heredograma da família portadora da variante c.305G>A	49
Figura 4 -	Hiperceratose palmoplantar	50
Figura 5 -	Variante c.305G>A (p.Cys102Tyr)	55
Figura 6 -	Conservação do resíduo c.305G>A	56
Figura 7 -	Predição <i>in silico</i> para avaliação de mudança de <i>splicing</i>	57
Figura 8 -	Isoformas da <i>RSPO1</i> e as respectivas proteínas	58
Figura 9 -	Amplificação e separação em gel de agarose das isoformas de <i>RSPO1</i>	60
Figura 10 -	Histograma da distribuição das energias de ligação das moléculas R-spondina-1 selvagem (WT) e mutante (C102Y)	61
Figura 11 -	RMSD dos aminoácidos do domínio FU1-FU2 da R-spondina-1 isolada.	62
Figura 12 -	RMSD dos aminoácidos do domínio FU1-FU2 da R-spondina-1 no complexo.	63
Figura 13 -	Histograma da distribuição das energias de ligação de Rspo1-LGR com as moléculas de R-spondina-1 selvagem (WT) e mutante (C102Y)	64
Figura 14 -	Distâncias entre os centros de massa das moléculas Rspo-LGR.	65

Figura 15 - Distâncias entre aminoácidos críticos nas moléculas Rspo-LGR.	66
Figura 16 - Ausência de ativação da via Wnt por RSPO1	68
Figura 17 - Ativação da via Wnt por CTNNB1	68
Figura 18 - Cotransfecção de RSPO1 e CTNNB1 provoca ativação da via Wnt.....	69
Figura 19 - A R-spondina-1 mutada tem menor capacidade de ativação da via Wnt	70
Figura 20 - Expressão relativa dos genes <i>CTNNB1</i> e <i>RSPO1</i> em fibroblastos.	71
Figura 21 - Expressão relativa dos genes <i>CTNNB1</i> , <i>RSPO1</i> , <i>WNT4</i> , <i>FOXL2</i> , <i>FGF9</i> e <i>SOX9</i> no tecido gonadal.....	72
Figura 22a - Imuno-histoquímica para RSPO1, WNT4 e FOXL2	75
Figura 22b- Imuno-histoquímica para CTNNB1, SOX9 e FGF9	76

TABELAS

Tabela 1 -	Mutações descritas no gene <i>RSPO1</i>	12
Tabela 2 -	Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento da região codificadora do gene <i>RSPO1</i>	26
Tabela 3 -	Protocolo de amplificação da região codificadora do gene <i>RSPO1</i>	27
Tabela 4 -	Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento do cDNA do gene <i>RSPO1</i>	33
Tabela 5 -	Estequiometria da reação de amplificação das isoformas do gene <i>RSPO1</i>	34
Tabela 6 -	Protocolo de amplificação das isoformas do gene <i>RSPO1</i>	34
Tabela 7 -	Características dos genes alvos e endógenos estudados por RT-PCR em tempo real	37
Tabela 8 -	Título e fonte dos anticorpos primários	38
Tabela 9 -	Oligonucleotídeos utilizados para mutagênese sítio específica do gene <i>RSPO1</i>	41
Tabela 10 -	Características clínicas, avaliação molecular e citogenética dos pacientes portadores da variante c.305G>A	53
Tabela 11 -	Dados laboratoriais dos pacientes portadores da variante c.305 G>A	53
Tabela 12 -	Caracterização da variante rs17109924	78

Resumo

Silva RB. *Distúrbio do desenvolvimento sexual 46,XX testicular SRY negativo sindrômico devido à mutação missense no gene RSPO1: estudo clínico, molecular e histológico de grande família consanguínea brasileira* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Nos mamíferos, a determinação sexual é governada pelo equilíbrio entre duas vias de sinalização paralelas e antagônicas: a via masculina SOX9/FGF9 e a via feminina RSPO1/ β -catenina/WNT4. A R-spondina 1 é uma importante reguladora do processo de diferenciação ovariana e atua modulando a via de sinalização Wnt canônica (Wnt/ β -catenina). Em humanos, mutações em *RSPO1* causam uma rara síndrome genética autossômica recessiva caracterizada por Distúrbios do Desenvolvimento Sexual (DDS) 46,XX Testicular ou Ovotesticular, hiperkeratose palmoplantar (HPP) e predisposição para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas (MIM 610644). Identificamos um paciente brasileiro, proveniente de uma grande família consanguínea, que apresentava a associação de HPP e DDS 46,XX Testicular SRY negativo. A avaliação da região codificadora do gene *RSPO1* identificou a nova variante alélica c.305G>A (p.Cys102Tyr). O estudo de segregação realizado em 67 familiares demonstrou que a variante c.305G>A segrega em perfeita concordância com o fenótipo de HPP, exibindo um padrão de herança autossômica recessiva. Na família foram identificados 10 indivíduos afetados pelo fenótipo de HPP. As avaliações clínica e hormonal e os estudos molecular e citogenético nesses indivíduos resultou na caracterização de: (a) quatro indivíduos do sexo masculino 46,XX e/ou SRY negativo, com ambiguidade genital e perfil hormonal alterado; (b) cinco indivíduos do sexo masculino 46,XY e/ou SRY positivo, sem ambiguidade genital, com perfil hormonal normal e (c) uma mulher 46,XX, fértil. Experimentos de transfecção transitória *in vitro* demonstraram que a proteína mutante tem menor capacidade de transativação do plasmídeo reporter da via Wnt. As simulações de dinâmica molecular constataram que a troca p.Cys102Tyr aumenta a flexibilidade do *backbone* da R-spondina-1, diminuindo a energia de ligação da proteína ao complexo de receptores, LGR5 e RNF43. Em conjunto, nossos achados demonstram que a variante c.305G>A é patogênica, sendo responsável pela síndrome genética diagnosticada na família brasileira. As análises de expressão gênica e os estudos de imuno-histoquímica, por sua vez, detectaram um aumento da expressão do gene SOX9 e maior imonorreatividade para a proteína Sox9 no tecido testicular do caso índice. Esses resultados sugerem que o processo de reversão sexual nos indivíduos XX ocorra por uma hiperexpressão de SOX9 secundária à menor ativação da via Wnt/ β -catenina na gônada durante a embriogênese. No presente estudo também relatamos o primeiro caso de indivíduo de cariótipo 46,XX portador de mutação em homozigose no gene *RSPO1* que não desenvolveu DDS. A variabilidade do fenótipo sexual não está associada com alterações no número de cópias dos genes *WNT4* ou do SOX9 e região cis-regulatória. No entanto, a avaliação do exoma da família encontrou uma associação entre o polimorfismo do receptor LGR5 rs17109924 e a

atenuação do fenótipo de DDS. Todavia, serão necessários estudos funcionais para esclarecer o impacto biológico da interação das variantes *RSPO1* p.Cys102Tyr e *LGR5* rs17109924.

Descritores: transtornos testiculares 46,XX do desenvolvimento sexual; processos de determinação sexual; ceratodermia palmar e plantar; genética; via de sinalização Wnt; beta catenina; fatores de transcrição SOX9; imuno-histoquímica; expressão gênica; modelos moleculares.

Summary

Silva RB. *SRY-negative syndromic 46,XX testicular disorder of sex development due to missense homozygous RSPO1 mutation: clinical, molecular and histological study of a large consanguineous Brazilian family* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

In mammals, sex determination is governed by the balance between two parallel and antagonistic signaling pathways: the male SOX9/FGF9 and the female, RSPO1/ β -catenin/WNT4 pathways. R-spondin 1 regulates the ovarian differentiation process by its modulating action through the canonical Wnt pathway (Wnt/ β -catenin). In humans, pathogenic mutations in *RSPO1* cause a rare, autosomal recessive syndrome characterized by 46,XX Testicular or Ovotesticular disorders of sexual development (DSD), palmoplantar keratosis (PPK) and predisposition to squamous cell carcinoma (MIM 610644). We identified and studied a SRY-negative 46,XX DSD patient with PPK from a large, consanguineous, Brazilian family. Through a "candidate gene" approach we identified in the proband a new allelic variant in the coding region of *RSPO1*, c.305G>A. This variant presented full concordance with the PPK phenotype by segregation analyses in 10 of 67 members of this family. Clinical, hormonal, cytogenetic and molecular genetic studies characterized three patterns in individuals with this variant: (a) four 46,XX and/or SRY-negative males with ambiguous genitalia and altered hormonal profile; (b) five 46,XY and/or SRY-positive males without ambiguous genitalia with normal hormonal profile; (c) one 46,XX fertile woman. *In vitro* experiments demonstrated that transient transfection of the mutant protein resulted in lower transactivation of the Wnt pathway-reporter plasmid. Moreover, molecular dynamic studies showed that p.Cys102Tyr increased the R-spondin-1 backbone flexibility, thus decreasing the interaction between this protein and its receptors, LGR5 and RNF43. Thus, both *in vitro* and *in silico* analysis demonstrate the pathogenicity of the *RSPO1* variant c.305G>A. In addition, in the index case, a higher expression of SOX9, corroborated by a reactive immunohistochemistry in testicular tissue, suggested that the process of sexual reversal in the XX individual is driven by a higher SOX9 expression possibly due to a lower Wnt/ β -catenin signaling pathway activation during embryogenesis. In this study, we also reported the first 46,XX individual with *RSPO1* mutation without DSD, in which no copy number abnormality was detected in *WNT4*, SOX9 and its *cis*-regulatory regions. Whole exome sequencing of the affected individuals revealed, in turn, that the *LGR5* rs17109924 polymorphism associates with a protected DSD phenotype in the fertile woman with normal hormonal profile. Despite this evidence, future studies are needed to address causality and biological impact between *RSPO1* p.Cys102Tyr and *LGR5* rs17109924 variants.

Descriptors: 46,XX testicular disorders of sex development; sex determination processes; keratoderma, palmoplantar; genetics; Wnt signaling pathway; β catenin; SOX9 transcription factor; Immunohistochemistry; gene expression; models, molecular.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos mamíferos apresenta um claro dimorfismo sexual. Entretanto, no início da vida intrauterina, os embriões de ambos os sexos são idênticos, apresentando um primórdio gonadal e genitais externo e interno indiferenciados. O primórdio gonadal tem o potencial de formar dois órgãos distintos (testículo ou ovário) e, por isso, é chamado de gônada bipotencial.

A diferenciação sexual do embrião, ou seja, o desenvolvimento dos genitais interno e externo e a consequente aquisição de um fenótipo sexual específico (masculino ou feminino) é promovida pelos hormônios gonadais. Portanto, o sexo fenotípico do embrião é dependente do desenvolvimento e da especialização da gônada embrionária.

O termo determinação sexual refere-se aos processos envolvidos no desenvolvimento do sexo gonadal, ou seja, os eventos que participam da transformação da crista urogenital embrionária para o estado de gônada bipotencial até o dimorfismo gonadal (formação de testículos ou ovários). A determinação sexual é constituída por uma sequência de eventos tecido e tempo específicos do qual participam inúmeros genes que são, em sua grande maioria, fatores transcricionais (Eggers; Sinclair, 2012).

Na embriogênese gonadal, o momento mais crítico é aquele imediatamente após a formação da gônada bipotencial, no qual o primórdio inicia o processo de diferenciação, podendo divergir para duas vias distintas, testicular ou ovariana. Nos mamíferos, esta etapa da determinação sexual gonadal é governada pelo equilíbrio entre duas vias de sinalização paralelas e antagônicas: a via masculina SOX9/FGF9 e a via feminina RSPO1/ β -catenina/WNT4 (Figura 1).

Figura 1 - Modelo simplificado das vias reguladoras da determinação sexual. Na gônada XY, o *Sry* promove um aumento da expressão do *Sox9* acima dos níveis basais, que por sua vez, promove a expressão do *Fgf9*. *Wnt4* e *Fgf9* atuam como sinais antagônicos na regulação da determinação sexual. Na gônada XX, A *Rspo1* está envolvida no processo de ativação da β -catenina e na regulação da expressão do *Wnt4*. A proteína β -catenina atua ativando genes envolvidos com o processo de diferenciação ovariana e antagonizando *Sox9*

Na gônada XY, o papel do gene *Sry* (*sex determining region of Chromosome Y*) é fazer pender a balança a favor da via de sinalização masculina SOX9/FGF9. O *Sry* atua aumentando a expressão do gene *Sox9* (*SRY-box containing gene 9*) que, por sua vez, ativa o gene *Fgf9* (*fibroblast growth factor 9*). Os genes *Sry*, *Sox9* e *Fgf9* operam em um mecanismo em alça de retroalimentação positiva, gerando um reforço mútuo da via de diferenciação testicular ao mesmo tempo que antagonizam a via de diferenciação ovariana RSP01/ β -catenina/WNT4.

Na gônada XX, na ausência do gene *Sry*, os genes *Rspo1* (*R-spondin 1*) e *Wnt4* (*wingless-type MMTV integration site family, member 4*) são expressos em níveis elevados. O gene *Rspo1* atua aumentando a expressão de *Wnt4* e promovendo a estabilização da proteína β -catenina, os quais ativam a transcrição de genes envolvidos no processo de diferenciação

ovariana ao mesmo tempo que antagonizam a via de diferenciação testicular SOX9/FGF9 (Kim; Capel, 2006; Sekido; Lovell-Badge, 2009).

Os mecanismos moleculares envolvidos na regulação do processo de determinação sexual gonadal são, portanto, extremamente complexos. As evidências atuais indicam que, em vez de ocorrer um processo direto de diferenciação celular após o comprometimento do órgão com uma de duas vias alternativas (ovariana ou testicular), existe um equilíbrio complexo entre genes ativadores e repressores de ambas as vias, feminina e masculina, atuando em paralelo durante todo o processo, para promover a diferenciação gonadal. Neste contexto, alterações de dosagem gênica ou mutações de genes críticos poderiam alterar o balanço entre as duas vias, promovendo quadros de reversão sexual.

1.1 Distúrbio do desenvolvimento sexual 46,XX Testicular

Os “distúrbios do desenvolvimento sexual” (DDS) compreendem várias condições congênitas nas quais o desenvolvimento cromossômico, gonadal ou do sexo anatômico são atípicos (Lee et al., 2006). O DDS 46,XX Testicular (anteriormente denominado Homem XX) é uma forma rara de distúrbio do desenvolvimento sexual (1:20.000-30.000 nascimentos) no qual ocorre uma incompatibilidade parcial ou completa entre o sexo fenotípico e o sexo genético (Domenice et al., 2007).

A síndrome é caracterizada pela presença de gônadas com diferenciação testicular em um indivíduo de compleição masculina com cariótipo 46,XX (reversão sexual XX). Em relação ao fenótipo genital, a apresentação clínica mais comum (80-85% dos casos), chamada forma clássica, é a presença de uma genitália masculina normal. Alguns pacientes, no entanto, apresentam ambiguidade genital e, nesses casos, a genitália interna pode apresentar derivados müllerianos e wolffianos.

A maioria dos indivíduos com DDS 46,XX Testicular apresenta desenvolvimento anormal dos caracteres sexuais secundários: escassez de pelos axilares e corporais e padrão de distribuição de pelos pubianos feminino. Além disso, a ginecomastia está presente em um terço dos pacientes. Na ausência de ambiguidade genital, o diagnóstico do distúrbio de desenvolvimento sexual geralmente é feito após a puberdade, devido ou ao quadro clínico de hipogonadismo ou à infertilidade, uma vez que azoospermia ocorre em 100% dos casos (Domenice et al., 2007).

O diagnóstico definitivo, entretanto, é feito através de biópsia gonadal. O principal diagnóstico diferencial é o DDS 46,XX Ovotesticular, condição caracterizada pela presença de tecido testicular e de tecido ovariano em um mesmo indivíduo. O estudo histológico dos pacientes com DDS 46,XX Testicular revela testículos imaturos ou disgenéticos (fibrose peritubular, túbulos seminíferos com diâmetro menor e em número reduzido), aplasia de células germinativas, hiperplasia de células de Leydig e células de Sertoli normais ou hiperplásicas.

A maioria dos casos de DDS 46,XX Testicular (80-90%) é causada pela translocação do gene *SRY* (Yp11.3) do cromossomo Y para o cromossomo X. Entretanto, em aproximadamente 10 a 20% dos pacientes com DDS 46,XX Testicular, o gene *SRY* não é identificado. A presença do gene *SRY* correlaciona-se com a apresentação clínica sem ambiguidade genital (forma clássica) e com menor predisposição para desenvolvimento de ginecomastia (Vilain, 2009; Boucekkine et al., 1994).

1.2 Patogênese molecular do DDS 46,XX Testicular *SRY* negativo

Mutações de genes envolvidos na formação da crista urogenital e/ou nas fases iniciais do desenvolvimento da gônada bipotencial resultam em agenesia gonadal ou na formação de tecido muito disgenético, o qual seria incapaz de diferenciar-se em ovário e/ou testículo. Portanto, na ausência do gene *SRY*, para ocorrer a diferenciação de uma gônada bipotencial XX em

um testículo, seria necessária a ocorrência de mutações ou alterações gênicas que promovessem: (a) ganho de função de genes críticos para a determinação e diferenciação testicular que atuam a jusante do *SRY*; ou (b) perda de função de genes críticos envolvidos na determinação e diferenciação ovariana, cujo papel seria reprimir a via testicular e/ou promover a via ovariana (Camerino et al., 2006).

O gene *Sox9* atua regulando positivamente a via de diferenciação testicular e antagonizando a via de diferenciação ovariana. Estudos com modelos animais transgênicos demonstraram que a hiperexpressão do gene *Sox9* é capaz de promover reversão sexual completa em animais XX (Bishop et al., 2000; Vidal et al., 2001). Em humanos, alguns casos de DDS 46,XX Testicular *SRY* negativo também foram associados à hiperexpressão de *SOX9* (17q24.3), a qual foi causada por duplicações ou rearranjos do *locus* do próprio *SOX9* ou de regiões regulatórias localizadas 500 a 600 Kb a montante do gene (Huang et al., 1999; Refai et al., 2010; Cox et al., 2011; Benko et al., 2011; Xiao et al., 2013; Lee et al., 2014; Kim et al., 2015). Paralelamente, três casos de reversão sexual XX também foram associados a rearranjos de regiões regulatórias do gene *SOX3* [*SRY (sex determining region Y)-box 3*] (Xq27.1). Estudos com modelos animais sugerem que o *Sox3*, quando hiperexpresso, atuando por meio de um mecanismo semelhante ao do gene *Sry*, provoca aumento da expressão de *Sox9*, causando reversão sexual gonadal (diferenciação testicular) em animais XX (Sutton et al., 2011).

O gene *Wnt4* atua regulando positivamente a via de diferenciação ovariana e antagonizando a via de diferenciação testicular. Estudos com modelos transgênicos demonstraram que animais XX *Wnt4*^{-/-} desenvolvem reversão sexual parcial apresentando desenvolvimento de derivados woffianos, masculinização do genital externo e dos ovários. Embora a gônada dos animais XX *Wnt4*^{-/-} não sofresse diferenciação testicular, foram detectados: (a) perda de expressão de genes associados com o desenvolvimento ovariano (*Fst* e *Bmp2*) e, entre os 11,5 e 12,0 dpc, aumento de expressão de genes associados com o desenvolvimento

testicular (*Sox9* e *Fgf9*) e (b) alterações morfológicas que conferiram aos ovários algumas características da gônada masculina (forma mais arredondada, perda da organização do tecido em regiões cortical e medular, colonização por células produtoras de andrógenos e apoptose de células germinativas) (Vainio et al., 1999). Em humanos existe um relato de uma paciente, portadora da mutação p.Glu226Gly no *WNT4* (1p36.23-p35.1), que desenvolveu sinais clínicos de hiperandrogenismo e apresentava ausência de derivados müllerianos e agenesia renal unilateral (Biason-Lauber et al., 2004). Posteriormente, Mandel et al. descreveram uma complexa síndrome genética, letal, de herança autossômica recessiva, causada pela mutação c.C341T no *WNT4* em uma família consanguínea de origem árabe. A síndrome SERKAL (**S**ex reversal; **K**idney, **A**drenal and **L**ung hypoplasia) foi caracterizada por meio da autópsia de 3 fetos, com idade gestacional entre 19 e 24 semanas. Dois fetos apresentaram alterações do desenvolvimento gonadal: um desenvolveu DDS 46,XX Testicular *SRY* negativo sem ambiguidade genital e, o outro, DDS Ovotesticular com alterações genitais (hipospádia e encurvamento de haste peniana) (Mandel et al., 2008).

O gene *Rspo1* é um modulador da via de sinalização canônica Wnt (Wnt/ β -catenina). As moléculas Wnt4 e β -catenina, por sua vez, operam ativando o programa genético da diferenciação ovariana e inibindo genes envolvidos na via de diferenciação testicular. Em humanos, mutações no gene *RSPO1* (1p34.3) causam uma rara síndrome genética autossômica recessiva caracterizada por reversão sexual XX (DDS 46,XX Testicular ou Ovotesticular), hiperkeratose palmoplantar (HPP) e predisposição para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas (CCE) (MIM 610644).

1.3 *R-spondina 1*

O gene *Rspo1* foi identificado há aproximadamente 10 anos a partir da triagem funcional de genes envolvidos na embriogênese do sistema nervoso central de camundongos. Uma vez que esse novo gene encontrava-

se expresso no teto (*roof plate*) do tubo neural e codificava o primeiro membro de uma nova família de proteínas que apresentava um domínio homólogo a trombospondina do tipo 1 (TSP-1), foi denominado *Rspo1* (*Roof plate-specific spondin-1*) (Kamata et al., 2004).

Em humanos, o gene *RSPO1* está localizado no cromossomo 1 *locus* 1p34.3 e possui 2.621 pares de base (pb) e 8 éxons. Os éxons 4 a 8 codificam a proteína R-spondina-1, de 263 aminoácidos (aa), conforme o *website Ensembl Genome Browser* (www.ensembl.org).

A R-spondina-1 pertence a uma família de proteínas secretadas composta por 4 membros (R-spondina 1 a 4), os quais são codificados por genes independentes. As R-spondinas apresentam em torno de 40 a 60% de homologia e exibem a mesma organização de seus domínios: um domínio peptídeo sinal na região N-terminal; dois domínios ricos em cisteína tipo furina (FU1-FU2); um domínio tipo trombospondina (TSP) e um domínio rico em aminoácidos básicos (com sequências de localização nuclear) na região C-terminal (Kim et al., 2008; Kim et al., 2006a).

Parma et al., avaliando tecidos humanos (ovário, testículo e pele) de adultos normais, detectaram a presença de 3 isoformas da R-spondina-1: isoforma 1, a versão clássica, com peptídeo sinal positivo, predominante em todos os tecidos examinados (GenBank NM_001038633); isoforma 2, com ausência do éxon 7 (que codifica o domínio TSP); e a isoforma 3, que não contém o peptídeo sinal N-terminal (GenBank AK098225) (Parma et al., 2006).

1.3.1 R-spondinas e a via de sinalização Wnt/ β -catenina

A proteína R-spondina-1 humana foi inicialmente identificada e caracterizada devido à sua habilidade de estimular o crescimento das células epiteliais intestinais quando injetada em camundongos transgênicos (Kim et al., 2005). Neste estudo, Kim et al. demonstraram que a proteína R-spondina-1 exercia seus efeitos mitogênicos modulando a atividade da via de sinalização Wnt/ β -catenina. Posteriormente, outros estudos, utilizando

vários modelos experimentais, reproduziram estes achados, confirmando que a proteína possuía propriedades proliferativas sobre células-tronco em diversos tecidos epiteliais (Zhao et al., 2007; Zhao et al., 2009; Bhanja et al., 2009; Krönke et al., 2010; Wong et al., 2010; Wong et al., 2011; Takashima et al., 2011).

A análise comparativa entre os genomas de várias espécies de vertebrados demonstra que existe um alto grau de homologia entre os ortólogos do gene *Rspo1*. Observa-se um alto grau de conservação especificamente nas regiões dos domínios ricos em cisteína tipo furina (FU1-FU2) e do domínio tipo trombospondina (TSP). Este achado é condizente com o importante papel funcional dos domínios ricos em cisteína tipo furina, os quais são suficientes e essenciais para promover a amplificação da sinalização da via Wnt (Kim et al., 2006a; Kim et al., 2008).

Wnt compreende uma grande família de glicoproteínas secretadas que desempenham papéis-chave em diversos processos celulares ativando vias de sinalização intracelular. As vias de sinalização Wnt podem ser: (a) canônica, se envolve a proteína β -catenina, ou (b) não canônicas, se os processos de transdução do sinal operam independentemente da β -catenina (Rao; Kühl, 2010).

A via Wnt canônica (Wnt/ β -catenina) é ativada através da ligação da glicoproteína Wnt ao complexo proteico de membrana formado pelo receptor de superfície celular *Frizzled* (Fzd) e o seu correceptor, a *Low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP). Na via canônica, a β -catenina é a molécula central envolvida na transdução do sinal extracelular para o núcleo. Na ausência de ativação da via Wnt, a β -catenina citoplasmática é fosforilada pelo complexo formado pelas proteínas *Glycogen synthase kinase 3 beta* (GSK3B), *Casein Kinase I* (CKI), *Adenomatous polyposis coli* (APC) e *Axin*, sendo, conseqüentemente, direcionada para degradação pela via de ubiquitinação. A ativação da via Wnt inativa o complexo de destruição GSK3B/CKI/APC/Axin e resulta na estabilização e acúmulo citoplásmico da β -catenina. A β -catenina estabilizada, por sua vez, transloca para o núcleo e

forma um complexo heterodimérico com as proteínas de ligação com DNA *Transcription factor* (TCF)/*Lymphoid enhancer-binding factor* (LEF), ativando transcrição gênica (Ruffner et al., 2012).

Estudos recentes indicam que R-spondina-1 interage com a via de sinalização Wnt indiretamente influenciando a quantidade disponível das proteínas Fzd e LRP5/6 na superfície da membrana celular. Primeiramente, a R-spondina-1 liga-se com alta afinidade aos seus receptores de membrana LGR 4-6 (*leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptors 4-6*), através dos domínios ricos em cisteína tipo furina (FU1-FU2) (de Lau et al., 2011; Carmon et al., 2011; Glinka et al., 2011; Ruffner et al., 2012, Gong et al., 2012; Peng et al., 2013a). Posteriormente, através do primeiro domínio tipo furina (FU1), acopla-se também aos receptores de membrana RNF43/ZNRF3 (*ring finger protein 43/zinc and ring finger 3*), funcionando como ponte entre os dois receptores, LGR e RNF43/ZNRF3 (Zebisch et al., 2013; Peng et al., 2013b). RNF43/ZNRF3 são E3 ligases que regulam negativamente a via Wnt direcionando os receptores Fzd e LRP para degradação pela via de ubiquitinação. O acoplamento RSPO-LGR-RNF43/ZNRF3 promove a inibição direta das E3 ligases RNF43/ZNRF3 aumentando a quantidade dos receptores Fzd e LRP na membrana celular (Hao et al., 2012; Koo et al., 2012).

1.3.2 R-spondina 1 e o desenvolvimento sexual

Na última década, ocorreu um grande acúmulo de conhecimentos a respeito das bases genéticas dos processos de determinação e diferenciação sexual dos mamíferos. Em humanos, *RSPO1* foi primariamente associada ao processo de desenvolvimento sexual devido à identificação de mutações homozigotas neste gene em pacientes 46,XX com reversão sexual completa ou parcial (Parma et al., 2006; Tomaselli et al., 2008). De maneira paralela e independente, outros grupos de pesquisa desenvolveram e caracterizaram camundongos *knockout* para o gene *Rspo1*, os quais apresentaram, também, alterações do desenvolvimento

sexual (Tomizuka et al., 2008; Chassot et al., 2008). Além disso, estudos comparativos de expressão gênica, avaliando vertebrados com diferentes mecanismos de determinação do sexo, demonstraram que o gene *Rspo1* encontra-se hiperexpresso na gônada embrionária feminina no momento da determinação sexual (Smith et al., 2008). Em humanos, a análise de gônadas fetais demonstrou que o gene *RSPO1* é hiperexpresso nos ovários entre a 6ª e 9ª semanas de gestação, momento crítico no processo de formação da gônada humana (Tomaselli et al., 2011). Neste cenário, a *R-spondina-1* emergiu como uma peça ancestral conservada do processo de determinação sexual dos vertebrados, funcionando como uma molécula reguladora chave da via de diferenciação ovariana *RSPO1*/β-catenina/WNT4.

1.3.2.1 DDS 46,XX associado à mutação no gene *R-spondina 1*

Vernole et al., em 2000, descreveram o caso de um paciente de 42 anos com DDS 46,XX Testicular *SRY* negativo sem ambiguidade genital que apresentava, além do distúrbio de desenvolvimento sexual, hiperkeratose palmoplantar (HPP), catarata bilateral e coloboma de nervo óptico bilateral. Esse paciente, inicialmente, recebeu o diagnóstico de síndrome de Huriez (Vernole et al., 2000). Posteriormente, Micali et al., em 2005, descreveram uma nova síndrome genética, em uma família consanguínea italiana, caracterizada pela presença de alterações dermatológicas (esclerodactilia, hipoplasia de unhas, hiperkeratose palmoplantar não epidermolítica, múltiplos carcinomas de células escamosas cutâneas), anomalias dentárias (doença periodontal com perda prematura de dentes) e DDS 46,XX Testicular *SRY* negativo com ambiguidade genital (MIM 610644) (Micali et al., 2005). Paralelamente, Radi et al., devido à semelhança dos fenótipos, avaliaram em conjunto o caso isolado e a família descritos acima e, por meio de estudos de *linkage*, encontrou LOD scores positivos para dois marcadores na região 1p34-35 (Radi et al., 2005). Finalmente, Parma et al., mapeando e sequenciando genes localizados na região 1p34-35, identificou

mutações no gene *RSPO1* (1p34.3) na família italiana e no caso esporádico anteriormente classificado como portador de síndrome de Huriez (Parma et al., 2006). Por último, Tomasselli et al., em 2008, identificaram uma nova mutação no gene *RSPO1* em um caso esporádico de DDS Ovotesticular *SRY* negativo com ambiguidade genital que apresentava, associado ao fenótipo genital, hiperkeratose palmoplantar, oncodistrofia, opacidades corneanas congênitas, estrabismo e hipoacusia neurossensorial (Tomaselli et al., 2008).

Variantes alélicas. Foram descritas, até o momento, apenas três variantes patogênicas para o gene *RSPO1* em humanos (Tabela 1). Todos os casos envolvem pacientes portadores de distúrbio do desenvolvimento sexual (DDS 46,XX Testicular ou Ovotesticular *SRY* negativo) associado com um quadro dermatológico caracterizado por hiperkeratose palmoplantar (HPP) (Parma et al., 2006; Tomaselli et al., 2008).

Tabela 1 Mutações descritas no gene *RSPO1*

Nº	Fenótipo	OMIM	Mutação
1	HPP; CCE e DDS 46,XX Testicular	610644	c.108_109insG ^a
2	HPP; CCE e DDS 46,XX Testicular	610644	EX4 DEL ^b
3	HPP e DDS Ovotesticular	609595	c.286+1G>A ^a

CCE: carcinoma de células escamosas. DDS: distúrbio do desenvolvimento sexual. HPP: hiperkeratose palmoplantar. a: referente à sequência NM_001038633.2; b: AL513220: g.40902_43653del

Parma et al., nos casos familiares de DDS 46,XX Testicular, identificaram uma mutação em homozigose no éxon 4 do gene *RSPO1*. Essa mutação consiste na inserção de uma guanina após o nucleotídeo 896 (GenBank NM_001038633) que resulta em um *frameshift* com geração de um *stop* códon prematuro após 10 aminoácidos. O sítio de inserção do *stop* códon localiza-se no início do gene, impedindo a transcrição de qualquer isoforma da proteína (Parma et al., 2006).

O caso de DDS Testicular 46,XX esporádico (inicialmente descrito por Vernole et al.) apresentou uma deleção de 2.752 pb que incluiu o éxon 4 e íntrons adjacentes. A avaliação do RNAm de fibroblastos deste paciente não detectou nenhuma isoforma normal, apenas formas aberrantes e mais curtas de RNAm (com ausência do éxon 4) (Vernole et al., 2000; Parma et al., 2006).

Tomaselli et al., no caso da mulher com DDS Ovotesticular, identificaram uma mutação em homozigose em uma região intrônica a qual gerou um sítio de *splicing* alternativo. Essa mutação corresponde à substituição c.286+1G>A, (GenBank NM_001038633.2), em região altamente conservada da sequência consenso GT, no sítio de *splicing* do éxon 5. A avaliação do RNAm isolou apenas isoformas aberrantes, compatíveis com a deleção do éxon 5, r.95_286del, que resulta em uma proteína truncada com deleção dos aminoácidos 32 a 95 (p.Ile32_Ile95del, NCBI accession number P_001033722). O primeiro domínio tipo furina (aminoácidos 34 a 85) é completamente deletado, mas apenas o início do segundo domínio tipo furina (aminoácidos 91 a 135) é comprometido (Tomaselli et al., 2008).

1.3.2.2 Modelos animais

Os camundongos *knockout* para o gene *Rspo1* não apresentam alterações do desenvolvimento renal e as fêmeas desenvolvem os ductos de Müller normalmente. Entretanto, as fêmeas XX *Rspo1*^{-/-} tem fertilidade reduzida e manifestam diversas alterações morfológicas e histológicas no trato reprodutivo, algumas delas semelhantes ao fenótipo apresentado pelos animais XX *Wnt4*^{-/-}.

Os animais XX *Rspo1*^{-/-} apresentam masculinização dos genitais interno (desenvolvimento de derivados wolffianos) e externo (aumento da distância entre o ânus e a vagina) e da gônada. Nos ovários dos animais XX *Rspo1*^{-/-} podem ser observados: formação de vasos celômicos; transdiferenciação das células de suporte; alterações de adesão celular e

apoptose das células germinativas. Alguns animais XX *Rspo1*^{-/-} desenvolvem ovotestis, apresentando túbulos seminíferos bem formados contendo gonócitos em fase G1 (Tomizuka et al., 2008; Chassot et al., 2008).

Em relação ao padrão de expressão gênica, na gônada do animal XX *Rspo1*^{-/-}, entre os 12,5 e 14,5 dpc, detectam-se: (a) diminuição de expressão de genes envolvidos com o processo de diferenciação ovariana (*Wnt4*, *Fst*, *Bmp2*) e (b) ativação parcial de genes envolvidos com o processo de diferenciação testicular (*Cyp26b1*, *Ptgds*, *Sox9*, *Amh* e *Dhh*). Tardamente, no 18,5 dpc, ocorre um aumento de expressão dos genes *Sox9* e *Ptgds*, secundário ao processo de masculinização das células de suporte.

Os animais XY *Rspo1*^{-/-}, por sua vez, apresentam fenótipo masculino normal e são férteis. A análise dos animais *Rspo1*^{-/-}, realizada até 10 semanas de idade, não detectou nenhuma alteração na pele ou nas patas destes animais (Tomizuka et al., 2008; Chassot et al., 2008).

Outros modelos animais. A R-spondina-1 atua como um amplificador tecido e tempo específico da atividade da β -catenina. Liu et al., com o objetivo de avaliar o papel da β -catenina na determinação sexual, geraram modelos animais com *knockout* condicional do gene desta proteína nas células somáticas *Sf1* (*Steroidogenic factor 1*) positivas (*SF1Cre*; *Ctnnb1f/2*). Os animais XX *SF1Cre*; *Ctnnb1f/2* apresentaram masculinização da genitália interna (persistência de derivados wolffianos) e alterações morfológicas nos ovários semelhantes às aquelas detectadas nas fêmeas *Rspo1*^{-/-} e *Wnt4*^{-/-} (formação de vasos celômicos, migração de células esteroideogênicas e aplasia de células germinativas). Em relação à expressão gênica, nas gônadas dos animais XX *SF1Cre*; *Ctnnb1f/2*, a expressão do gene *Rspo1* era normal, mas os níveis de *Wnt4* e *Fst* eram diminuídos. Estes achados colocam a β -catenina entre a *Rspo1* e o *Wnt4* na via de diferenciação ovariana RSPO1/ β -catenina/WNT4. O *knockout* condicional da β -catenina nos testículos, no entanto, não prejudicou a diferenciação das células de Sertoli, a morfogênese testicular ou a masculinização dos embriões XY

SF1Cre;Ctnnb1f/2. Estes achados indicam que, embora a β -catenina seja expressa em gônadas de ambos os sexos, a proteína é necessária apenas para a diferenciação ovariana (Liu et al., 2009).

O *FoxL2* (*forkhead box L2*) é um fator de transcrição que participa do processo de diferenciação ovariana. Embora *FoxL2* atue em uma via independente da via RSP01/ β -catenina/WNT4, todos estes genes desempenham papéis complementares durante o processo de formação da gônada feminina. Na embriogênese ovariana, o *FoxL2* participa do processo de diferenciação das células da granulosa e na manutenção dos folículos. No período pós-natal, é responsável pela manutenção do fenótipo feminino das células de suporte, atuando como um repressor de genes da via de diferenciação masculina.

Embora os ovários de fêmeas XX *FoxL2*^{-/-} sofram masculinização (os folículos se transdiferenciam em estruturas tubulares semelhantes a túbulos seminíferos e as células da granulosa sofrem alterações estruturais que as deixam semelhantes às células de Sertoli), não ocorre reversão sexual gonadal completa (Ottolenghi et al., 2005). No entanto, a geração de um modelo duplo-*knockout* para os genes *FoxL2* e *Wnt4* (*FoxL2*^{-/-};*Wnt4*^{-/-}) provocou reversão sexual XX completa. Os animais XX *FoxL2*^{-/-};*Wnt4*^{-/-} desenvolvem testículos que apresentam, ao nascimento, túbulos seminíferos bem desenvolvidos e, curiosamente, células germinativas de ambos os sexos (espermátogônias e oogônias) (Ottolenghi et al., 2007). Posteriormente, a geração de um outro modelo duplo-*knockout*, desta vez para os genes *FoxL2* e *Rspo1* (*FoxL2*^{-/-};*Rspo1*^{-/-}), também provocou reversão sexual XX completa (Auguste et al., 2011).

1.3.3 Outras manifestações clínicas associadas à mutação no gene *R-spondina 1*: correlações fisiopatológicas

Estudos com modelos animais demonstraram que as R-spondinas estão envolvidas no desenvolvimento embrionário e na homeostasia, na vida adulta, de diversos tecidos. Os pacientes com mutação no gene *RSPO1* apresentam, portanto, além do DDS, um fenótipo não sexual complexo e heterogêneo que inclui alterações dermatológicas, oftalmológicas, dentárias e auditivas.

O fenótipo dermatológico, dentre as manifestações da síndrome, é o achado mais homogêneo. O quadro de hiperkeratose palmoplantar e as alterações ungueais estão sempre presentes, embora não haja ocorrência de carcinoma de células escamosas (CCE) em todos os indivíduos afetados.

A R-spondina-1 está envolvida na regulação da diferenciação e proliferação dos queratinócitos (Blaydon et al., 2007; Chua et al., 2011). Em camundongos, o gene está expresso na derme no 12.5 dpc e, a partir do 18.5, sua expressão fica restrita às papilas dérmicas dos folículos pilosos, nos quais persiste até a vida adulta (Radi et al., 2005; Blaydon et al., 2007). Radi et al. demonstraram, por meio de estudos experimentais com tecidos humanos, que a proteína R-spondina-1 não é expressa em culturas de queratinócitos mas é secretada em culturas de fibroblastos, funcionando como um fator parácrino na sinalização entre os dois tecidos (Radi et al., 2005). Estudos com *array* de expressão gênica demonstraram que CCE estão associados com alterações na via de sinalização Wnt (Haider et al., 2006). Alterações na expressão e secreção da R-spondina-1 poderiam, portanto, por um desequilíbrio de sinalização epidérmico-mesenquimal, levar a um quadro de crescimento e diferenciação celular anormais dos queratinócitos, explicando as manifestações cutâneas da síndrome.

Em relação às demais manifestações da síndrome (alterações oftalmológicas, hipoacusia e doença periodontal), o fenótipo é menos homogêneo e a fisiopatologia não está esclarecida.

Recentemente, estudos *in vitro* com tecidos humanos demonstraram que a R-spondina-1 promove proliferação de células endoteliais da córnea (Okumura et al., 2014). Nos camundongos, a proteína R-spondina-1 é expressa em células mesenquimais ao redor do disco óptico no 10,5 dpc (Nam et al., 2007). Além disso, o receptor Lgr4 (GPR48), um dos receptores da R-spondina-1, é importante para o desenvolvimento do segmento anterior dos olhos. O camundongo *Gpr48*^{-/-} apresenta um amplo espectro de alterações oculares, incluindo microftalmia, hipoplasia de íris, malformação do ângulo iridocorneal, disgenesia corneal e catarata (Weng et al., 2008).

O Lgr5 (GPR49), por sua vez, apresenta um padrão de expressão dinâmico na cóclea durante a embriogênese do ouvido interno em camundongos. O receptor Lgr5 também é expresso em células do epitélio sensorial do ouvido interno do animal adulto (Chai et al., 2011; Shi et al., 2012). A análise das R-spondinas e dos receptores Lgrs por estudos comparativos de hibridação *in situ*, em conjunto com estudos em modelos animais *knockout*, mostraram que as moléculas R-spondina/Lgr também estão envolvidas na odontogênese dos camundongos (Kawasaki et al., 2014).

Portanto, é possível que a R-spondina-1 também desempenhe papéis semelhantes em humanos, ou seja, esteja envolvida na embriogênese dos olhos, ouvido interno e dentes, o que justificaria os fenótipos não sexuais apresentados pelos indivíduos portadores de mutação no gene *RSPO1*.

1.4 Hipótese

Os distúrbios do desenvolvimento sexual associados à reversão sexual XX são doenças raras. O ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) possui um considerável número de pacientes portadores de DDS 46,XX Testicular e Ovotesticular, os quais foram extensivamente estudados

nos últimos anos com o objetivo de definir a etiologia do distúrbio do desenvolvimento sexual.

Rastreando mutações na região codificadora do gene *RSPO1* em uma casuística de pacientes portadores de DDS 46,XX com pesquisa de *SRY* negativa (15 indivíduos DDS Ovotesticular e 4 indivíduos DDS 46,XX Testicular) identificamos uma nova variante alélica no gene *RSPO1*.

A nova variante foi identificada em um paciente portador de DDS 46,XX Testicular associado à hiperqueratose palmoplantar. Vale destacar que esse paciente era filho de pais consanguíneos e procedente de uma grande família consanguínea com outros indivíduos afetados pelo fenótipo de HPP. A partir das evidências referidas, trabalhamos com a hipótese de que a nova variante alélica era patogênica, sendo responsável por uma rara síndrome genética de herança autossômica recessiva associada a alterações do desenvolvimento sexual e a alterações cutâneas. A confirmação dessa hipótese traria importantes implicações práticas para a família uma vez que a síndrome causada por mutações no gene *RSPO1* está associada com predisposição para câncer do tipo células escamosas.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

Objetivo fundamental

1. Rastrear mutações na região codificadora do gene *RSPO1* em casos familiares de DDS 46,XX Testicular SRY negativo com hiperkeratose palmoplantar.

Objetivos específicos

1. Correlacionar os achados moleculares com o fenótipo dos pacientes afetados e segregá-los entre os membros da família.
2. Analisar as repercussões da mutação sobre a estrutura e função da proteína por meio de dinâmica molecular e experimentos de transfecção transitória *in vitro*, respectivamente.
3. Estudar o padrão de expressão dos genes *WNT4*, *RSPO1*, *FOXL2*, *CTNNB1*, *FGF9* e *SOX9* no tecido gonadal de um paciente portador de DDS 46,XX Testicular secundário à mutação no gene *RSPO1* por meio de RT-PCR em tempo real.
4. Estudar as proteínas Wnt-4, R-spondina-1, FoxL2, β -catenina, Fgf9 e Sox9 no tecido gonadal de um paciente portador de DDS 46,XX Testicular secundário à mutação no gene *RSPO1* por meio de imuno-histoquímica.
5. Investigar potenciais genes modificadores do fenótipo de reversão sexual XX por meio da análise de MLPA, array-CGH e exoma.

3 Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa (protocolo 0182/10) foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Os procedimentos de pesquisa foram iniciados após autorização dos pacientes, pais ou tutores por meio de assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo). Os pacientes portadores da variante alélica patogênica do gene *RSPO1* e seus familiares receberam aconselhamento genético.

3.2 Casuística

A família caracterizada no estudo é natural de dois municípios vizinhos do interior do Rio Grande do Norte (Severiano Melo e Apodi) e foi identificada a partir de um caso-índice (Figura 2). O probando é filho de pais consanguíneos e foi diagnosticado com hiperkeratose palmoplantar (HPP) e DDS 46,XX Testicular *SRY* negativo durante propedêutica para ambiguidade genital. A história familiar deste indivíduo era notável devido ao relato de múltiplos casamentos consanguíneos que originaram vários indivíduos afetados com o fenótipo dermatológico de HPP. Foram avaliados 67 indivíduos, englobando 4 gerações da família.

Figura 2 - Localização de Severiano Melo e Apodi no Rio Grande do Norte. (A) Severiano Melo está localizado na microrregião de Pau dos Ferros e possui 5.752 habitantes (IBGE/2010). (B) O município de Apodi está localizado na microrregião da Chapada do Apodi e possui 36.120 habitantes. (IBGE/2014). Adaptado de: "RioGrandedoNorte Municip SeverianoMelo" e "RioGrandedoNorte Municip Apodi", por Raphael Lorenzeto de Abreu - Image:RioGrandedoNorteMesoMicroMunicip.svg, own work, por Raphael Lorenzeto de Abreu. Licenciado sob CC BY 2.5, via Wikimedia Commons https://commons.wikimedia.org/wiki/File:RioGrandedoNorte_Municip_SeverianoMelo.svg#/media/File:RioGrandedoNorte_Municip_SeverianoMelo.svg. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:RioGrandedoNorte_Municip_Apodi.svg#/media/File:RioGrandedoNorte_Municip_Apodi.svg.

3.3 Avaliação clínica

A grande maioria dos familiares reside no Rio Grande do Norte e, uma parcela menor, em São Paulo, capital. Os familiares foram avaliados nos seus domicílios nas cidades de Severiano Melo, Apodi e São Paulo. As informações sobre a história patológica pregressa e a história familiar foram obtidas por meio de entrevista. Todos foram submetidos à avaliação clínica, a qual foi realizada pelo mesmo examinador e consistiu na inspeção dos olhos e das regiões palmar e plantar para determinar se as alterações dermatológicas (espessamento da pele) e oftalmológicas (opacidades corneanas) associadas à síndrome estavam presentes.

3.4 Avaliação hormonal e citogenética

A avaliação hormonal realizada durante a investigação diagnóstica constituiu-se de dosagens basais de hormônio luteinizante (LH, *luteinizing hormone*), hormônio folículo estimulante (FSH, *follicle-stimulating hormone*), testosterona (T), estradiol (E2), inibina B (InB) e hormônio anti-Mülleriano (AMH, *anti-müllerian hormone*). As dosagens hormonais foram determinadas pelos métodos: ensaio imunofluorométrico em kits AutoDelfia (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, EUA) para LH, FSH, E2 e T e enzimaímunoensaio em kits Beckman (Beckman Coulter Company, Brea, CA, EUA) para InB. As dosagens para o AMH, por sua vez, foram determinadas por enzimaímunoensaio utilizando-se 2 kits: AMH Gen II (Beckman Coulter Company Brea, CA, EUA) ou UltraSensitive AMH/MIS (Ansh Labs, Webster, TX, EUA). As dosagens hormonais foram realizadas no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/Laboratório de Investigação Médica 42 (LIM 42). Os resultados dos pacientes foram comparados aos valores de referência de indivíduos normais estudados no mesmo laboratório.

O estudo citogenético foi realizado a partir de cultura de linfócitos de sangue periférico por meio de técnica de coloração convencional e bandamento G, no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM 42 da Disciplina de Endocrinologia pelas biólogas Maria Aparecida Medeiros e Dra. Mirian Yumie Nishi (Beiguelman, 1986).

3.5 Análise do DNA

3.5.1 Extração do DNA

As amostras de DNA (*deoxyribonucleic acid*) genômico foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico e esfregaços de mucosa oral. A extração foi realizada seguindo-se o protocolo padronizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42 da Disciplina de Endocrinologia pela técnica Cristina Rossi. O protocolo de extração do DNA a partir de leucócitos de sangue periférico baseia-se na técnica de *salting out* descrita por Miller et al., mas com algumas modificações (Miller et al., 1988). O protocolo de extração do DNA a partir de esfregaço de mucosa, por sua vez, baseia-se na técnica descrita por Abrão et al. (Abrão et al., 2005).

3.5.2 Amplificação e sequenciamento gênico

Pesquisa do gene *SRY*: a análise da presença do gene *SRY* foi realizada no Laboratório de Hormônio e Genética Molecular/LIM42 da Disciplina de Endocrinologia por meio da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a região codificadora e condições previamente padronizadas por Domenice et al. (Domenice et al., 2001).

Amplificação do gene *RSPO1*: os oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região codificadora (sequência de referência NM_001038633.2) foram desenhados por meio do programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) e estão especificados na Tabela 2.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento da região codificadora do gene *RSPO1*

Éxon(s)	Oligonucleotídeos	Fragmento Amplificado	Temperatura de Annealing
4	4F CGGTCCCAGGTTAGGGAAT	676 pb	57°C
	4R GGAAGTCTGCAAGGGTCATC		
5	5F TTCTGTGGAAGGAAACATCG	445 pb	58°C
	5R GTGCGGCTGGATACTTGAAT		
6 e 7	6-7F TGCCACTGCCCTTCCTTT	916 pb	56°C
	6-7R TGCCCTGAAGCTTCTTCCT		
8A	8AF TTCCTCACACTCCCCTCCT	952 pb	60°C
	8AR ATTCCCTGTCCCTTCTTGCT		
8B	8BF AGCAGTAGACACAGGCACCA	911 pb	58°C
	8BR CATCCTTCAGAGTTAGGCTC		

As reações de amplificação do gene *RSPO1* foram realizadas em um volume total de 25 µL utilizando-se 100 a 200 ng de DNA genômico, 100 µM de cada dNTP (*deoxyribonucleotide triphosphates*), 20 pmol de cada oligonucleotídeo, 3 U de *GoTaq DNA polymerase*, 5 µL de tampão 5X *Green GoTaq™ Reaction Buffer*, ambos fornecidos pelo mesmo fabricante (Promega Corporation, Madison, WI, EUA).

As amostras de DNA foram submetidas ao protocolo de amplificação específico para cada par de oligonucleotídeos em termociclador automático Veriti 96 Thermal Cycler (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) conforme especificado na Tabela 3.

Todas as amplificações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes exceto o DNA). As amostras amplificadas foram avaliadas em gel de agarose preparado com tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X e corado com brometo de etídio ou corante fluorescente

Sybr Safe (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) e observadas em transiluminador ultravioleta.

Tabela 3 - Protocolo de amplificação da região codificadora do gene *RSPO1*

Temperatura	Tempo		Número de ciclos		
96°C	5 minutos		1		
94°C	30 segundos		30 ou 35		
<i>Annealing</i>	30 segundos		30 ou 35		
72°C	1 minuto		30 ou 35		
72°C	10 minutos		1		
15°C	∞		∞		

Éxon	4	5	6-7	8A	8B
<i>Annealing</i>	57°C	58°C	56°C	60°C	58°C
Número de ciclos	30	30	30	35	35

Sequenciamento direto do gene *RSPO1*. Em primeiro lugar, os produtos de PCR de fita dupla foram purificados com a enzima *ExoSAP-IT* (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido): 2 µL de enzima e 5 µL de produto de PCR foram submetidos a um ciclo de 37°C por 15 minutos seguido por um segundo ciclo de 80°C por 15 minutos, realizado em termociclador automático. Posteriormente, os produtos de PCR purificados foram sequenciados usando o produto *ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA): 7 µL de produto de PCR purificado, 2 µL de reagente *BigDye Terminator*, 6 µL de tampão de sequenciamento e 10 pmol de um dos oligonucleotídeos específicos para cada éxon foram submetidos ao protocolo de sequenciamento constituído por 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, realizado

em um termociclador automático Veriti 96 Thermal Cycler (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA).

O produto da reação de sequenciamento foi precipitado segundo o protocolo do isopropanol/etanol e posteriormente submetido a uma eletroforese capilar no sequenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) pela bióloga Ma. Mariana Ferreira de Assis Funari.

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados do National Center for Biotechnology and Information (NCBI). A análise foi realizada pelo programa “Sequencher 4.9” (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EUA).

3.5.3 Avaliação do número de cópias

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). A verificação do número de cópias do gene *WNT4*, do gene *SOX9* e de sua região regulatória proximal (1,5 Kb a montante do gene) foi realizada por amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) utilizando-se o ensaio comercial SALSA MLPA KIT P185-B2 Intersex (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda), desenhado especificamente para avaliação de genes envolvidos no processo de determinação sexual. O kit comercial P185-B2 contém sondas para os seguintes genes: *NR0B1* (Xp21.2), *SOX9* (17q24.3), *SRY* (Yp11.3), *WNT4* (1p36.12) e *NR5A1* (9q33). Além destas, são inclusas sondas para a enzima *CYP21A2* e seu pseudogene *CYP21A1P*; bem como sondas para regiões específicas dos cromossomos sexuais X e Y. Todas as etapas foram realizadas de acordo com as instruções do produto pela bióloga Dra. Mirian Yumie Nishi.

Microarray-Comparative Genomic Hybridization (array-CGH). A técnica array-CGH utiliza como alvo de hibridação um conjunto de sondas, com localização previamente conhecida nos cromossomos, organizadas em alta densidade em uma lâmina de vidro (*gene chip*) e permite avaliar,

simultaneamente, milhares de sequências alvo do genoma. Apresenta resolução aproximadamente 80 vezes maior do que a das técnicas de bandeamento cromossômico e foi utilizada para detectar deleções ou duplicações de segmentos cromossômicos em apenas um dos afetados, o qual apresentava um fenótipo diferente dos demais indivíduos 46,XX com mutação no gene *RSPO1* (ausência de reversão sexual). O exame foi realizado utilizando-se a plataforma *Human Genome CGH Microarray 180K* pelo Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

3.5.4 Avaliação do exoma

A família foi submetida a técnicas de alto débito para sequenciamento de exoma com o objetivo de investigar potenciais genes modificadores do fenótipo de reversão sexual XX. Para o estudo foram incluídos: (a) 4 homens 46,XY portadores de hiperkeratose palmoplantar (HPP) e mutação em homozigose no gene *RSPO1*; (b) 4 homens 46,XX portadores de HPP, ambiguidade genital e mutação em homozigose no gene *RSPO1*; (c) 1 mulher 46,XX portadora de HPP e mutação em homozigose no gene *RSPO1*; (d) os pais da mulher afetada, os quais não são afetados pelo fenótipo de HPP e apresentam a mutação no gene *RSPO1* em heterozigose; (e) 1 irmã do probando, a qual não apresenta fenótipo de HPP ou mutação no gene *RSPO1* e (f) 1 mulher (esposa de um tio-avô do probando), natural da mesma cidade mas não relacionada geneticamente com os afetados, que não apresenta fenótipo de HPP ou mutação no gene *RSPO1*.

O DNA genômico foi mecanicamente fragmentado em um sonicador Covaris (Covaris, Inc., Woburn, MA, USA). As bibliotecas de exomas foram construídas utilizando o kit *SureSelectXT Human All Exon V5* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42 da Disciplina de Endocrinologia pela bióloga Dra. Mirian Yumie Nishi. O sequenciamento foi realizado no instrumento HiSeq 2500, utilizando o kit para sequenciamento *HiSeq SBS Kit V4* (Illumina, San

Diego, CA, EUA) no Laboratório de Investigação em Neurologia/Laboratório de Investigação Médica 15 (LIM15). Todas as etapas foram realizadas de acordo com as instruções dos fabricantes.

Os dados brutos do sequenciamento foram inicialmente submetidos à análise de controle de qualidade através do software FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Constatada a qualidade satisfatória dos arquivos FASTQ, estes foram alinhados ao genoma referência hg19/GRCh37 através do software BWA (Li; Durbin, 2009). Posteriormente, foi realizada a ordenação de acordo com as coordenadas genômicas e a marcação dos fragmentos duplicados, através do software biobambam2 (Tischler; Leonard, 2014). Os arquivos BAM resultantes foram então avaliados através do software Qualimap a fim de se obter parâmetros referentes à cobertura das regiões alvo, tais como cobertura média, níveis de duplicação e regiões não cobertas (García-Alcalde et al., 2012). A identificação de variantes, a qual resulta na geração de um arquivo VCF (Variant Call Format), foi feita através do software Freebayes (Garrison; Marth). Este arquivo contém uma listagem (por amostra) de todos os pontos em que há divergência em relação ao genoma-referência. Em seguida, os arquivos VCF foram anotados através do software ANNOVAR (Wang et al., 2010). Neste ponto, são adicionadas informações a respeito das consequências funcionais da alteração (como tipo de mutação, gene, transcrito, códon e alteração na sequência da proteína), bem como as frequências de determinada mutação em bancos de dados populacionais e a predição *in silico* de patogenicidade. Finalmente foram selecionadas variantes não-sinônimas ou *indels* (no caso de regiões codificantes) e *splicing-site* SNP (*single nucleotide polymorphism*) de possíveis genes moduladores do fenótipo (no caso, que pudessem explicar a ausência de reversão sexual na mulher afetada). A seleção dos genes foi baseada nos seguintes critérios: (a) genes da cascata de diferenciação sexual, tais como *WNT4*, *FOXL2*, *SOX9*, *FGF9*; (b) componentes canônicos da via Wnt que apresentam interação direta com a R-spondina 1, conforme o banco de dados de interação proteína-proteína STRING ou com evidências

na literatura (Anexo, Figura 1) (Szklarczyk et al., 2015). Foram selecionadas apenas variantes que estivessem presentes na mulher e ausentes nos indivíduos XX com DDS. As etapas de tratamento em bioinformática foram realizadas pelo Dr. Antonio Marcondes Lerario.

3.6 Análise do RNA

3.6.1 Preparação das amostras

Cultura de fibroblastos: o probando foi submetido a uma biópsia de pele da região abdominal, a qual foi realizada no ambulatório após assepsia e anestesia local. O produto da biópsia de pele foi fragmentado em segmentos menores que foram transferidos para frascos para cultura celular de 25 cm², contendo *AmnioMax™-C100 Basal* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com 20% de *AmnioMax™-C100 Supplement* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Os frascos de cultura foram mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias e, após a proliferação dos fibroblastos, os fragmentos iniciais foram retirados e, as células aderentes, tratadas com tripsina 0,25%/EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e transferidas para frascos de 75 cm², onde se expandiram até a confluência. Posteriormente, parte dos fibroblastos foi transferida para criotubos e armazenada em nitrogênio líquido; a outra parte foi transferida para tubo de centrifuga para a extração de RNA (*ribonucleic acid*).

Biópsia gonadal: o probando foi submetido à biópsia testicular durante o procedimento cirúrgico de genitoplastia com o objetivo de definir o diagnóstico do distúrbio do desenvolvimento sexual. Fragmentos deste tecido gonadal foram conservados em nitrogênio líquido e usados para extração de RNA. Foi utilizado como controle um *pool* comercial de RNA total de testículos e ovários humanos (Clontech Laboratories, Mountain, CA, USA).

3.6.2 Extração do RNA

A extração de RNA total da cultura de fibroblastos do probando foi realizada pelo método do reagente *Trizol* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A qualidade do RNA extraído foi avaliada a partir da relação de absorbância A260/280 e da integridade das bandas de RNA ribossômico em gel de agarose 1% após eletroforese. As concentrações das amostras de RNA total foram determinadas em espectrofotômetro. O cDNA (*complementary deoxyribonucleic acid*) de fibroblasto controle, cedido gentilmente pela Dra. Luciana Ribeiro Montenegro, foi confeccionado a partir de RNA total extraído de cultura celular pelo método do reagente *Trizol* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A extração de RNA total da biópsia testicular foi realizada utilizando-se o produto comercial *RNasy Plus Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), método que utiliza coluna de afinidade e é próprio para o isolamento de RNA a partir de cultura celular (acima de 10^7 células) e amostras teciduais pequenas (5-30mg). O método de extração, em termos gerais, consiste em: (1) lise celular e homogeneização das amostras utilizando-se tampão específico contendo isotiocianato de guanidina; (2) passagem do material homogeneizado por coluna específica para remoção do DNA genômico; (3) passagem do material por coluna com alta afinidade pelo RNA para retenção; (4) lavagem da coluna com o RNA retido com 2 tampões específicos para retirada de contaminantes; (5) eluição com água e remoção do RNA da coluna através de centrifugação. A qualidade do RNA extraído foi avaliada a partir do índice de integridade do RNA (RIN) utilizando-se o kit *RNA 6000 Nano do Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). As concentrações das amostras de RNA total foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

O *pool* de RNA total de testículos humanos (Clontech Laboratories, Mountain, CA, USA) utilizados como controle também foi extraído por método modificado que utiliza isotiocianato de guanidina, mas o protocolo não é informado pelo fabricante.

O cDNA foi sintetizado por transcrição reversa utilizando-se os produtos comerciais *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA).

3.6.3 Amplificação e sequenciamento do cDNA

Amplificação do cDNA do gene *RSPO1*: os oligonucleotídeos utilizados para amplificação das isoformas do gene foram desenhados através do programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) e estão especificados na Tabela 4.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento do cDNA do gene *RSPO1*

Isof.	Oligonucleotídeo	cDNA	Proteína
1	F (Isof. 1 e 3)	ATGCGGCTTGGGCTGTGTGT	792 pb 263 aa
	R Universal	CTAGGCAGGCCCTGCAGATGTGAGT	
2	F (Isof. 2)	ATGATATTCCGAGTCAGTGCCGAGG	711 pb 236 aa
	R Universal	CTAGGCAGGCCCTGCAGATGTGAGT	
3	F (Isof. 1 e 3)	ATGCGGCTTGGGCTGTGTGT	603 pb 200 aa
	R Universal	CTAGGCAGGCCCTGCAGATGTGAGT	

As reações de amplificação do cDNA do gene *RSPO1* foram realizadas em um volume total de 25 µL utilizando-se 250 a 500 ng de cDNA, 100 µM de cada dNTP, 3 U de *GoTaq DNA polymerase*, 5 µL tampão *5X Green GoTaq™ Reaction Buffer*, ambos fornecidos pelo mesmo fabricante (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). As quantidades de oligonucleotídeos (10 pmol/µL) utilizadas em cada reação de amplificação estão especificadas na Tabela 5. As amostras foram submetidas ao protocolo de amplificação especificado na Tabela 6.

Tabela 5 - Estequiometria da reação de amplificação das isoformas do gene *RSPO1*

Isoforma	R Universal	F (Isof. 1 e 3)	F (Isof. 2)	dNTP (μ M)	GoTaq	Tampão
1, 2 e 3	3 μ L	2 μ L	1 μ L	100 μ M	3 U	5 μ L
1 e 3	2 μ L	2 μ L	-	100 μ M	3 U	5 μ L
2	1 μ L	-	1 μ L	100 μ M	3 U	5 μ L

Posteriormente 1 μ L do produto de PCR da primeira reação foi novamente amplificado utilizando-se a mesma estequiometria da reação descrita acima e as mesmas condições de amplificação especificadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Protocolo de amplificação das isoformas do gene *RSPO1*

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
96°C	5 minutos	1
94°C	30 segundos	35
70°C	30 segundos	35
72°C	1 minuto	35
72°C	10 minutos	1
15°C	∞	∞

Todas as amplificações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes exceto o cDNA). As amostras amplificadas foram avaliadas em gel de agarose 2% preparado com tampão TAE 1X e corado com corante fluorescente *Sybr Safe* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) e observadas em transiluminador ultravioleta.

As bandas observadas foram recortadas do gel de agarose e o produto de PCR purificado utilizando-se o produto *Sephaglas BandPrep Kit* (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, USA). As concentrações das amostras foram determinadas em espectrofotômetro.

Sequenciamento direto do cDNA da *RSPO1*: os processos de purificação, sequenciamento e análise do produto de PCR da amplificação do cDNA seguiram os mesmos protocolos descritos previamente para o sequenciamento do DNA.

3.6.4 Avaliação de expressão gênica

A análise de expressão dos genes *CTNNB1* e *RSPO1* nos fibroblastos e dos genes *WNT4*, *RSPO1*, *FOXL2*, *CTNNB1*, *FGF9* e *SOX9* no tecido gonadal foi feita por meio de RT-PCR em tempo real. A quantificação dos produtos de RT-PCR foi realizada pelo sistema de detecção de sequências *ABI Prism 7000* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) utilizando-se ensaios 5' nuclease do sistema Taqman e o *Kit Taqman Universal PCR Master Mix 2X* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Os ensaios Taqman para os genes alvos (Tabela 7) contêm oligonucleotídeos iniciadores exônicos e sondas específicas interexônicas para o fragmento amplificado, que garantem a não amplificação de DNA genômico. As sondas dos genes alvos são marcadas com a fluorescência FAM, ao passo que as sondas dos genes endógenos são marcadas com VIC. Estas sondas incitam comprimentos de ondas bem distintos, que emitem sinal captado pela câmera CCD do aparelho. Os resultados foram arquivados em um software do SDS 7000, para posterior análise. Foi realizada a quantificação relativa de cada gene, utilizando como calibrador o fibroblasto de indivíduo controle e o *pool* comercial de testículo. O cálculo da quantificação, de forma a permitir uma comparação expressa em número de vezes, foi realizado utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ conforme descrito por Livak e Schmittgen, onde o ΔCT é diferença de expressão entre o gene alvo e o endógeno de uma determinada amostra e o $\Delta\Delta CT$ corresponde à diferença entre o ΔCT da amostra do probando e o ΔCT do calibrador (Livak; Schmittgen, 2001). Foram consideradas variações significativas valores relativos $> 2,5$ ou $< 0,4$.

Padronização dos genes endógenos. Para validação do $2^{-\Delta\Delta CT}$ devemos demonstrar que a eficiência de amplificação do gene alvo e dos genes endógenos é a mesma. Para tanto, padronizamos uma curva de diluição com o gene alvo e oito genes endógenos (β -actina, *TBP*, *PGK1*, *B2M*, *GADPH*, *GUS*, *TFR*, *HPRT*) com o objetivo de selecionar os genes endógenos mais apropriados. Realizamos diluições logarítmicas progressivas de amostras de cDNA de fibroblastos e tecido gonadal (100 ng a 0,01 ng) de forma a verificarmos se a diferença entre elas é de um ciclo (CT). Cada ponto da reta é estabelecido pela relação do log da quantidade da amostra no eixo das abscissas e o seu CT no eixo das ordenadas. O experimento é validado por uma equação da reta, cuja inclinação seja mais próximo de -3,3 com uma relação $r > 0,99$. Os seguintes genes endógenos apresentaram os melhores parâmetros e foram selecionados para os estudos de expressão gênica: β -actina, *TBP*, *PGK1*, *B2M* (Tabela 7).

Tabela 7 - Características dos genes alvos e endógenos estudados por RT-PCR em tempo real

Gene	Nome	Função	Ensaio
<i>WNT4</i>	<i>Wingless-related MMTV integration site 4</i>	Molécula de sinalização	Hs00229142_m1*
<i>RSPO1</i>	<i>R-spondin1</i>	Molécula de sinalização	Hs00543475_m1*
<i>FOXL2</i>	<i>Forkhead box L2</i>	Fator de transcrição	Hs00846401_s1
<i>CTNNB1</i>	<i>Beta-catenin</i>	Fator de transcrição	Hs00355049_m1*
<i>FGF9</i>	<i>Fibroblast growth factor 9</i>	Molécula de sinalização	Hs00181829_m1*
<i>SOX9</i>	<i>SRY-box containing gene 9</i>	Fator de transcrição	Hs00165814_m1*
<i>ACTB</i>	<i>Beta actin</i>	Proteína estrutural citoesquelética	4326315E
<i>TBP</i>	<i>TATA-box binding protein</i>	Fator de transcrição geral da RNA polimerase II	4326322E
<i>PGK1</i>	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	Enzima glicolítica	4326318E
<i>B2M</i>	<i>Beta-2-microglobulin</i>	Molécula do complexo principal de histocompatibilidade I	4326319E

3.7 Imuno-histoquímica

O método imuno-histoquímico utilizado baseia-se na técnica de peroxidase com recuperação antigênica por calor úmido. Brevemente consiste em: (1) desparafinização dos cortes com o material incluído em parafina por meio de incubações com xilol; (2) hidratação das lâminas com banhos de etanol de concentrações decrescentes; (3) recuperação antigênica com tampão citrato 10 mM pH 6,0 (no caso dos anticorpos CTNNB1, WNT4, SOX9 e FGF9) ou EDTA pH 8,0 (no caso dos anticorpos

RSPO1 e FOXL2) em panela a vapor; (4) bloqueio da enzima peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 6% diluído em metanol volume:volume na proporção de 1:1; (5) bloqueio de cargas com solução comercial *CAS-Block™* (Invitrogen Corporation/Zymed Laboratories, Carlsbad, CA, EUA); (6) incubação da lâmina com um dos anticorpos primários descritos na Tabela 8, em títulos previamente otimizados; (7) incubação das lâminas com um dos sistemas de detecção *SuperPicTure Polymer Detection Kit* (Invitrogen Corporation/Zymed Laboratories, Camarillo, CA, EUA) – no caso do anticorpo FOXL2 – ou *Novocastra Novolink Polymer Detection Systems* (Leica Biosystems Newcastle Ltda, Newcastle Upon Tyne, UK) – no caso dos demais anticorpos; (8) revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06% e dimetil sulfóxido a 1% em PBS; (8) contracoloração com hematoxilina de Harris; (9) desidratação dos cortes com etanol, diafanização em banhos de xilol e montagem das lâminas com resina sintética Entellan (Merck).

Tabela 8 - Título e fonte dos anticorpos primários

Anticorpo	Título	Clone	Fonte	Controle Positivo
WNT4	1:400	Policlonal IgG de coelho	USBiological (W3021-01C)	Rim
RSPO1	1:50	Policlonal IgG de coelho	Abcam (ab73760)	Ovário
FOXL2	1:50	Policlonal IgG de cabra	Abcam (ab5096)	Ovário
CTNNB1	1:800	Policlonal IgG de coelho	Atlas (HPA029160)	Rim
FGF9	1:800	Policlonal IgG de coelho	Abcam (ab71395)	Carcinoma renal
SOX9	1:100	Monoclonal IgG de coelho	Abcam (ab76997)	Amígdala

Um conjunto extra de lâminas permaneceu em incubação com PBS, albumina bovina e Na₃N 0,1%, sem anticorpo primário, servindo como controles negativos. Outro conjunto de lâminas, de tecidos sabidamente positivos para cada um dos anticorpos primários utilizados (Tabela 9), também seguiu em paralelo, servindo como controle positivo das reações.

Foram submetidas à avaliação imuno-histoquímica, além da amostra de tecido testicular do probando, 2 amostras (amostra A, paciente de 23 anos e amostra B, paciente de 54 anos) de gônadas de indivíduos controle do sexo masculino e 1 amostra (amostra C, paciente de 30 a 40 anos) de gônada de controle do sexo feminino sem distúrbios do desenvolvimento sexual.

As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz convencional por um único patologista. Primeiro avaliou-se, para cada um dos anticorpos estudados: (a) se havia células positivas (com marcação em marrom) na amostra e (b) o padrão da imunomarcação das proteínas nas células coradas (membrana, núcleo ou citoplasma). Posteriormente, nas amostras de testículos (probando, amostras A e B), foi realizada uma análise subjetiva da imunoexpressão, sendo avaliadas: (a) a quantidade (0 a 100%) de células positivas e (b) a intensidade (fraca ou forte) da imunomarcação no tecido.

3.8 Estudo funcional

3.8.1 Plasmídios

A ativação da via Wnt/ β -catenina resulta em desfosforilação, estabilização e translocação para o núcleo da proteína β -catenina que, por sua vez, liga-se aos fatores de transcrição LEF-1/TCF, desencadeando transcrição gênica.

O vetor TOPFLASH (Millipore Corporation, Temecula, CA, EUA) é um *reporter* da via Wnt e foi utilizado para avaliar a capacidade das proteínas R-

spondina-1 mutante e selvagem de ativar a via de sinalização Wnt/ β -catenina. Trata-se de um plasmídeo quimérico contendo três cópias do sítio de ligação do TCF a montante do promotor TK (*thymidine kinase*) e da sequência aberta de leitura (*open reading frame* ou ORF) do gene da *Firefly* luciferase (Anexo; Figura 2).

Os vetores de expressão pCMV6-XL5 (OriGene Thecnologies, Rockville, MD, EUA) clonados com as sequências de cDNA humano selvagens dos genes *RSPO1* (NM_001038633.2) e *CTNNB1* (NM_001904.2) foram utilizados nos estudos de expressão em células de mamíferos (Anexo; Figura 3).

O vetor pCMV6-XL5 vazio utilizado como controle foi obtido a partir do vetor pCMV6-XL5 CTNNB1 selvagem. Em primeiro lugar, 1 μ g do DNA plasmidial foi submetido a digestão enzimática a 37°C por 18 horas em um volume total de 50 μ L utilizando-se 10 U da enzima Not I (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, EUA), 5 μ L do tampão 3 (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, EUA) e 50 μ g de BSA (*Bovine Serum Albumin*). Posteriormente, a amostra digerida foi analisada em gel de agarose 1,5% e a banda correspondente ao DNA plasmidial foi recortada e purificada utilizando-se o produto *Sephaglas BandPrep Kit* (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, USA). Finalmente, 200 ng de DNA plasmidial purificado foram submetidos a uma reação de ligação a 26°C por 4 horas em um volume total de 20 μ L utilizando-se 1 U da enzima T4 DNA Ligase e 4 μ L do tampão de ligação (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, EUA).

O vetor pCMV6-XL5 RSPO1 mutado foi obtido a partir do vetor pCMV6-XL5 RSPO1 selvagem por meio de mutagênese sítio específica. Os oligonucleotídeos mutagênicos (Tabela 9) foram confeccionados por meio de ferramentas de bioinformática. O experimento de mutagênese foi realizado segundo o protocolo do fabricante do produto *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Após a mutagênese, os clones foram sequenciados utilizando-se o oligonucleotídeo específico VP1.5 para pesquisa de incorporação da mutação.

Tabela 9 - Oligonucleotídeos utilizados para mutagênese sítio específica do gene *RSPO1*

Mutação	Oligonucleotídeos mutagênicos	Ferramenta
c.305G>A	CATCAAATGCAAGATCGAGCACTATGAGGCCTGCTT	QuickChange Primer Design [#]
	AAGCAGGCCTCATAGTGCTGCATCTTGCATTTGATG	
c.305G>A	GCAAGATCGAGCACTATGAGGCCTGCTTCAG	SlimVector [*]
	GGCTGAAGCAGGCCTCATAGTGCTCGATCT	

[#]<https://www.genomics.agilent.com/CollectionSubpage.aspx?PageType=Tool&SubPageType=ToolQCPD&PageID=15>

^{*}[HTTP://WWW.PREMIERBIOSOFT.COM/MUTAGENESIS/DOWNLOADMP.HTML](http://www.premierbiosoft.com/mutagenesis/downloadmp.html)

Os vetores TOPFLASH e pCMV6-XL5 foram transformados por meio de choque térmico utilizando as cepas competentes de *Escherichia coli* TOP10 e DH5α, respectivamente. O protocolo de transformação dos vetores consistiu em: (1) descongelar rapidamente as células competentes de *Escherichia coli* em gelo; (2) adicionar 1 µL de plasmídeo em 50 µL de células competentes, homogeneizar cuidadosamente e incubar em gelo por 30 minutos; (4) incubar as células a 42°C por exatamente 45 segundos no caso da cepa TOP10 e por exatamente 30 segundos no caso da cepa DH5α; (5) remover as células imediatamente para o gelo e adicionar 250 µL de meio de recuperação SOC; (6) incubar a 37°C com agitação por 1 hora; (6) plaquear 100 a 200 µL da solução de transformação diluídos em meio SOC em concentrações diferentes em placas com LB-ágar e ampicilina; (7) incubar *overnight* a 37°C; (8) selecionar clones inoculando uma colônia em cada tubo de cultura com 5 ml de meio LB (Luria Bertani) com ampicilina (100 µg/ml); (9) incubar *overnight* a 37°C com agitação.

Após a transformação e amplificação dos vetores TOPFLASH, pCMV6-XL5 RSPO1 Selvagem e pCMV6-XL5 CTNNB1 Selvagem, o DNA plasmidial foi extraído e purificado utilizando-se o produto *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA).

Os plasmídios pCMV6-XL5 submetidos à digestão enzimática com Not I e ligação com T4 DNA Ligase foram transformados conforme o protocolo descrito acima. Os plasmídios pCMV6-XL5 RSPO1 submetidos à mutagênese sítio dirigida foram transformados em cepas Epicurium Coli XL1-Blue conforme o protocolo do produto *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Vários clones foram amplificados e o DNA plasmidial purificado utilizando-se o produto *QIAGEN Plasmid Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Após o sequenciamento desses clones, foram selecionados vetores pCMV6-XL5 vazios e os vetores pCMV6-XL5 RSPO1 mutados.

3.8.2 Cultura celular

Células HEK 293FT (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foram utilizadas para os estudos funcionais. A linhagem 293FT deriva-se das células HEK 293T. As células HEK 293T, por sua vez, são variantes da linhagem permanente HEK 293 (células embrionárias de rim humano) transformadas com DNA de adenovírus.

As células 293T apresentam rápida replicação e expressam constitutivamente o gene de adenovírus E1A, que confere a elas a capacidade de produzir grandes quantidades de proteínas. As características mencionadas acima (replicação rápida e grande produção proteica), associadas ao fato de as HEK 293T serem facilmente transfectadas, as tornam muito úteis para ensaios funcionais que envolvem transfecção de genes e avaliação de expressão de proteínas.

A variante 293FT expressa constitutivamente o antígeno T grande do poliovírus SV40 (*Simian vacuolating virus 40*) e o gene de resistência para neomicina. A expressão do antígeno T grande de SV40 é controlada pelo promotor humano do citomegalovírus (CMV).

As células HEK 293FT foram cultivadas em meio de cultura DMEM *High-Glucose* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) com 10% de soro fetal bovino, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1 mM de

piruvato de sódio, 6 mM de L-glutamina e 500 µg/ml de neomicina e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂.

3.8.3 Ensaios de luciferase

Os ensaios de expressão gênica transitória foram realizados utilizando-se os produtos *Lipofectamina 2000* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega Corporation, Madison, WI, EUA).

As células HEK 293FT ($1,2 \times 10^5$ cel/poço) foram semeadas em placas de 24 poços, 24 horas antes da transfecção. No momento da transfecção com *Lipofectamina 2000* as células apresentavam 70 a 80% de confluência. Quantidades variáveis do vetor pCMV6-XL5 RSPO1 (Selvagem ou Mutado), com uma concentração previamente padronizada do vetor pCMV6-XL5 CTNNB1 Selvagem, foram cotransfectados com o plasmídeo *repórter* TOPFLASH. O plasmídeo *reporter* de *Renilla* luciferase pGL4-CMV foi utilizado como controle interno para normalizar as leituras de *Firefly* luciferase.

Os procedimentos para quantificação da atividade da luciferase foram realizados 24 horas após a transfecção. As células HEK foram lisadas e o extrato celular utilizado para a leitura da luminescência da *Firefly* luciferase, seguida da leitura da luminescência da *Renilla* luciferase. As leituras de luminescência foram realizadas no aparelho Synergy HT Bio-tek (BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA).

Desenho dos ensaios de padronização

Avaliação da capacidade da CTNNB1 WT de ativar a via Wnt. Foram cotransfectados 100 ng/poço do plasmídeo TOPFLASH e 2 ng/poço do plasmídeo pGL4-CMV com doses crescentes (0, 5, 10, 25, 50 e 100 ng/poço) do plasmídeo pCMV-XL5 CTNNB1 WT.

Avaliação da capacidade da RSPO1 WT e Mutante de ativar a via Wnt. Foram cotransfectados 100 ng/poço do plasmídeo TOPFLASH, 2

ng/poço do plasmídeo pGL4-CMV, 0 ou 10 ng/poço do plasmídeo pCMV-XL5 CTNNB1 WT com doses crescentes (0, 25, 50, 100, 200 e 400 ng/poço) do plasmídeo pCMV-XL5 RSPO1 (WT e mutante, em ensaios independentes).

3.9 Modelagem e simulação de dinâmica molecular

Modelagem molecular é um termo genérico que se refere às técnicas utilizadas na investigação das estruturas e das propriedades das moléculas através de química computacional e técnicas de visualização gráfica com o objetivo de fornecer, sob um dado conjunto de circunstâncias, um modelo molecular tridimensional aceitável. A dinâmica molecular (DM), por sua vez, é uma simulação computacional dos movimentos físicos dos átomos e moléculas através da integração numérica das suas equações clássicas de movimento, sendo uma ferramenta frequentemente utilizada para o estudo preditivo de movimentos, interações e ligações de proteínas e biomoléculas.

A modelagem da R-spondina-1 e as simulações mecânicas foram realizadas com o programa YASARA (Krieger et al., 2004). Modelos moleculares da proteína R-spondina-1 selvagem (WT) e mutante (Mut) foram construídos a partir da estrutura cristalográfica da *Xenopus* Rspo2 Fu1-Fu2 (PDB 4C8V) e do complexo LGR5-Rspo1-RNF43 (PDB 4KNG) e submetidos a simulações de DM. As trajetórias foram calculadas em meio solvente explícito utilizando-se campos de força YAMBER3 e resolução temporal de 2,5 fs. As diferenças entre as energias de ligação proteína-complexo para a R-spondina-1 selvagem e para a sua versão mutada foram determinadas com o intuito de avaliar potenciais alterações no complexo de sinalização LGR5-Rspo1-RNF43 da via Wnt. As simulações de DM foram realizadas pelo físico Dr. Frederico Moraes Ferreira no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP).

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando os programas SigmaStat version 3.5 (Systat Software Inc. Chicago, IL) e GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., version 6, La Jolla, CA). Na análise do estudo funcional, para comparação entre os grupos, empregou-se o modelo de *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey *post-hoc*. Na análise da dinâmica molecular, as energias médias ou medianas totais e de ligação foram, respectivamente, comparadas com o t-test de Welch's para variâncias desiguais e com o teste de soma de postos Wilcoxon. Entre todos os testes, o nível de significância máximo *p* aceitável foi de 0,05.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização clínica, hormonal e molecular

O probando (IV-11), natural do Rio Grande do Norte, teve diagnóstico de ambiguidade genital ao nascimento e apresentou espessamento das palmas das mãos e plantas dos pés durante a infância. Mudou-se para São Paulo e, aos 25 anos de idade, procurou assistência médica no serviço de Urologia do HC-FMUSP para submeter-se a tratamento cirúrgico de genitoplastia. Aos 26 anos foi encaminhado para o grupo de Endocrinologia do HC-FMUSP para investigação diagnóstica.

Ao exame físico apresentava compleição masculina, ausência de ginecomastia, pelos faciais e corporais escassos. O exame da genitália externa revelou: pênis de 8,5 cm; hipospádia penoescrotal; bolsa bífida; testículo direito de 3,0 x 2,0 cm na porção superior da bolsa e testículo esquerdo de 2,5 x 1,5 cm em região inguinal. A avaliação ultrassonográfica da genitália interna identificou próstata, vesículas seminais e epidídimos mas não detectou derivados müllerianos.

O perfil hormonal do probando revelou concentrações elevadas de gonadotrofinas e concentrações normais mas limítrofes de testosterona livre, quadro sugestivo de hipogonadismo hipergonadotrófico. A concentração de estrogênio (E2), por sua vez, estava dentro dos valores de referência para o sexo masculino. A concentração do hormônio anti-Mülleriano (AMH), no entanto, estava abaixo dos valores de referência para o sexo masculino e, a inibina B (InB), abaixo do nível de detecção do método utilizado para dosagem (Tabela 11).

O estudo histológico da biópsia testicular realizada durante o procedimento cirúrgico de genitoplastia revelou parênquima testicular atrófico, túbulos seminíferos imaturos, presença de células de Sertoli e

ausência de células germinativas. Não foram identificados folículos ovarianos na amostra de tecido analisada.

A avaliação citogenética do caso índice identificou um cariótipo 46,XX e a pesquisa do gene *SRY* foi negativa, sendo então confirmado o diagnóstico de DDS 46,XX Testicular *SRY* negativo. O estudo do gene *SOX9* e de sua região cis-regulatória através de MLPA não detectou alterações de número de cópias. Por último, na análise da região codificadora do gene *RSPO1*, foi detectada uma nova variante alélica, NM_001038633.2:c.305G>A.

A avaliação clínica dos integrantes da família levou à identificação, além do caso índice, de outros nove indivíduos afetados pelo fenótipo dermatológico de hiperkeratose palmoplantar (HPP): 8 homens (3 desses portadores de ambiguidade genital) e uma mulher. Todos os indivíduos afetados eram filhos de pais consanguíneos (Figura 3).

Figura 3 - Heredograma da família portadora da variante *c.305G>A*. Na figura podemos observar 11 indivíduos afetados pelo fenótipo de hiperkeratose palmoplantar: III-13, III-16, III-17, III-19; III-43, III-48; IV-9, IV-10 e IV-11, IV-32, IV-33. Os indivíduos assinalados com um asterisco (*) são portadores de ambiguidade genital: III-16, III-19, III-48 e IV-11. Não foi possível realizar a pesquisa da variante *c.305G>A* no indivíduo III-41, falecido antes do início desse estudo

Foram realizadas avaliação hormonal e pesquisa do gene *SRY* por técnica de PCR em todos os pacientes portadores de HPP. O cariótipo foi analisado em 7/10 indivíduos afetados. Ademais, todos os afetados foram submetidos a avaliação por MLPA. Nenhum paciente apresentou alterações no número de cópias do gene *SOX9* e de sua região cis-regulatória.

Os pacientes afetados pelo fenótipo dermatológico apresentavam espessamento da pele das palmas das mãos e plantas dos pés desde a infância e a intensidade da HPP aumentou progressivamente com o aumento da idade (Figura 4). Em relação ao desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, os homens e a mulher afetados apresentaram puberdade espontânea. Entretanto, os pacientes não souberam especificar a idade exata do início da HPP e da pubarca.

Figura 4 - Hiperceratose palmoplantar. Fotografias ilustrando o espessamento das regiões palmar e plantar do paciente III-16

Os 5 afetados com fenótipo masculino e ausência de ambiguidade genital (III-13, III-17, IV-9, IV-10 e IV-33) apresentaram, na avaliação citogenética e molecular, cariótipo 46,XY e/ou pesquisa do gene *SRY* positiva (Tabela 10). O grupo apresentou, na avaliação laboratorial hormonal, concentrações normais de gonadotrofinas e inibina B e testosterona total dentro dos valores de referência para o sexo masculino. As concentrações de AMH eram normais em 4 indivíduos, mas estavam

abaixo dos valores de referência para o sexo masculino no indivíduo III-13 (Tabela 11).

Identificamos na família um total de 4 indivíduos com fenótipo masculino e ambiguidade genital (III-16, III-19, III-48 e IV-11), que apresentaram, na avaliação citogenética e molecular, cariótipo 46,XX e/ou pesquisa do gene *SRY* negativa (Tabela 10). Este grupo apresentou concentrações elevadas de gonadotrofinas, inibina B indetectável e valores variáveis de testosterona total. Neste grupo, com exceção do caso índice, o AMH estava abaixo do nível de detecção do método (Tabela 11).

No grupo de pacientes com fenótipo masculino e ausência de ambiguidade genital, dois possuem filhos. O indivíduo III-13 teve 8 filhos e o indivíduo III-17 teve 5 filhos. O paciente III-16 apresenta cariótipo 46,XX e ambiguidade genital, é casado, tem história pregressa de infertilidade e 2 filhos adotivos.

A mulher portadora de HPP (IV-32) apresenta fenótipo feminino, cariótipo 46,XX e pesquisa de *SRY* negativa (Tabela 10). Apresentou, na avaliação laboratorial hormonal, concentrações normais de gonadotrofinas; inibina B indetectável; testosterona livre, estrogênio e AMH dentro dos valores de referência normais para o sexo feminino (Tabela 11).

A paciente IV-32 apresentou puberdade espontânea, com menarca aos 11 anos e tem ciclos menstruais regulares, fertilidade normal (2 filhos) e não apresenta sinais clínicos de excesso de andrógenos (acne ou hirsutismo). Referiu que faz acompanhamento médico regular com realização prévia de exame ultrassonográfico pélvico e exames ginecológicos periódicos nos quais nunca foram detectados quaisquer achados anormais.

O paciente III-16, diagnosticado com cariótipo 46,XX e ambiguidade genital, teve o segundo dedo da mão esquerda amputado devido a câncer de pele (Figura 4). O familiar III-41 (irmão do paciente III-46) apresentava HPP e genitália ambígua; faleceu aos 50 anos de idade em decorrência de complicações de câncer de pele com sítio primário em membro inferior.

O caso índice (IV-11) não apresentou alterações na inspeção dos globos oculares no exame clínico inicial. Entretanto, após avaliação especializada no ambulatório de oftalmologia do HC-FMUSP, foram detectados coloboma de íris e retina.

Na avaliação clínica, por inspeção do globo ocular, três familiares apresentaram alterações importantes. O indivíduo III-46, diagnosticado com cariótipo 46,XX e ambiguidade genital, tem amaurose de etiologia não definida de instalação na vida adulta e apresentou, na inspeção, opacidade das córneas, deformidades e irregularidades das íris e pupilas. Os pacientes IV-33 (homem 46,XY) e IV-32 (mulher 46,XX) são irmãos e também apresentaram, na inspeção, opacidade das córneas, deformidades e irregularidades das íris e pupilas, além de estrabismo.

Os indivíduos afetados residentes no Rio Grande do Norte foram encaminhados para os ambulatórios de dermatologia e oftalmologia no Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte para realizar acompanhamento clínico. Os pacientes avaliados no ambulatório de oftalmologia também foram diagnosticados com colobomas de retina (exames não disponíveis).

As características clínicas, a avaliação molecular e citogenética e os dados laboratoriais dos pacientes estão descritos nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Características clínicas, avaliação molecular e citogenética dos pacientes portadores da variante c.305G>A

Paciente	Idade (anos)	Sexo social	Cariótipo	SRY	AG	AO	CA
1 (III-13)	65	M	NR	+	Não	Não	Não
2 (III-16)	62	M	46,XX	-	Sim	Não	Sim
3 (III-17)	61	M	NR	+	Não	Não	Não
4 (III-19)	58	M	46,XX	-	Sim	Não	Não
5 (III-48)	47	M	NR	-	Sim	Sim	Não
6 (IV-9)	33	M	46,XY	+	Não	Não	Não
7 (IV-10)	31	M	46,XY	+	Não	Não	Não
8 (IV-11)	28	M	46,XX	-	Sim	Sim	Não
9 (IV-32)	32	F	46,XX	-	Não	Sim	Não
10 (IV-33)	30	M	46,XY	+	Não	Sim	Não

M: masculino. F: feminino. + significa positivo. - significa negativo. AG: ambiguidade genital. AO: alterações oculares. CA: câncer de pele.

Tabela 11 - Dados laboratoriais dos pacientes portadores da variante c.305 G>A

Paciente	LH (U/L)	FSH (U/L)	TT (ng/dL)	TL (pmol/mL)	E2 (pg/mL)	InB (pg/mL)	AMH (ng/mL)
1 (III-13)	8,2	5,8	606	NR	40	91	1,8
2 (III-16)	24,3	41,5	142	NR	31	<10	<0,5
3 (III-17)	2,4	2,5	375	NR	37	89	3,3
4 (III-19)	21,7	36,9	421	467	47	<10	<0,5
5 (III-48)	24,3	56,3	280	NR	36	<10	<0,5
6 (IV-9)	2,8	2,5	641	NR	40	137	5,3
7 (IV-10)	2,5	2,1	455	392	27	133	7,6*
8 (IV-11)	9,9	27,1	235	256	30	<10	1,0*
9 (IV-32)	4	4,8	17	12	22	<10	1,5*
10 (IV-33)	3,7	3,8	427	NR	28	132	7,3

NR: não realizado. Valores de referência para o sexo masculino: LH 1,0-8,4; FSH 2,9-7,8; TT 271-965; TL 131-640; InB 80-300; E2 < 35; AMH 2,2-17,5. Valores de referência para o sexo feminino (fase folicular): LH 2,2-6,8; FSH 2,4-9,3; TT < 95; TL 2-45; InB 15-90 e E2 22-215; AMH 0,8-12,1. * kit do ensaio AMH Gen II (Beckman).

4.2 Estudo de segregação

A nova variante c.305G>A foi pesquisada em 67 indivíduos consanguíneos. Sete cônjuges geneticamente não relacionados à família também foram avaliados com o objetivo de realizarmos aconselhamento genético. A pesquisa da variante foi realizada por meio de amplificação gênica e sequenciamento automático, uma vez que os fragmentos gerados com digestão por enzima de restrição não discriminavam adequadamente indivíduos heterozigotos e homozigotos.

Na família, a nova variante alélica c.305G>A segregou em perfeita concordância com o fenótipo de hiperkeratose palmoplantar (HPP), com um padrão de herança autossômico recessivo, ou seja, todos os indivíduos com HPP eram homozigotos e, os pais dos afetados, heterozigotos. Nenhum indivíduo heterozigoto para a variante c.305G>A apresentou HPP (Figura 3).

Todos os familiares estudados foram informados, por meio de carta, sobre o resultado da avaliação genética, e os pacientes homozigotos e heterozigotos receberam aconselhamento genético.

4.3 Caracterização da nova variante alélica do gene *RSPO1*

A variante alélica NM_001038633.2:c.305G>A identificada na família brasileira não estava descrita em bancos de dados públicos de variantes frequentes (dbSNP, 1000 Genomes), e a pesquisa da variante em 150 indivíduos controles normais (300 alelos), brasileiros, por meio de amplificação gênica e sequenciamento automático, também foi negativa.

A variante c.305G>A, presente em homozigose nos indivíduos afetados, está localizada no sexto éxon do gene *RSPO1* e provoca a mudança do 102º aminoácido de cisteína para tirosina (Figura 5). A cisteína 102 é um resíduo altamente conservado entre várias espécies de vertebrados, responsável pela formação de uma ponte de dissulfeto no

segundo domínio tipo furina (FU2), região fundamental para a capacidade da proteína de ativar a via Wnt (Figura 6).

Figura 5 - Variante c.305G>A (p.Cys102Tyr). Modelo esquemático da estrutura gênica e proteica indicando a localização da variante na R-spondina-1 e eletroferograma do sequenciamento do caso índice

Avaliação in silico. A predição do efeito funcional para a variante c.305G>A (p.Cys102Tyr) foi efetuada por intermédio das ferramentas *Polyphen* (*Polymorphism Phenotyping*) e *Mutation Taster* (Adzhubei et al., 2010; Schwarz et al., 2010). A análise *in silico* da variante c.305G>A resultou em uma predição indicativa de efeito deletério sobre a função da proteína devido a mutação pontual *missense*. Entretanto, a análise *in silico* realizada pelo *Mutation Taster* também indicou a possibilidade de mudança de sítio de *splicing* (Schwarz et al., 2010).

De fato, uma terceira predição *in silico*, realizada por meio do programa computacional *Human Splicing Finder*, indicou que a variante c.305G>A localiza-se dentro de um sítio de *splicing* doador alternativo,

situado entre os sítios de *splicing* acceptor e doador selvagens do éxon 6 (Figura 7) (Desmet et al., 2009).

Figura 6 – Conservação do resíduo c.305. Painel superior: alinhamento da sequência parcial do gene *RSPO1* (GRCh37: Chr1:38,080,019-38,079,946) com destaque (moldura vermelha) do resíduo 305. Painel inferior: alinhamento dos aminoácidos do segundo domínio tipo furina (resíduos 91 a 135) da proteína R-spondina-1 (NP_001033722.1) com destaque (moldura azul) do resíduo 102

```

tctctctctcagAAATGCAAGATCGAGCACTGTGAGGCCTGCTTCAGCCAACTTCTGCACCAAGTGTAAAGGAGG
GCTTGTACCTGCACAAGGGCCGCTGCTATCCAGCTTGTCCGAGGGCTCCTCAGCTGCCAATGGCACCAT
GGAGTGC AGTAGTCCTGctaac

```

Figura 7 - Predição *in silico* para avaliação de mudança de *splicing*. Sequência do éxon 6 e suas regiões flanqueadoras (gene *RSPO1*, variante NM_001038633.2) com destaque para os sítios de *splicing* acceptor (sublinhado vermelho) e doador (sublinhado azul) selvagens. O sítio de *splicing* doador alternativo está em negrito com destaque (sublinhado) do resíduo 305

4.4 Avaliação das isoformas de *RSPO1*

As avaliações *in silico* da variante c.305G>A (p.Cys102Tyr) geraram predições sugerindo dois mecanismos distintos de mutação, através dos quais poderiam ocorrer: (a) uma mudança pontual na sequência da proteína ou (b) a tradução de uma proteína com alterações estruturais mais acentuadas (ausência do domínio FU2), no caso de mudança do sítio de *splicing*.

Para prosseguir com os estudos funcionais era necessário definir a sequência de nucleotídeos do inserto a ser subclonado no vetor de expressão *RSPO1*. Portanto, com o objetivo de testar a hipótese da mudança de sítio de *splicing*, avaliamos as isoformas de *RSPO1* presentes no tecido gonadal e na pele do caso índice e comparamos os resultados com tecidos controle.

Figura 8 - Isoformas de *RSPO1* e as respectivas proteínas. Modelo esquemático mostrando os oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação do cDNA: o *primer forward* F (Isof. 1 e 3), específico para as isoformas 1 e 3; o *primer forward* F (Isof. 2), específico para a isoforma 2 e um único *primer reverse* (R universal) para as 3 isoformas. Os tamanhos esperados dos produtos de amplificação eram, respectivamente, 792, 711 e 603 pares de bases para as isoformas 1, 2 e 3

Foram realizadas amplificações do cDNA para cada tecido em três condições diferentes: (A) na primeira reação (bandas identificadas com **U**) foram utilizados os 3 *primers*, com o objetivo de amplificar as 3 isoformas em um único tubo; (B) na segunda reação (bandas identificadas com **1 e 3**) foram utilizados os *primers* F (Isof. 1 e 3) e R (universal), com o objetivo de amplificar as isoformas 1 e 3 e (C) na terceira reação (bandas identificadas com **2**) foram utilizados os *primers* F (Isof. 2) e R (universal), com o objetivo de amplificar a isoforma 2 (Figura 8).

Para obtenção de massa suficiente para visualização das bandas foi necessária a realização de um segundo ciclo de amplificação com os

primeiros produtos de PCR (PCR de PCR). Após as amplificações, os produtos foram separados em gel de agarose. Nas bandas correspondentes às condições A e B, nas amostras de fibroblasto (do probando e do controle) e nas amostras de testículo do probando e de ovário do controle, foram observadas 2 bandas: a primeira, mais intensa, de aproximadamente 900-800 pb, e a segunda, mais fraca, de 600 pb (Figura 9).

A purificação e o sequenciamento da banda de 800 a 900 pb confirmaram que o produto da amplificação tratava-se da isoforma 1. Não foi possível isolar e purificar a banda de aproximadamente 600 pb mas, possivelmente, trata-se da isoforma 3.

Nas bandas correspondentes à condição C, nas amostras de fibroblasto, foi observada uma banda de aproximadamente 700 a 800 pb. A purificação e o sequenciamento desta banda de 700 a 800 pb confirmaram que o produto da amplificação tratava-se da isoforma 2.

Entretanto, na reação de amplificação que utiliza o *primer* específico para a isoforma 2, apenas no paciente, houve amplificação de um produto anômalo que gerava uma forte banda de aproximadamente 500 pb (no tecido fibroblasto) (Figura 9). O sequenciamento da banda de 500 pb, por sua vez, demonstrou que se tratava de uma amplificação inespecífica de parte da isoforma 3.

Figura 9 - Amplificação e separação em gel de agarose das isoformas de *RSPO1*. No painel superior estão representadas as reações de amplificação nos tecidos fibroblasto (indivíduo controle e o paciente IV-11), testículo (*pool* de testículos controle e o paciente IV-11) e ovário (*pool* de ovários controle). Por problemas técnicos, nesse experimento, não houve amplificação da isoforma 2 na maioria dos tubos e, no testículo controle, não ocorreu amplificação das isoformas 1, 2 e 3. As reações de amplificação foram então repetidas com cDNA de fibroblastos de ambos, indivíduo controle e paciente IV-11 (painel inferior). Nesse último experimento nota-se um produto anômalo que gera uma forte banda de aproximadamente 500 pb no paciente (seta). Os poços designados por U representam a condição onde foram utilizados os 3 *primers*, com o objetivo de amplificar as 3 isoformas em um único tubo

4.5 Dinâmica molecular

A análise das simulações de dinâmica molecular revelou que as distribuições de energia das moléculas R-spondina-1 selvagem (WT) e mutada (C102Y) foram significativamente alteradas de modo que as medianas aumentaram de -148.600 kJ/mol (Rspo1 WT) para -148.000 kJ/mol (Rspo1 mutada) (Figura 10). Ambas as distribuições falharam no teste de normalidade e a hipótese de igualdade das medianas de energia das moléculas WT e sua versão mutada foi rejeitada com um alto grau de confiança ($p \leq 2,2 \times 10^{-16}$).

Figura 10 - Histograma da distribuição das energias de ligação das moléculas R-spondina-1 selvagem (WT) e mutante (C102Y)

A análise das estruturas secundárias das R-spondina-1 selvagem e mutada, por sua vez, revelou que as folhas β antiparalelas $\beta_5\beta_6$ e $\beta_7\beta_8$ do domínio FU2 tornaram-se mais flexíveis na versão mutada da molécula. De fato, os resíduos adjacentes à mutação (posições 85 a 131) apresentaram distâncias quadráticas médias (RMSD, *root-mean-square distance*) notavelmente mais aumentadas em comparação àquelas da molécula selvagem (Figura 11). A mesma análise descrita acima foi realizada para a molécula de R-spondina-1 acoplada, ou seja, dentro do complexo LGR5-Rspo1-RNF43. Novamente, detectou-se um significativo aumento daquelas distâncias para vários resíduos da molécula mutada em relação aos seus correspondentes na molécula nativa. Observa-se na Figura 12 que tais resíduos encontram-se distribuídos ao longo de todo o domínio FU1-FU2 (resíduos 34 a 135).

Figura 11 - RMSD dos aminoácidos do domínio FU1-FU2 da R-spondina-1 isolada. A figura representa graficamente a diferença, em *fold change*, entre as distâncias quadráticas médias (RMSD) dos resíduos da molécula R-spondina-1 mutada em relação à molécula selvagem

Figura 12 - RMSD dos aminoácidos do domínio FU1-FU2 da R-spondina-1 no complexo. A figura representa graficamente a diferença, em *fold change*, entre as distâncias quadráticas médias (RMSD) dos resíduos da molécula R-spondina-1 mutada acoplada em relação ao RMSD dos resíduos correspondentes da molécula R-spondina-1 acoplada selvagem

A Figura 13 apresenta a sobreposição dos histogramas de distribuição das energias de ligação Rspo1-LGR das moléculas R-spondina-1 selvagem e mutada. A análise das simulações com Rspo1-LGR4 mostrou que a média de energia de ligação da molécula selvagem diminuiu de 3919 ± 262 kJ/mol para 3402 ± 195 kJ/mol ($p = 9,11 \times 10^{-9}$) sem afetar, contudo, a energia de ligação da R-spondina-1 à molécula RNF43.

Figura 13 - Histograma da distribuição das energias de ligação de Rspo-LGR com as moléculas de R-spondina-1 selvagem (WT) e mutante (C102Y)

A presença da variante Cys102Tyr altera a posição relativa dos centros de massa das moléculas R-spondina-1 e LGR5 (Figura 14). Essa distância aumentou de $13,4 \pm 0,9$ Å no complexo selvagem para $16,4 \pm 0,6$ Å no complexo mutado ($p = 2,2 \times 10^{-16}$). Curiosamente, as distâncias entre alguns resíduos críticos para interação Rspo-LGR diminuiu. A distância entre a Ala109 de LGR5 e a Phe110 de Rspo passou de $7,3 \pm 0,4$ Å para $5,0 \pm 0,3$ Å ($p < 2,2 \times 10^{-16}$). A distância entre a Phe106 e a Phe110, ambas de Rspo, diminuiu de $7,7 \pm 0,4$ Å para $6,5 \pm 0,3$ Å ($p < 2,2 \times 10^{-16}$). Por outro lado, a distância entre os resíduos Ala109 de LGR5 e Phe106 de Rspo permaneceu inalterada (Figura 15).

Figura 14 - Distâncias entre os centros de massa das moléculas Rspo-LGR. O histograma mostra que a distância aumentou de $13,4 \pm 0,9$ Å, no complexo selvagem (WT), para $16,4 \pm 0,6$ Å no complexo mutado (C102Y)

Figura 15 - Distâncias entre aminoácidos críticos nas moléculas Rspo-LGR. Os histogramas mostram, comparando-se os complexo Rspo-LGR selvagem (WT) com o complexo mutado (C102Y) que, na versão mutada da molécula ocorre: (A) diminuição na área entre os três resíduos, Phe106 e 100 de Rspo e Ala109 de LGR5 e (B) diminuição da distância entre os resíduos Phe106 e Phe110 de Rspo1. A distância entre os resíduos Ala109 de LGR5 e Phe106 de Rspo1, contudo, permanece inalterada

4.6 Estudo funcional

A realização de um experimento piloto demonstrou que a cotransfecção de 100 ng do vetor *reporter* TOPFLASH com concentrações crescentes (0-400ng) do vetor RSPO1 selvagem (WT) ou do RSPO1 mutante (Mut) não era capaz de ativar a via Wnt (Figura 16). Esse resultado está em concordância com dados previamente publicados por Tomaselli et al., que demonstraram em experimentos similares que a R-spondina-1, isoladamente, é uma fraca ativadora da via Wnt (Tomaselli et al., 2011). Entretanto, comparando-se as colunas WT (a esquerda) e Mut (a direita) no gráfico da Figura 16, observamos que havia uma tendência de menor transativação com a proteína mutante.

Tomaselli et al., no mesmo trabalho, demonstraram que a cotransfecção do vetor *reporter* TOPFLASH e da R-spondina-1 com CTNNB1 (β -catenina) aumentava significativamente e de maneira dose dependente o grau de ativação da via Wnt (Tomaselli et al., 2011). Portanto, com o objetivo de amplificar a ativação de Wnt e permitir a detecção de eventuais diferenças de função entre as proteínas R-spondina-1 WT e Mut, optamos por realizar estudos de cotransfecção com os plasmídios RSPO1 (WT ou Mut) e CTNNB1.

Primeiramente, para determinar a melhor concentração de CTNNB1 para o experimento de cotransfecção com RSPO1, realizamos experimentos pilotos de cotransfecção do vetor TOPFLASH, na dose fixa de 100 ng, com concentrações crescentes do plasmídio CTNNB1. Uma vez que precisávamos de um efeito sinérgico entre as proteínas R-spondina-1 e β -catenina sem, contudo, exaurir a maquinaria celular, selecionamos a concentração de 10 ng (Figura 17).

Figura 16 - Ausência de ativação da via Wnt por RSPO1. A cotransfecção do plasmídeo *reporter* TOPFLASH com concentrações crescentes de RSPO1 (WT e Mut) não provocou ativação da via Wnt. O gráfico de coluna representa a média $\pm$ DP de um experimento em triplicata. As leituras de luciferase foram normalizadas pela atividade de Renilla (ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,05$)

Figura 17 - Ativação da via Wnt por CTNNB1. A cotransfecção do plasmídeo *reporter* TOPFLASH com concentrações crescentes do plasmídeo CTNNB1 (0-100ng) foi capaz de promover uma ativação dose dependente da via Wnt. O gráfico de coluna representa a média $\pm$ DP de três experimentos independentes realizados cada qual em triplicata. As leituras de luciferase foram normalizadas pela atividade de Renilla (ANOVA, * $p < 0,001$)

Posteriormente, para finalizar o processo de padronização dos estudos funcionais e determinar a melhor concentração do plasmídio RSPO1 para o experimento de cotransfecção com CTNNB1, realizamos a cotransfecção de concentrações crescentes de plasmídio RSPO1 (0-400ng, WT ou Mut) com 10 ng de plasmídio CTNNB1 em um experimento piloto (Figura 18). Observamos uma tendência de efeito dose-reposta nas concentrações entre 25 e 200 ng e um indício de saturação de maquinaria, com menor transativação do *reporter* na concentração de 400 ng. Neste experimento houve uma transativação de TOPFLASH estatisticamente significativa com a transfecção de 200 ng de RSPO1 WT ($p < 0,01$). Além disto, o plasmídio RSPO1 Mut, na concentração de 200 ng, apresentou um grau de ativação da via significativamente menor que o plasmídio RSPO1 WT ($p < 0,05$).

Figura 18 - Cotransfecção de RSPO1 e CTNNB1 provoca ativação da via Wnt. A RSPO1 WT promoveu uma ativação significativamente maior da via Wnt em comparação RSPO1 Mut na concentração de 200 ng. O gráfico de coluna representa a média $\pm$ DP de um experimento em triplicata. As leituras de luciferase foram normalizadas pela atividade de Renilla (ANOVA, * $p < 0,001$; ** $p < 0,05$)

Por último, com base no experimento piloto descrito, selecionamos 3 concentrações de plasmídeo RSPO1 (0, 50 e 100 ng) e realizamos os estudos de cotransfecção definitivos (quatro experimentos independentes em triplicata) com 10 ng de plasmídeo CTNNB1. De fato, confirmamos que o plasmídeo RSPO1 WT apresenta maior capacidade de ativação da via Wnt em comparação ao plasmídeo RSPO1 Mut. Enquanto, nas concentrações testadas (50 e 100ng), o plasmídeo Mut não foi capaz de transativar o *reporter* TOPFLASH, o plasmídeo RSPO1 WT promoveu um aumento de 1,5 vez na leitura de luciferase ($p < 0,001$). Entretanto, nas duas concentrações testadas (50 e 100 ng), não observamos efeito dose-resposta (Figura19).

Figura 19 - A R-spondina-1 mutada tem menor capacidade de ativação da via Wnt. A cotransfecção do plasmídeo RSPO1 (WT e Mut) com 10 ng do plasmídeo CTNNB1 mostrou que o plasmídeo RSPO1 WT tem maior capacidade de ativação da via Wnt. O gráfico de coluna representa a média $\pm$ DP de quatro experimentos independentes realizados cada qual em triplicata. As leituras de luciferase foram normalizadas pela atividade de Renilla (ANOVA, $*p < 0,001$)

4.7 Avaliação de expressão gênica

Os experimentos foram realizados em duplicata (para os genes *CTNNB1* e *RSPO1* no fibroblasto e para o gene *RSPO1* no tecido gonadal) ou triplicata (para os genes *WNT4*, *FOXL2*, *CTNNB1*, *FGF9* e *SOX9* no tecido gonadal) e as médias $\pm$ DP foram representadas em gráficos de barras. Para uma melhor representação gráfica dos resultados, os dados da expressão gênica estão descritos da seguinte:

$$\text{média } 2^{-\Delta\Delta CT} (\log 2) \pm \text{DP}.$$

No fibroblasto não houve diferença de expressão dos genes *RSPO1* e *CTNNB1* em relação à amostra calibradora (fibroblasto de indivíduo normal) (Figura 20). A expressão dos genes *CTNNB1* e *WNT4*, no tecido testicular do paciente, também não diferiu da expressão no tecido calibrador (*pool* de testículos) (Figura 21).

Figura 20 - Expressão relativa dos genes *CTNNB1* e *RSPO1* em fibroblastos

Figura 21 - Expressão relativa dos genes *CTNNB1*, *RSPO1*, *WNT4*, *FOXL2*, *FGF9* e *SOX9* no tecido gonadal

Entretanto, no tecido testicular do paciente, houve hipoexpressão dos genes *RSPO1*, *FOXL2* e *FGF9* e detectou-se um aumento de expressão de *SOX9* em relação à amostra calibradora (*pool* de testículos).

4.8 Avaliação de expressão proteica

Em primeiro lugar, foram analisadas as lâminas dos controles positivos para determinar o padrão de imunomarcacão (nuclear, citoplasmática ou membranosa) para os 6 anticorpos estudados. Observamos nas reações destes tecidos os seguintes resultados: (a) RSPO1, tecido controle ovário, imunomarcacão predominantemente citoplasmática (células foliculares e algumas células estromais) e marcacão nuclear em algumas células; (b) WNT4, tecido controle rim, imunomarcacão predominantemente citoplasmática (células tubulares e vasos sanguíneos); (c) FOXL2, tecido controle ovário, imunomarcacão citoplasmática e nuclear (células da granulosa e imunomarcacão inespecífica em células estromais); (d) CTNNB1, tecido controle rim, imunomarcacão em membrana; (d) SOX9, tecido controle amígdala, imunomarcacão nuclear e (d) FGF9, tecido controle tumor renal, imunomarcacão predominantemente citoplasmática.

Posteriormente foram avaliados o padrão de imunomarcacão nas gônadas masculina e feminina de indivíduos sem DDS. Nas amostras de testículo (amostras A e B) não houve imunomarcacão para WNT4 e FOXL2; observamos imunomarcacão nuclear para RSPO1 e SOX9 nos túbulos seminíferos e, no caso do FGF9, positividade em citoplasma apenas na amostra A. No tecido ovariano não houve imunomarcacão para SOX9 e FGF9 nos folículos e estroma, mas detectou-se imunorreatividade nuclear para SOX9 em vasos sanguíneos. Observamos imunomarcacão citoplasmática e nuclear nas células foliculares e no estroma para RSPO1 e FOXL2, marcacão focal citoplasmática para WNT4 em folículos e fraca imunorreatividade em membrana e citoplasma para CTNNB1 (Figura 22).

Utilizado-se um *score* semiquantitativo, de acordo com a intensidade da imunorreatividade (fraca ou forte) e com a porcentagem de células que apresentaram imunomarcacão, foram avaliados em paralelo a amostra do caso índice e as amostras de testículo A e B. Nesta avaliação subjetiva foram observados, para o SOX9: (a) imunorreatividade (nuclear) forte no

tecido testicular do paciente com a mutação no gene *RSPO1* versus imunorreatividade fraca nos testículos controle; (b) imunorreatividade em 90 a 100% das células dos túbulos seminíferos no tecido testicular do paciente com a mutação versus imunorreatividade em 60 a 80% das células nos testículos controle. Curiosamente a imunomarcção para FGF9 foi negativa no tecido testicular do paciente e no tecido de um dos controles. Entretanto, foi detectada uma imunomarcção citoplasmática fraca em 20 a 30% das células dos túbulos seminíferos em um dos testículos controle (amostra A). Os testículos do paciente e a amostra controle A apresentaram imunorreatividade para CTNNB1 (β -catenina) em membrana em 90 a 100% das células dos túbulos seminíferos. O tecido testicular do paciente controle mais velho (amostra B), por sua vez, exibiu imunorreatividade para CTNNB1 em membrana de fraca intensidade em 20 a 30% das células dos túbulos seminíferos. Além disso, foi observada, no testículo do paciente e nos controles normais, marcação citoplasmática focal para β -catenina. Em relação aos demais anticorpos, não houve imunomarcção para *RSPO1*, *WNT4* e *FOXL2* no tecido testicular do caso índice (Figura 22).

Figura 22 a – Imuno-histoquímica para RSPO1, WNT4 e FOXL2. Imagens das reações para os anticorpos RSPO1 (moldura marrom), WNT4 (moldura vermelha) e FOXL2 (moldura laranja) nas respectivas amostras: testículo do paciente portador de DDS 46,XX Testicular; testículos controle (testículo A e B); ovário controle. Reações dos controles positivos: tecido ovariano para RSPO1 e FOXL2 e tecido renal para WNT4. Não houve marcação para RSPO1, WNT4 e FOXL2 no testículo do probando. No ovário observamos marcação (marrom) predominantemente citoplasmática para RSPO1, WNT4 e FOXL2. Nos testículos controle (amostras A e B) não houve marcação para WNT4 e FOXL2. Observamos, em raras células, marcação nuclear para RSPO1 nos testículos controle (túbulos seminíferos) e no ovário. Magnificação: 20X. Contracoloração: HE

Figura 22 b - Imuno-histoquímica para CTNNB1, SOX9 e FGF9. Imagens das reações para CTNNB1 (moldura amarela), SOX9 (moldura verde claro) e FGF9 (moldura verde escuro). Reações dos controles positivos: tecido renal para CTNNB1, amígdala para SOX9 e tumor renal para FGF9. Observamos, nas amostras controle e nos testículos, marcação (marrom) predominantemente membranosa para CTNNB1, nuclear para SOX9 e citoplasmática para FGF9. No ovário observa-se fraca marcação para CTNNB1 e marcação em vasos sanguíneos para SOX9. Observamos imunorreatividade nuclear para SOX9 em todas as amostras de testículo. Entretanto, no probando, em contraste com os testículos controle, detectamos uma imunomarcação de forte intensidade para SOX9. Magnificação: 20X. Contracoloração: HE

4.9 Pesquisa de genes modificadores de fenótipo

A paciente IV-32 é a única, dentre os pacientes 46,XX portadores da variante c.305G>A em homozigose, que não sofreu reversão sexual. Teoricamente, alterações gênicas que promovessem diminuição de expressão de *SOX9* ou aumento de expressão dos genes *WNT4* ou *FOXL2* poderiam contrabalancear a mutação no gene *RSPO1* e impedir a reversão sexual. No entanto, a avaliação do número de cópias dos genes *WNT4* e *SOX9* e da região cis-regulatória do gene *SOX9*, através da técnica de MLPA, não evidenciou perdas ou ganhos nestes segmentos cromossômicos.

Posteriormente, com o objetivo de detectar alterações no número de cópias do *locus* do *FOXL2* e, simultaneamente, avaliar outras regiões do genoma, ampliamos a investigação da paciente IV-32 através da técnica de *array*-CGH. Contudo, não foram detectados translocações, perdas ou ganhos de segmentos cromossômicos através da plataforma utilizada.

Finalmente, com o objetivo de pesquisar variantes em regiões codificadoras de genes desconhecidos que pudessem estar associadas à variabilidade do fenótipo sexual, foi realizado o estudo do exoma da família por meio de técnicas de sequenciamento gênico de alto débito.

Após a filtragem das variantes, identificamos um polimorfismo em um dos receptores da R-spondina-1, LGR5 rs17109924, o qual estava presente em homozigose na mulher afetada (IV-32) e no seu irmão 46,XY afetado (IV-33) e ausente nos demais pacientes 46,XX afetados (III-16, III-19, III-48, IV-11). Além disto, o polimorfismo rs17109924 estava presente em heterozigose nos pais (III-24 e III-40) da paciente IV-32. Os demais indivíduos *SRY* positivos afetados (III-13, III-17, IV-9, IV-10) e as duas mulheres não afetadas analisadas não apresentaram o polimorfismo rs17109924, ou seja, eram homozigotos para o alelo selvagem.

4.9.1 Caracterização da variante rs17109924

O polimorfismo rs17109924 é uma variante do LGR5 muito frequente, com MAF (*minor allele frequency*) de aproximadamente 7% (Fonte: 1000 Genomes). O receptor LGR5 (*leucine-rich repeat-containing GPCR*), por sua vez, é uma proteína transmembrana (7TM) dividida em três domínios: (1) região extracelular (EC), composta de três alças (ECL1-ECL3) na extremidade N-terminal; (2) região transmembrana (TM), composta de sete α -hélices (TM1-TM7); e (3) região intracelular (IC), composta de três alças intracelulares (ICL1-ICL3) e uma hélice anfipática intracelular na extremidade C-terminal (Venkatakrishnan et al., 2013). O rs17109924 é uma variante não sinônima que provoca a substituição do resíduo valina 666, um aminoácido (aa) apolar, localizado na segunda alça intracelular (ICL2) no domínio 7TM, por uma alanina, outro aa apolar. A avaliação *in silico* do efeito funcional da variante c.1997T>C (p.Val666Ala), realizada por intermédio de três ferramentas diferentes (*Polyphen*, *SIFT* e *Mutation Taster*), resulta em uma predição benigna (Adzhubei et al., 2013; Ng; Henikoff, 2003; Schwarz et al., 2010) (Tabela 12).

Tabela 12 – Caracterização da variante rs17109924

Gene	MIM	Locus	Transcrito	Exon	Base	AA
<i>LGR5</i>	606667	12q22q23	NM_003667.3	18	c.1997T>C	p.Val666Ala

4.9.2 Revisão da literatura: estudos clínicos de associação da variante rs17109924 com câncer

O LGR5 é um marcador de células-tronco epiteliais, incluindo células-tronco cancerígenas (CTC) e, ao longo dos últimos anos, tem sido extensivamente estudado devido ao seu papel na patogênese do câncer (Nakata et al., 2014). Gerger et al., em 2011, avaliando um painel de genes associados a CTC, identificaram uma associação entre o alelo menos frequente do SNP LGR5 rs17109924 T>C e um maior tempo para recorrência do tumor (TRT) em pacientes portadores de câncer de cólon (estádio II de alto risco ou estágio III) (Gerger et al., 2011). Kleist et al., avaliando um painel de 23 SNP do gene *LGR5*, incluindo o rs17109924, também detectaram uma correlação entre genótipos específicos e melhor prognóstico (maior TRT) em pacientes com tumores colorretais (Kleist et al., 2012). Finalmente, Szkandera et al., em 2015, avaliando prospectivamente uma grande coorte (n=599) de pacientes portadores de tumores de cólon (estádio II de alto risco ou estágio III), em tratamento quimioterápico adjuvante com 5-fluorouracila, comprovaram que o alelo C do polimorfismo rs17109924 está associado a um menor TRT, funcionando como um biomarcador genético de melhor prognóstico neste grupo de pacientes (Szkandera et al., 2015).

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

Mutações no gene *RSPO1* causam uma raríssima síndrome genética de herança autossômica recessiva associada a distúrbios do desenvolvimento sexual e a alterações dermatológicas e oftalmológicas. Desde as descrições de Parma et al. e Tomaselli et al., em 2005 e 2008, respectivamente, não havia nenhum outro relato de mutação no gene *RSPO1* em humanos. No presente estudo descrevemos a segunda família portadora desta síndrome, na qual identificamos uma nova variante alélica no gene *RSPO1*.

Nessa genealogia, foram realizadas a caracterização clínica e a avaliação do perfil hormonal gonadal dos 10 indivíduos afetados. Posteriormente, foram comparados os fenótipos dos nossos pacientes com aquele apresentado pelos pacientes previamente descritos na literatura.

Para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na reversão sexual gonadal foram realizados, nos testículos do probando, a análise de expressão e estudos de imuno-histoquímica de genes críticos envolvidos nos processos de determinação e diferenciação gonadal de ambas as vias, masculina e feminina.

Além disso, para fornecer evidências experimentais sobre a patogenicidade da variante c.305G>A (p.Cys102Tyr) foram realizados experimentos de transfecção transitória *in vitro* utilizando-se um plasmídio *reporter* da via Wnt. Complementamos esta investigação realizando simulações de dinâmica molecular para examinar se a mutação p.Cys102Tyr perturba a estrutura molecular da R-spondina-1.

Por último, para explicar a variabilidade do fenótipo de reversão sexual, procuramos por genes modificadores de fenótipo por meio de análise do exoma da família por sequenciamento de alto débito.

5.1 Caracterização clínica da síndrome

A família brasileira tem 11 indivíduos afetados, dos quais 10 são vivos e procedentes de quatro casamentos distintos (três deles comprovadamente consanguíneos). O denominador comum entre todos os portadores da nova variante é o fenótipo de hiperkeratose palmoplantar, desenvolvido a partir da infância. Apenas os indivíduos mais velhos (III-13; III-16; III-17 e III-19) apresentam esclerodactilia e alterações ungueais, sugerindo que estas alterações ocorram de forma secundária, uma vez que a gravidade da HPP aumenta com a progressão da idade.

A família italiana descrita por Radi et al., por sua vez, tem 6 indivíduos afetados, originados de 2 casamentos consanguíneos distintos. O denominador comum entre todos os portadores da mutação também é o fenótipo dermatológico (esclerodactilia, hipoplasia ungueal e hiperkeratose palmoplantar), presente desde o primeiro mês de vida (Radi et al., 2005). Os casos esporádicos de DDS 46,XX Testicular e DDS Ovotesticular também apresentavam hiperkeratose palmoplantar e alterações ungueais (Radi et al., 2005; Tomaselli et al., 2008).

Na família brasileira, dois indivíduos (III-16 e III-43) tiveram câncer de pele. O desenvolvimento de carcinoma de células escamosas (CCE) ocorreu em três pacientes da família italiana e no caso esporádico de DDS 46,XX Testicular (Parma et al., 2006; Vernole et al., 2000; Micali et al., 2005; Radi et al., 2005). Na família italiana, o caso índice desenvolveu um tumor de laringe diagnosticado aos 41 anos de idade e, 5 anos após, um CCE em um dedo da mão. Dois irmãos do caso índice também desenvolveram CCE sobre as lesões hiperkeratóticas das mãos e/ou dos pés. Nessa mesma família, dois indivíduos faleceram em decorrência de metástases pulmonares (Micali et al., 2005).

O caso isolado de DDS Ovotesticular apresentava fenótipo feminino e genitália externa com clitoromegalia. Teve puberdade espontânea com ciclos menstruais regulares e, aos 27 anos, foi submetida a gonadectomia

em razão de uma massa inguinal, com o achado incidental no estudo anatomopatológico de ovotestis associado a um seminoma clássico (Tomaselli et al., 2008).

A ocorrência dos tumores do tipo células escamosas (em laringe e em pele) e do tumor de células germinativas (no caso esporádico de DDS Ovotesticular) confirma que a síndrome genética está associada com maior risco de desenvolvimento de tumores de células epiteliais, sendo altamente recomendável que pacientes com mutação no gene *RSPO1* realizem, periodicamente, rastreamento por meio de avaliações clínicas com dermatologista, endoscopia digestiva alta e exames ultrassonográficos para avaliação das gônadas.

O probando (IV-11) da família brasileira teve diagnóstico de coloboma de íris e retina e 3 familiares (indivíduo III-48 e os 2 primos, IV-32 e IV-33) apresentavam, ao exame clínico, estrabismo, opacidade das córneas, deformidades e irregularidades das íris e pupilas. O caso esporádico de DDS 46,XX Testicular apresentava catarata precoce bilateral e coloboma de retina e, a paciente portadora de DDS Ovotesticular, opacidades corneanas bilaterais e estrabismo (Vernole et al., 2000; Tomaselli et al., 2008). A síndrome está, portanto, associada com um maior risco de desenvolvimento de catarata e colobomas. Uma vez que colobomas foram diagnosticados em pacientes brasileiros que não apresentavam nenhuma queixa oftalmológica ou alterações morfológicas importantes da íris e pupilas, consideramos altamente recomendável que pacientes com mutação no gene *RSPO1* realizem, periodicamente, avaliações oftalmológicas.

Na família brasileira, dois indivíduos afetados com cariótipo 46,XY são férteis e apresentaram avaliação laboratorial com perfil hormonal normal. Na família brasileira, no entanto, um dos afetados 46,XX têm um fenótipo feminino normal (paciente IV-32), divergindo dos demais casos com cariótipo 46,XX já descritos na literatura, os quais apresentam reversão sexual XX completa (DDS 46,XX Testicular) ou parcial (DDS Ovotesticular).

Na família italiana, todos os indivíduos afetados (46,XX e 46,XY) têm fenótipo masculino; 4 deles foram examinados: 3 pacientes tinham ambiguidade genital (hipospádia, hipoplasia testicular e “hipogenitalismo”) e 2 destes apresentavam ginecomastia. A avaliação citogenética e molecular confirmou que 4 indivíduos (incluindo os 3 pacientes com ambiguidade genital) tinham cariótipo 46,XX e pesquisa de *SRY* negativa. O caso índice foi submetido a uma biópsia gonadal com o achado de tecido testicular com hiperplasia nodular de células de Leydig. A avaliação laboratorial e ultrassonográfica do probando também revelou baixas concentrações plasmáticas de T (155 ng/dL; VR 350-750 ng/dL) e altas concentrações de FSH (33,2 mIU/mL; VR 5-25 mIU/mL); cisto epididimal e ausência de derivados müllerianos. Entre os pacientes afetados, 3 indivíduos 46,XX e um indivíduo 46,XY eram casados; os 3 primeiros não tiveram filhos e o último tinha dois filhos saudáveis (Micali et al., 2005; Radi et al., 2005; Parma et al., 2006).

O achado de indivíduos 46,XY portadores de mutações em homozigose no gene *RSPO1* com perfil hormonal normal e férteis corrobora os achados dos estudos com modelos animais *knockout* para *Rspo1*, que demonstraram que a *Rspo1* não é necessária para a diferenciação testicular. O caso da paciente IV-32 chama a atenção para a possibilidade de ocorrência de mutação no gene *RSPO1* na ausência de reversão sexual XX. Além disso, uma vez que a hiperqueratose palmoplantar está presente em todos os pacientes com mutação no gene *RSPO1*, na ausência do fenótipo dermatológico, mutações no gene *RSPO1* tornam-se uma causa muito improvável de DDS 46XX Testicular ou Ovotesticular *SRY* negativo.

5.2 Avaliação do perfil hormonal e dos estudos de expressão

O perfil hormonal dos pacientes brasileiros portadores da nova variante da R-spondina-1 incluiu as dosagens dos hormônios inibina B (InB)

e anti-Mülleriano (AMH), os quais não haviam sido avaliados nos demais portadores de mutação na *RSPO1* descritos na literatura.

As inibinas (A e B) são hormônios glicoproteicos gonadais que foram identificados devido à sua habilidade de regular negativamente a secreção de FSH. No sexo masculino a InB é a única inibina detectável, sendo produzida nos testículos fetal e adulto predominantemente pelas células de Sertoli. Na infância, a secreção de InB é governada pelas células de Sertoli em proliferação e pelo FSH. Na vida adulta, no entanto, as células germinativas são os principais determinantes da produção de InB. No homem adulto, as concentrações séricas de InB correlacionam-se com o *status* funcional das células germinativas, sendo indetectável em indivíduos com ausência de atividade espermatogênica (Meachem et al., 2001; Anawalt et al., 2006).

O cromossomo Y possui vários genes na região AZF que são essenciais para espermatogênese. Consequentemente, indivíduos portadores de DDS 46,XX Testicular, apesar da presença de gônadas com diferenciação testicular, apresentam aplasia de células germinativas. A avaliação hormonal do probando (IV-11), portador de DDS 46,XX Testicular, e dos demais indivíduos com fenótipo masculino e ambiguidade genital (III-16; III-19 e III-48), que presumidamente também são portadores de DDS 46,XX Testicular, foi congruente com o quadro de aplasia de células germinativas, apresentando níveis indetectáveis de InB.

No sexo feminino, as inibinas A e B apresentam um padrão de secreção diferente ao longo do ciclo menstrual. No ovário, durante a fase folicular, o aumento da secreção da InB correlaciona-se com o processo de crescimento dos folículos (Luisi et al., 2005). Nessa família, a mulher afetada também apresentou níveis indetectáveis de InB. Esses achados sugerem que a produção de InB possa sofrer regulação pela *RSPO1* na gônada feminina humana. Além disso, a detecção de concentrações normais de FSH e a ocorrência de ciclos menstruais regulares indicam que a Inibina A é capaz de suprir as funções da InB.

O AMH, por sua vez, é um marcador de função das células de Sertoli. Durante a embriogênese, a partir da oitava semana de gestação, é produzido pelas células de Sertoli e, nesta fase, promove a regressão dos ductos de Müller. No sexo masculino, as concentrações do AMH permanecem altas desde a vida fetal até a puberdade, quando o aumento da produção dos andrógenos pelas células de Leydig inibe a sua secreção, fazendo que seus níveis diminuam até valores residuais, os quais permanecem relativamente estáveis durante toda a vida adulta (Rey, 2005; Aksglaede et al., 2010).

A dosagem do AMH nos indivíduos com fenótipo masculino e ambiguidade genital (casos III-16; III-19 e III-48), cujas idades na época da avaliação laboratorial variaram de 47 a 62 anos, também revelou níveis indetectáveis deste hormônio. O probando, por sua vez, tinha 28 anos na época da avaliação e apresentou concentrações de AMH mensuráveis mas abaixo dos valores de referência para o sexo masculino. No entanto, apesar destes achados, podemos afirmar que ambos, o probando da família brasileira e o caso índice da família italiana, produziram AMH em níveis adequados na vida intrauterina, uma vez que não foram detectados derivados müllerianos na avaliação da genitália interna. Estes dados sugerem que, nos indivíduos portadores de DDS 46,XX Testicular, ocorre uma disfunção progressiva das células de Sertoli ao longo da vida adulta.

Na verdade, o perfil hormonal das gonadotrofinas dos pacientes portadores de DDS 46,XX Testicular da família brasileira indica que tanto o compartimento das células somáticas (Sertoli) quanto o compartimento das células esteroidogênicas (Leydig) são disfuncionais, uma vez que ambos, FSH e LH, encontram-se elevados. Além disto, a ocorrência de ambiguidade genital é um indício de produção insuficiente de andrógenos pelas células de Leydig durante o desenvolvimento embrionário.

O desenvolvimento embrionário normal de uma gônada XY depende do recrutamento, proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares. Do ponto de vista celular, a diferenciação dos precursores das células de Sertoli

é o evento mais importante, a partir do qual se desencadeia uma cascata de alterações morfológicas que culminam na formação do testículo. O processo de diferenciação das células de Leydig, a partir das células esteroidogênicas, ocorre após a diferenciação das células de suporte e é influenciado pelas células de Sertoli (Svingen; Koopman, 2013).

Do ponto de vista molecular, é a partir da expressão do gene *Sox9* que as células de suporte proliferam e diferenciam-se em células pré-Sertoli. A regulação transcricional do *Sox9* apresenta três fases, controladas por mecanismos moleculares distintos: (a) fase inicial, independente de *Sry*; (b) fase de superexpressão, dependente de *Sry*; e (c) fase de manutenção, na ausência do *Sry*. Em primeiro lugar, a ligação do *Sf1* à região cis-regulatória do *Sox9*, denominada TESCO (*testis enhancer sequence core element*), desencadeia a expressão do *Sox9* em baixos níveis na crista genital de ambos os sexos. Entre os 11,5 e 12,5 dpc o *Sry*, atuando na região regulatória TESCO, em sinergismo com o *Sf1*, promove um pico de expressão do *Sox9*. Posteriormente, após o 12,5 dpc, quando cessa a expressão do *Sry*, altos níveis de expressão de *Sox9* são mantidos à custa de mecanismos de autorregulação e das vias de sinalização da *Pgd2* (*prostaglandin D2 synthase*) e do *Fgf9*. A ativação do gene *Pgd2* (*prostaglandin D2 synthase*) pelo *Sox9* aumenta o transporte da proteína *Sox9* para o núcleo e funciona como um mecanismo autócrino e parácrino de reforço de expressão (Sekido et al., 2009).

O *Sry* atua em uma estreita janela para promover a proliferação das células de suporte e induzir a diferenciação destas para o estado de células pré-Sertoli. No contexto do DDS 46,XX Testicular, durante o desenvolvimento embrionário do testículo XX, na ausência do gene *Sry*, possivelmente ocorrerá uma menor taxa de proliferação das células precursoras de Sertoli. Além disto, poderá ocorrer um atraso no processo de diferenciação das células de suporte, uma vez que o pico de expressão do gene *Sox9* ocorrerá fora da janela de tempo habitual. Alterações no processo de diferenciação das células de Sertoli levariam a alterações no

processo de diferenciação das células de Leydig e, posteriormente, na vida adulta, à disfunção testicular em ambos os compartimentos celulares.

O estudo do padrão de expressão gênica e proteica na gônada do paciente portador de DDS 46,XX Testicular com mutação no gene *RSPO1* trouxe informações interessantes que nos possibilitaram formular algumas hipóteses a respeito dos mecanismos da reversão sexual. Estudos com modelos animais já demonstraram que, durante o desenvolvimento da gônada XX, é necessário haver um antagonismo da via Sox9/Fgf9 pela via *RSPO1*/β-catenina/WNT4 para impedir o desenvolvimento de tecido testicular. A R-spondina-1 regula a expressão de Wnt4 e atua como uma amplificadora tecido e tempo específica da β-catenina. O *Wnt4*, por sua vez, opera regulando negativamente a ação de *Fgf9* (Kim et al., 2006b). Por outro lado, a β-catenina antagoniza o Sox9, agindo por meio de dois mecanismos distintos. Primeiro, a β-catenina interfere na ligação do *Sf1* a região regulatória TES (*testis-specific enhancer of SOX9*), diminuindo assim a expressão de Sox9 (Bernard et al., 2012). Segundo, a β-catenina interage fisicamente com a proteína Sox9, o que resulta na degradação de ambas as proteínas (Akiyama et al., 2004).

Kojima et al., em 2008, avaliando as gônadas de 5 pacientes portadores de DDS 46,XX Testicular, detectou maiores níveis de expressão do gene *SOX9* em relação a testículos controle (Kojima et al., 2008). Portanto, com base nos estudos descritos, propusemos que a mutação no gene *RSPO1* em humanos causa uma redução na estabilidade da β-catenina que, por sua vez, gera um aumento de expressão de *SOX9* na gônada, promovendo reversão sexual nos indivíduos XX. De fato, detectamos um aumento da expressão relativa do gene *SOX9* nos testículos do paciente 46,XX Testicular. Em concordância com este achado, a imunorreatividade para Sox9 foi maior no testículo do probando em comparação a duas amostras de testículos controle.

A β-catenina é uma proteína ubíqua que desempenha funções em vários processos celulares (adesão, crescimento e diferenciação), em

diversos tecidos, podendo ser imunolocalizada em citoplasma, membrana ou núcleo. Teoricamente, uma vez que a mutação no gene *RSPO1* provoca menor estabilização da β -catenina, o padrão esperado seria menor imunorreatividade citoplasmática e nuclear da proteína sem haver, contudo, alteração nos níveis de expressão do gene *CTNNB1*. Em relação ao padrão e à intensidade da imunorreatividade, comparando-se o testículo do paciente 46,XX Testicular com a amostra do paciente controle de idade pareada (amostra A), não foram detectadas diferenças: observou-se, em ambas as amostras, forte imunomarcção em membrana e marcação focal em citoplasma. Como esperado, a expressão gênica da β -catenina em ambos os tipos de tecidos analisados (testículo e cultura de fibroblastos) não diferiu do grau de expressão das amostras calibradoras analisadas (*pool* de testículos e cultura de fibroblasto de paciente normal). Todavia, estamos analisando uma gônada diferenciada adulta e não podemos excluir a hipótese de que a mutação na *RSPO1* causou maior degradação da β -catenina com consequente menor ativação da via *Wnt* no momento da determinação sexual durante a embriogênese gonadal.

Em relação ao *WNT4*, o grau de expressão no testículo do paciente não diferiu da amostra calibradora e, na avaliação do estudo de imunohistoquímica, não se detectou imunomarcção para *Wnt4*. Nossos resultados estão em concordância com os achados de Kojima et al., que não detectaram diferenças no grau de expressão do gene *WNT4* comparando testículos de pacientes portadores de DDS 46,XX Testicular *SRY* negativos com testículos controle (Kojima et al., 2008).

A avaliação da *RSPO1* e *FOXL2*, por sua vez, revelou um conjunto interessante de resultados. Não esperávamos, por exemplo, encontrar diferenças nos padrões de expressão gênica e proteica da *RSPO1*. Conforme previsto, os níveis de expressão da *RSPO1* no fibroblasto do paciente não diferiram do controle. Entretanto, detectamos uma hipoexpressão de *RSPO1* no testículo do paciente e, congruente com este achado, não houve imunomarcção para R-spondina-1 na gônada. Também observamos hipoexpressão e ausência de imunomarcção para *FOXL2* na

gônada do probando. Por último, detectamos no ovário controle (células foliculares) e nos testículos controle (túbulos seminíferos), imunomarcagem nuclear para *RSPO1* em algumas células.

Nos últimos anos, estudos com modelos animais levaram à identificação de uma alça de regulação entre os genes *Sox9* e *FoxL2*. A ablação condicional do gene *FoxL2*, nos ovários de camundongos adultos, promove aumento de expressão de *Sox9* e reprogramação das células da granulosa em células de Sertoli (Uhlenhaut et al., 2009). De maneira oposta, hipoexpressão de *Sox9* nos testículos causa aumento de expressão de *FoxL2* e promove transdiferenciação das células de Sertoli (Georg et al., 2012). Nossos resultados (aumento de expressão de *SOX9* associado a hipoexpressão de *FOXL2*) sugerem que a mesma alça de regulação *Sox9*-*FoxL2* deva operar em gônadas humanas. De maneira análoga, o achado de aumento de expressão de *SOX9* associado com hipoexpressão de *RSPO1* sugere a existência de um antagonismo direto de *Sox9* versus *Rspo1*.

Os mecanismos moleculares por meio dos quais a R-spondina-1 modula/ativa a via Wnt/ β -catenina começaram a ser desvendados apenas recentemente. Embora a molécula possua uma sequência de localização nuclear, os modelos atuais postulam que a proteína atua apenas em membrana, funcionando como uma ponte para formação de um complexo proteico (LGR-*Rspo1*-RNF43/ZNRF3) que, em última análise, impede a degradação dos receptores da via Wnt, LRP6 e Fzd (Chassot et al., 2014).

Entretanto, ainda não há confirmação de que, *in vivo*, a *Rspo1* regule o processo de desenvolvimento sexual por meio dos mecanismos moleculares descritos. Tomaselli et al., por meio de estudos de transfecção transitória *in vitro*, demonstraram que a ativação da via Wnt induzida por R-spondina-1 não pode ser completamente abolida utilizando-se DKK1 (*Dickkopf-1*), um antagonista do receptor LRP6. Com base nestes achados, Tomaselli et al. sugerem que a transativação residual do *reporter* TCF decorra de um mecanismo de ação para ativação de Wnt alternativo, independente do receptor LRP6. Nesse trabalho, também identificou-se uma

forte imunomarcção nuclear e nucleolar para R-spondina-1 nas culturas celulares (Tomaselli et al., 2011). No presente estudo também observamos imunomarcção nuclear para R-spondina-1. Portanto, é possível que a R-spondina-1 possua mecanismos de ação alternativos associados com o transporte da molécula para o núcleo.

Por fim, em relação ao *FGF9*, identificamos uma hipoexpressão relativa do gene e ausência de imunomarcção para proteína na gônada do paciente portador de DDS 46,XX Testicular.

O gene *Fgf9* apresenta um padrão de expressão sexo específico durante o desenvolvimento da gônada do camundongo: inicialmente é expresso em ambos os sexos e, após a expressão do gene *Sry*, torna-se restrito aos cordões testiculares da gônada XY. Kim et al., em 2006, realizaram uma série de elegantes estudos com modelos animais *knockout* e culturas de gônadas. A partir dos resultados deste trabalho foi proposto o consagrado modelo de interação genética em alça de retroalimentação positiva para *Sry-Sox9-Fgf9*, sendo também descrita a existência do efeito antagônico recíproco entre os genes *Fgf9* e *Wnt4* (Kim et al., 2006b). Entretanto, trabalhos mais recentes sugerem que os genes *Sox9* e *Fgf9* apresentam mecanismos de interação mais complexos, os quais envolvem o *Wnt4*. O principal papel do *Fgf9* seria reprimir a via de diferenciação ovariana (*Wnt4*), sendo o efeito de aumento de expressão de *Sox9* um fenômeno secundário de menor impacto biológico para o processo da determinação gonadal (Carré; Greenfield, 2014; Jameson et al., 2012).

A análise do *Fgf9* em testículos de homens adultos normais detectou um padrão de imunomarcção citoplasmática predominantemente em células de Leydig e fraca marcação em células de Sertoli e células germinativas. No mesmo estudo foram avaliados testículos de pacientes com síndrome de Sertoli (*Sertoli cell-only syndrome* ou SCOS) com detecção de imunomarcção fraca apenas em células de Leydig (Chung et al., 2013). Acreditamos que a ausência de expressão do gene *SRY* associado ao quadro de disgenesia gonadal (disfunção das células de

Sertoli e Leydig e aplasia de células germinativas) justifique a hipoexpressão de *Fgf9* na gônada adulta do paciente DDS 46,XX Testicular

5.3 Avaliação do efeito funcional da variante c.305G>A

A pesquisa da variante alélica c.305 G>A na família brasileira revelou uma perfeita segregação do genótipo AA com o fenótipo de HPP, em um padrão de herança autossômico recessivo. Em vista disso, havia um altíssimo grau de suspeição de que a variante c.305G>A era patogênica e foi a causadora da síndrome genética. No entanto, a variante encontrada na família brasileira gerava a mudança de um único aminoácido na proteína, mas reproduzia o mesmo fenótipo (DDS 46,XX Testicular, HPP e CCE) da família italiana, a qual era portadora de uma mutação amórfica. Diante desta discrepância entre genótipo e fenótipo, julgamos necessário comprovar o papel funcional da variante c.305G>A.

Primeiro, por meio da avaliação do mRNA da R-spondina-1 no tecido gonadal e na pele do probando, isolamos as principais isoformas da proteína, excluindo a possibilidade de mudança de sítio de *splicing*.

Para confirmarmos o papel patogênico da mutação, realizamos ensaios de transfecção transitória *in vitro*. De fato, nossos resultados demonstraram que a R-spondina-1 mutante tem uma menor capacidade de transativação do plasmídeo *reporter* da via Wnt. O resultado da avaliação funcional com ensaios celulares comprova, portanto, que a troca Cys102Tyr causa prejuízo funcional para proteína.

Por fim, para complementarmos a investigação do efeito funcional da variante c.305G>A, executamos as simulações de dinâmica molecular. Partimos do pressuposto de que a mutação Cys102Tyr promovia mudanças na conformação tridimensional da proteína, as quais modificariam a interação da R-spondina-1 com os receptores de membrana LGR e RNF43.

Todos os resultados das simulações, desde a análise da sequência primária até a análise da estrutura tridimensional, corroboraram a hipótese de que a troca de aminoácidos Cys102Tyr é patogênica. Primeiramente, a presença da mutação provoca a perda da importante ponte de dissulfeto entre os resíduos Cys102 e Cys111, responsável pela manutenção da estabilidade do segundo domínio tipo furina (FU2). A ausência dessa ligação covalente tem repercussões em toda a molécula mutada e, por conseguinte, nos complexos em que ela faz parte. De maneira geral, a presença da mutação resultou em maiores distâncias quadráticas médias dos resíduos correspondentes nas versões selvagem e mutada da Rspo1. Tal comportamento foi verificado em ambas as análises, a R-spondina-1 isolada e no complexo LGR5-Rspo1-RNF43. A avaliação das distribuições de energia potencial sugerem que a molécula de R-spondina-1 (isolada ou acoplada ao complexo LGR5-Rspo1-RNF43) é estruturalmente menos estável, e portanto mais flexível, quando a mutação está presente. Além disso, a mutação aumenta a distância entre os centros de massa da R-spondina-1 e do LGR5, diminuindo a afinidade entre a proteína e o receptor. Esse achado está de acordo com a diminuição observada da energia de ligação daquelas duas moléculas. O acoplamento Rspo1-RNF43 ocorre em uma porção diametralmente oposta àquela do resíduo Cys102 e teoricamente deveria ser menos afetado pela presença da mutação. De fato, a afinidade entre a R-spondina-1 e o RNF43 permaneceu inalterada, uma vez que não foi detectada variação significativa entre as energias de ligação das duas moléculas na presença da Tyr102. Na mutante, as distâncias entre os resíduos Ala109 e Phe110, da molécula LGR5, e os resíduos Phe106 e Phe110, da RSPO1, diminuem em comparação com a molécula nativa. O movimento composto pelos afastamentos dos centros de massa e o encurtamento das distâncias entre os resíduos do LGR5 e da RSPO1 sugere que a Rspo1 mutada assume posição ligeiramente rotacionada em relação àquela da molécula selvagem no interior do complexo LGR5-Rspo1-RNF43 (Anexo, Figuras 4 e 5).

5.4 Pesquisa de genes modificadores de fenótipo

Genótipos específicos, fatores epigenéticos e influências ambientais podem modificar o fenótipo de uma dada doença mendeliana causando penetrância incompleta, variações no fenótipo intrafamiliar ou diferentes graus de gravidade do quadro clínico. No entanto, é possível que genes modificadores também exerçam uma influência considerável na heterogeneidade fenotípica de doenças mendelianas.

Em tese, genes modificadores podem alterar a apresentação fenotípica de um dado genótipo por meio da via biológica associada à doença ou de vias biológicas diferentes ou paralelas. Além disso, os genes modificadores podem acentuar o defeito primário, conduzindo a um fenótipo mais grave, ou reduzi-lo e, assim, apresentar um efeito protetor (Gallati et al., 2014).

A síndrome genética autossômica recessiva associada a mutações no gene *RSPO1* apresenta um quadro clínico bastante complexo. Algumas manifestações da síndrome, tais como a HPP e o DDS 46,XX, no entanto, são bastante homogêneas. No presente estudo identificamos o primeiro indivíduo (IV-32) com cariótipo 46,XX portador de uma mutação em homozigose no gene *RSPO1* que não desenvolveu DDS. Na mesma família, todos os demais indivíduos 46,XX desenvolveram DDS 46,XX Testicular.

Considerando-se o exposto, nossa hipótese inicial para explicar a ausência do distúrbio de desenvolvimento sexual na paciente IV-32 foi a coexistência de outra alteração genética, ou seja, um gene modificador de fenótipo, com ação atenuadora em relação ao defeito genético na gônada.

Estudos com camundongos transgênicos demonstram que os animais XX duplo-*knockouts* *Foxl2*^{-/-}; *Wnt4*^{-/-} e *Foxl2*^{-/-}; *Rspo1*^{-/-} apresentam reversão sexual completa. Por meio de um raciocínio inverso, com base nesses modelos, propusemos que uma duplicação de um dos genes, *WNT4* ou *FOXL2*, poderia contrabalançar os desequilíbrios causados pela mutação no gene *RSPO1* na via de diferenciação ovariana, impedindo a reversão sexual.

Hiperexpressão de *SOX9*, por sua vez, causa quadros de reversão sexual em modelos animais e DDS 46,XX Testicular em humanos. Portanto, hipoteticamente, a inibição da expressão gonadal do *SOX9* também poderia justificar a ausência do fenótipo de DDS na paciente IV-32. Entretanto, a avaliação do número de cópias dos genes candidatos *WNT4* e *SOX9* e da região regulatória do *SOX9* foi normal. Com o objetivo de detectar alterações no número de cópias do *locus* do *FOXL2* e simultaneamente avaliar outras regiões do genoma, ampliamos a investigação da paciente optando pela técnica *array*-CGH. Entretanto, não detectamos perdas ou ganhos de segmentos cromossômicos. Posteriormente, por meio de uma abordagem de sequenciamento genômico global, identificamos uma variante alélica no gene do receptor *LGR5* (rs17109924) na família brasileira, a qual está presente em homozigose na paciente IV-32 e ausente nos demais pacientes 46,XX com ambiguidade genital.

O *Lgr5* é amplamente expresso em ovários de camundongos durante a embriogênese da gônada (Ng et al., 2014). Portanto, é possível que o *LGR5*, atuando como um receptor da *RSP01*, esteja envolvido com a modulação da via Wnt/ β -catenina durante a embriogênese da gônada humana. Além disso, estudos clínicos recentes demonstraram que o polimorfismo *LGR5* rs17109924 é um preditor biológico de prognóstico em pacientes portadores de tumores colorretais (Szkandera et al., 2015). Esse resultado sugere que o polimorfismo *LGR5* rs17109924 tenha efeito funcional.

O rs17109924 é um polimorfismo *missense* muito comum que modifica um resíduo localizado na segunda alça intracitoplasmática (ICL2) do receptor *LGR5*. Peng et al. demonstraram, por meio de experimentos de transfecção transitória *in vitro* com proteínas recombinantes quiméricas, que a substituição do domínio 7TM do *LGR5* por um domínio correspondente de outra proteína de membrana reduz a transativação do *reporter* TOPFLASH para níveis basais. Essa descoberta indica que a ligação da R-espondina-1 ao domínio extracelular do *LGR5* por si só é insuficiente para perpetuar a

sinalização *Wnt* e sugere que os domínios TM e ICL têm um papel na transdução de sinal (Peng et al., 2013b; Kumar et al., 2014).

Os resultados desses trabalhos descritos, em conjunto, fortalecem nossas suspeitas de que o polimorfismo LGR5 rs17109924 tenha efeito funcional e esteja associado com a variabilidade do fenótipo de DDS 46,XX Testicular nessa família brasileira. Com base nos estudos experimentais, nossa hipótese é que a região ICL2 interaja com proteínas citosólicas de sinalização e que o polimorfismo rs17109924 possa alterar cinética de ativação do receptor.

Os LGRs pertencem à família de proteínas acopladas à proteína G. Entretanto, diferente da maioria dos membros dessa família, os domínios ICL não estão acoplados à proteína G e a estrutura cristalográfica dos domínios transmembrana (TM) e intracitoplasmático (ICL) ainda não foi elucidada. Além disso, existem poucas informações sobre os mecanismos moleculares envolvidos na transdução do sinal intracelular do LGR5 após o acoplamento do ligante (Kumar et al., 2014).

Acreditamos que, no futuro, o esclarecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na transdução do sinal intracelular, desencadeados pela ligação das R-spondinas aos LGRs, possibilitarão o desenho de estudos funcionais para testar a influência da variante rs17109924 sobre a função do receptor LGR5.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, a partir do estudo de um indivíduo portador de DDS 46,XX Testicular sindrômico, identificamos uma nova variante no gene *RSPO1* em uma grande família consanguínea com múltiplos indivíduos afetados.

- 1 Nossos achados demonstram que a variante do gene *RSPO1* c.305G>A (p.Cys102Tyr) identificada na família brasileira é patogênica, sendo responsável pela síndrome genética de herança autossômica recessiva caracterizada por alterações dermatológicas, oftalmológicas e pelo distúrbio do desenvolvimento sexual.
 - 2.1 Os resultados de dinâmica molecular demonstram que a troca de aminoácidos p.Cys102Tyr aumenta a flexibilidade do *backbone* da R-spondina-1, diminuindo a sua energia de ligação ao complexo LGR5-Rspo1-RNF43 e provocando uma leve rotação da molécula dentro do complexo.
 - 2.2 Os experimentos de transfecção transitória *in vitro* demonstram que a proteína mutada apresenta menor capacidade de transativação do *reporter* da via Wnt.
 - 2.3 Os resultados em conjunto sugerem que a variante p.Cys102Tyr provoca menor ativação da via Wnt/ β -catenina por induzir alterações estruturais que perturbam a interação da proteína com os receptores LGR5 e RNF43.

- 3.1 Os resultados da avaliação hormonal e dos estudos de expressão sugerem que as gônadas dos portadores de DDS 46,XX Testicular são disgenéticas e sofrem degeneração funcional das células de suporte ao longo da vida adulta.
- 3.2 O distúrbio de desenvolvimento sexual está associado com hipoexpressão de *RSP01*, normoexpressão de *CTNNB1* e hiperexpressão de *SOX9* na gônada adulta. Esses resultados sugerem uma inibição direta da expressão da *RSP01* pelo gene *SOX9*.
- 3.3 Nossos achados sugerem que o processo de reversão sexual na gônada XX ocorra por uma hiperexpressão do *SOX9* secundária à menor ativação da via Wnt/ β -catenina na gônada durante a embriogênese.

Identificamos uma mulher 46,XX, fértil, portadora da variante c.305G>A em homozigose, que desenvolveu alterações oftalmológicas e dermatológicas mas não apresentou alterações do desenvolvimento sexual.

- 4.1 A ausência de reversão sexual nesse caso não está associada com aumento do número de cópias do gene *WNT4* ou com diminuição do número de cópias do gene *SOX9* ou de sua região cis-regulatória.
- 4.2 Identificamos uma associação entre a variante LGR5 rs17109924 e o fenótipo de distúrbio de desenvolvimento sexual: a paciente 46,XX sem DDS é homozigota para o alelo menos frequente ao passo que todos os demais indivíduos 46,XX com DDS são homozigotos para o alelo selvagem.
- 4.3 Entretanto, serão necessários estudos funcionais para esclarecer o impacto biológico da interação das variantes *RSP01* p.Cys102Tyr e LGR5 rs17109924.

7 Anexos

Termos de consentimento livre e esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

- A. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Análise do Gene *RSPO1* em Pacientes com os Distúrbios do Desenvolvimento Sexual Ovotesticular e 46, XX Testicular SRY negativos
- B. PESQUISADOR: Elaine Maria Frade Costa
CARGO/FUNÇÃO: Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 57753
UNIDADE DO HCFMUSP: Endocrinologia
- C. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO (X); RISCO MÉDIO (); RISCO BAIXO (); RISCO MAIOR ().
- D. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses.
-

EXPLICAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa por ter sido diagnosticado com Distúrbio do Desenvolvimento Sexual Ovotesticular ou Distúrbio do Desenvolvimento Sexual 46, XX Testicular. As informações abaixo estão sendo fornecidas para explicar a importância da sua participação voluntária nesse estudo.

1 - Desenho do estudo e objetivo. Genes são estruturas presentes em todas as células do corpo e fornecem as características para as pessoas. Quando há alteração (mutação) na estrutura dos genes que carregam as informações necessárias para a formação dos ovários (glândula que produz hormônios femininos) ou dos testículos (glândula que produz hormônios masculinos) pode ocorrer quadro de malformação do genital e/ou alteração no desenvolvimento das características sexuais na adolescência. As glândulas produtoras de hormônios sexuais também são chamadas de gônadas. A maioria das pessoas com alteração do desenvolvimento dos genitais e/ou das gônadas (nome dado ao ovário ou ao testículo) permanece sem diagnóstico mesmo após uma intensa investigação clínica e laboratorial. O objetivo desse trabalho é pesquisar a presença de mutações (alterações) no gene da *RSPO1*, que participa do processo de formação das gônadas (ovários e testículos). A pesquisa desse gene poderá aumentar o nosso conhecimento das causas desses distúrbios do desenvolvimento sexual e assim poderemos definir no futuro um tratamento mais específico.

2 - Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos.

Para pesquisa de mutação no gene *RSPO1* o procedimento realizado será uma coleta de sangue. O propósito deste procedimento é obter uma amostra de células do seu sangue para extração de DNA (conjunto de genes das células).

A mutação no gene pode ocorrer em todas as células do corpo ou apenas nas células da gônada. Por isso também é importante o estudo do gene *RSPO1* nas células da sua gônada. Não será necessário fazer cirurgia para realização de biópsia da gônada. Caso o(a) senhor(a) já tenha feito cirurgia para tratamento das alterações genitais, utilizaremos um fragmento da sua gônada que foi retirada e congelada durante o tratamento cirúrgico.

3 - Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados. Coleta de sangue: através de uma picada com agulha estéril descartável na veia do seu antebraço retiramos 10ml de sangue (correspondente a 2 colheres de sopa).

4 - Desconfortos e riscos esperados. O desconforto da coleta de sangue é a dor da picada e, eventualmente, o aparecimento de um pequeno hematoma (mancha arroxeadada em torno da picada) que desaparecerá em pouco menos de uma semana.

5 - Benefícios para o participante. O benefício ao participar desse estudo será a identificação de possíveis defeitos no seu gene, responsáveis pelo aparecimento da doença que gerou as alterações do seu desenvolvimento sexual. A partir dessas informações poderemos avaliar os demais membros da sua família e fazer um aconselhamento genético, isto é, prever quais pessoas poderiam transmitir a mesma doença para os filhos.

GARANTIAS (DIREITOS) DO PACIENTE

6 - Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo você terá acesso as informações sobre os procedimentos e os riscos e benefícios relacionados a pesquisa. Durante a realização do projeto você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas. Você terá acesso a qualquer tempo aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

7 - Garantida a liberdade: a qualquer momento você poderá solicitar a retirada do consentimento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

8 - Garantia de confidencialidade (privacidade): as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

9 - Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

INFORMAÇÕES SOBRE O RESPONSÁVEL

O principal investigador é a Dra Elaine Maria Frade Costa, que pode ser encontrada no endereço Avenida Enéas Carvalho Aguiar, 255, 2 andar, bloco 6. Telefone: 3062-6654

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

CONSENTIMENTO PÓS ESCLARECIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Análise do Gene *RSPO1* em Pacientes com os Distúrbios do Desenvolvimento Sexual Ovotesticular e 46, XX Testicular SRY negativos".

Eu discuti com o Dra. Elaine Maria Frade Costa sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal (*) Data ____ / ____ / ____

----- Data ____ / ____ / ____
Assinatura da testemunha (*)

(*) para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO-HCFMUSP**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
BIÓPSIA DE PELE
CONTROLE NORMAL**

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

- 1- TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Análise do Gene *RSPO1* em Pacientes com os Distúrbios do Desenvolvimento Sexual Ovotesticular e 46, XX Testicular SRY negativos
- 2- PESQUISADOR: Elaine Maria Frade Costa
CARGO/FUNÇÃO: Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 57753
UNIDADE DO HCFMUSP: Endocrinologia
- 3- AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO (); RISCO MÉDIO (); RISCO BAIXO (X); RISCO MAIOR ().
- 4- DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses.

EXPLICAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa por ser saudável. O objetivo é você fazer parte do grupo controle. As informações abaixo estão sendo fornecidas para explicar a importância da sua participação voluntária nesse estudo.

1 - Desenho do estudo e objetivo. Genes são estruturas presentes em todas as células do corpo e fornecem as características para as pessoas. Quando há alteração (mutação) na estrutura dos genes que carregam as informações necessárias para a formação dos ovários (glândula que produz hormônios femininos) ou dos testículos (glândula que produz hormônios masculinos) pode ocorrer quadro de malformação do genital e/ou alteração no desenvolvimento das características sexuais na adolescência.

A maioria das pessoas com alteração do desenvolvimento dos genitais e/ou das gônadas (nome dado ao ovário ou ao testículo) permanece sem diagnóstico mesmo após uma intensa investigação clínica e laboratorial. O objetivo desse trabalho é pesquisar a presença de mutações (alterações) no gene da *RSP01*, que participa do processo de formação das gônadas (ovários e testículos). A pesquisa desse gene poderá aumentar o nosso conhecimento das causas desses distúrbios do desenvolvimento sexual e assim poderemos definir no futuro um tratamento mais específico.

O gene *RSP01* está presente em todas as células do corpo, principalmente nas células do sangue, pele e nas células da gônada e participa do processo de formação dos ovários e testículos. O objetivo inicial do nosso trabalho foi pesquisar se esse gene (*RSP01*) está associado com a causa das doenças Distúrbios do Desenvolvimento Sexual Ovotesticular e 46, XX Testicular e aumentar os conhecimentos sobre esses tipos raros de distúrbio de desenvolvimento sexual.

O estudo desse gene no sangue de nosso(s) paciente(s) mostrou a presença de mutação (defeito) que poderá ser a causa da doença que gerou as alterações do desenvolvimento sexual. Para descobrirmos se essa mutação gerou um prejuízo no funcionamento do gene e causou a doença precisamos obter uma amostra de células do(s) paciente(s) afetados(s) e uma amostra de células de uma pessoa do sexo feminino sem doença (controle normal) e realizar experimentos, comparando os resultados dos grupos para obter resultados conclusivos. Não há procedimentos alternativos menos invasivo para obtenção de células vivas que possam ser cultivadas, ou seja, não é possível fazer cultura do seu sangue.

2 - Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros. O procedimento realizado será a biópsia de pele. O propósito deste procedimento é obter uma amostra de células da sua pele para que essas possam ser cultivadas e multiplicadas no laboratório para posterior realização de experimentos.

3 - Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados. Biópsia de pele.

Primeiro será realizada a limpeza da pele do seu antebraço com produtos antissépticos, para evitar contaminações. Logo após, a sua pele será anestesiada usando uma injeção, para impedir que você sinta dor. Será obtido um pequeno fragmento (pedaço) de pele (de 0,3 cm ou 3 mm; corresponde a metade de um grão de arroz) do antebraço usando uma lâmina circular e estéril. As células serão cultivadas e guardadas no laboratório. O procedimento é simples e rápido; não necessita de internação; não necessita de consultas extras; será realizado durante as consultas rotineiras no ambulatório.

4 - Desconfortos e riscos esperados. A biópsia de pele do braço será feita sob anestesia local reduzindo a dor para níveis mínimos. O desconforto da coleta do fragmento de pele é a dor da picada da anestesia e, eventualmente, dor leve residual no local. Eventualmente, a biópsia de pele pode causar hematomas (manchas roxas) transitórias e muito raramente infecção no local. Para pacientes com tendência de formar cicatrizes exuberantes (quelóides), a biópsia do braço pode originar uma diminuta cicatriz menor que meio centímetro.

5 - Benefícios para o participante. A sua participação é voluntária e não traz benefício direto para você. Entretanto, pode contribuir para o melhor entendimento de determinados tipos de doenças.

GARANTIAS (DIREITOS) DO PACIENTE

6 - Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo você terá acesso as informações sobre os procedimentos e os riscos e benefícios relacionados a pesquisa. Durante a realização do projeto você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas. Você terá acesso a qualquer tempo aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

7 - Garantida a liberdade: a qualquer momento você poderá solicitar a retirada do consentimento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

8 - Garantia de confidencialidade (privacidade): as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

9 - Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

INFORMAÇÕES SOBRE O RESPONSÁVEL

O principal investigador é a Dra Elaine Maria Frade Costa, que pode ser encontrada no endereço Avenida Enéas Carvalho Aguiar, 255, 2 andar, bloco 6. Telefone: 3062-6654

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

CONSENTIMENTO PÓS ESCLARECIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Análise do Gene *RSPO1* em Pacientes com os Distúrbios do Desenvolvimento Sexual Ovotesticular e 46, XX Testicular SRY negativos".

Eu discuti com o Dra. Elaine Maria Frade Costa sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal (*) Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha (*) Data ____ / ____ / ____

(*) para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO-HCFMUSP**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
BIÓPSIA DE PELE
PACIENTE**

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Análise do Gene *RSPO1* em Pacientes com os Distúrbios do Desenvolvimento Sexual Ovotesticular e 46, XX Testicular SRY negativos
2. PESQUISADOR: Elaine Maria Frade Costa
CARGO/FUNÇÃO: Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 57753
UNIDADE DO HCFMUSP: Endocrinologia
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO (); RISCO MÉDIO (); RISCO BAIXO (X); RISCO MAIOR ().
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses.

EXPLICAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa por ter apresentado uma alteração no gene *RSPO1* através do estudo do seu sangue. As informações abaixo estão sendo fornecidas para explicar a importância da sua participação voluntária nesse estudo.

1 - Desenho do estudo e objetivo. Genes são estruturas presentes em todas as células do corpo e fornecem as características para as pessoas. Quando há alteração (mutação) na estrutura dos genes que carregam as informações necessárias para a formação dos ovários (glândula que produz hormônios femininos) ou dos testículos (glândula que produz hormônios masculinos) pode ocorrer quadro de malformação do genital e/ou alteração no desenvolvimento das características sexuais na adolescência. No caso do seu tipo de distúrbio de desenvolvimento sexual até hoje não sabemos com certeza qual (is) gene (s) está (ão) alterado (s).

O gene *RSPO1* está presente em todas as células do corpo, principalmente nas células do sangue, pele e nas células da gônada e participa do processo de formação dos ovários e testículos. O objetivo inicial do nosso trabalho foi pesquisar se esse gene (*RSPO1*) está associado com a causa da sua doença e aumentar os conhecimentos sobre o seu tipo raro de distúrbio de desenvolvimento sexual.

O estudo desse gene no seu sangue mostrou a presença de uma mutação (defeito) que poderá ser a causa da doença que gerou as alterações do seu desenvolvimento sexual. Para descobrirmos se essa mutação gerou um prejuízo no funcionamento do gene e causou a sua doença precisamos obter uma amostra de células vivas do seu corpo que possam ser cultivadas e mantidas no laboratório para realização de experimentos.

2 - Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros. O procedimento realizado será a biópsia de pele. O propósito deste procedimento é obter uma amostra de células da sua pele para que essas possam ser cultivadas e multiplicadas no laboratório para posterior realização de experimentos que poderão esclarecer a causa da sua doença. Não há procedimentos alternativos para obtenção de células vivas que possam ser cultivadas, ou seja, não é possível fazer cultura do seu sangue nem das células da sua gônada.

3 - Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados. Biópsia de pele. Primeiro será realizada a limpeza da pele do seu antebraço com produtos antissépticos, para evitar contaminações. Logo após, a sua pele será anestesiada usando uma injeção, para impedir que você sinta dor. Será obtido um pequeno fragmento (pedaço) de pele (de 0,3 cm ou 3 mm; corresponde a metade de um grão de arroz) do antebraço usando uma lâmina circular e estéril. As células serão cultivadas e guardadas no laboratório. O procedimento é simples e rápido; não necessita de internação; não necessita de consultas extras; será realizado durante as consultas rotineiras no ambulatório.

4 - Desconfortos e riscos esperados. A biópsia de pele do braço será feita sob anestesia local reduzindo a dor para níveis mínimos. O desconforto da coleta do fragmento de pele é a dor da picada da anestesia e, ocasionalmente, dor leve residual no local. Eventualmente, a biópsia de pele pode causar hematomas (manchas roxas) transitórias e muito raramente infecção no local. Para pacientes com tendência de formar cicatrizes exuberantes (quelóides), a biópsia do braço pode originar uma diminuta cicatriz menor que meio centímetro.

5 - Benefícios para o participante. O benefício ao participar desse estudo será definir se esse defeito no seu gene é responsável pelo aparecimento da doença que gerou as alterações do seu desenvolvimento sexual. A partir dessas informações poderemos avaliar os demais membros da sua família e fazer um aconselhamento genético, isto é, prever quais pessoas poderiam transmitir a mesma doença para os filhos.

GARANTIAS (DIREITOS) DO PACIENTE

6 - Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo você terá acesso as informações sobre os procedimentos e os riscos e benefícios relacionados a pesquisa. Durante a realização do projeto você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas. Você terá acesso a qualquer tempo aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

7 - Garantida a liberdade: a qualquer momento você poderá solicitar a retirada do consentimento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

8 - Garantia de confidencialidade (privacidade): as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

9 - Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

INFORMAÇÕES SOBRE O RESPONSÁVEL

O principal investigador é a Dra Elaine Maria Frade Costa, que pode ser encontrada no endereço Avenida Enéas Carvalho Aguiar, 255, 2 andar, bloco 6. Telefone: 3062-6654.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

CONSENTIMENTO PÓS ESCLARECIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Análise do Gene *RSPO1* em Pacientes com os Distúrbios do Desenvolvimento Sexual Ovotesticular e 46, XX Testicular SRY negativos".

Eu discuti com o Dra. Elaine Maria Frade Costa sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal (*) Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha (*) Data ____ / ____ / ____

(*) para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Figura 1 – Interactoma do gene *RSP01*. Na figura os genes estão representados por círculos e as interações entre os genes por linhas. Ilustração confeccionada por meio de ferramenta disponível do site <http://string-db.org>

Figura 2 – Vetor TOPFLASH. O plasmídio *reporter* de TCF possui dois conjuntos (com o segundo conjunto na orientação inversa), com três cópias da sequência selvagem do sítio de ligação do TCF, os quais ficam a montante do promotor TK e da fase de leitura aberta (ORF ou *open reading frame*) da luciferase

Figura 4 – Estrutura ternária do complexo LGR5-Rspo1-RNF43. O domínio FU1-FU2 da R-spondina-1 é mostrado em rosa; o domínio EC do LGR5 em azul e o módulo do RNF43 em amarelo. O domínio N-terminal da R-spondina-1, contendo os domínios FU, é composto de 12 folhas β pregueadas (β_1 - β_{12}), dispostas lado a lado, formando seis *fingers*. Os *fingers* são estabilizados por 8 pontes de dissulfeto, formadas entre os resíduos de cisteína. A R-spondina-1 liga-se ao receptor LGR por meio de uma interface formada pelo lado côncavo do domínio extracelular LRR (*leucine-rich repeat*) e cinco dos seis *fingers* dos domínios FU1-FU2. O resíduo Cys102, localizado no segundo domínio tipo furina (FU2), é responsável pela formação da sexta ponte de dissulfeto (Cys102-Cys111) e participa da conformação do quinto *finger* da proteína R-spondina-1. A cisteína 102 estabiliza a estrutura terciária da proteína em uma importante subinterface da qual emergem vários resíduos que interagem com o receptor de membrana LGR (p. ex., Phe 106 e Phe110) (Chen et al., 2013; Wang et al., 2013; Peng et al., 2013a; Xu et al., 2013).

Figura 5 – Sobreposição dos modelos do complexo LGR5-Rspo1-RNF43 selvagem e mutante. A mutação Cys102Tyr interrompe a ponte de dissulfeto Cys102-Cys111 e resulta em uma molécula menos estável. O movimento composto pelos afastamentos dos centros de massa e o encurtamento das distâncias entre os resíduos do LGR5 e da Rspo1 sugere que a molécula mutada (azul) assume posição ligeiramente rotacionado em relação àquela da molécula selvagem (branco) no interior do complexo LGR5-Rspo1-RNF43

8 Referências

REFERÊNCIAS

Abrão MG, Billerbeck AE, Nishi MY, Marui S, Mendonça BB. Standardization of DNA extraction with NaCl from oral mucosa cells: application in PROP1 gene study. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005;49(6):978-82.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-9.

Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z et al. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev*. 2004;18(9):1072-87.

Aksglaede L, Sorensen K, Boas M, Mouritsen A, Hagen CP, Jensen RB et al. Changes in anti-Müllerian hormone (AMH) throughout the life span: A population-based study of 1027 healthy males from birth (cord blood) to the age of 69 years. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(12):5357-64.

Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, Groome NP, Illingworth PJ, McNeilly AS et al. Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(9):3341-5.

Auguste A, Chassot AA, Grégoire EP, Renault L, Pannetier M, Treier M et al. Loss of R-spondin1 and Foxl2 amplifies female-to-male sex reversal in XX mice. *Sex Dev*. 2011;5(6):304-17.

Beiguelman, B. *Citogenética humana*. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1986.

Benko S, Gordon CT, Mallet D, Sreenivasan R, Thauvin-Robinet C, Brendehaug A et al. Disruption of a long distance regulatory region upstream of SOX9 in isolated disorders of sex development. *J Med Genet.* 2011; 48(12):825-30.

Bernard P, Ryan J, Sim H, Czech DP, Sinclair AH, Koopman P et al. Wnt signaling in ovarian development inhibits Sf1 activation of Sox9 via the Tesco enhancer. *Endocrinology.* 2012;153(2):901-12.

Bhanja P, Saha S, Kabarriti R, Liu L, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J et al. Protective role of R-spondin1, an intestinal stem cell growth factor, against radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. *PLoS One.* 2009;4(11):e8014.

Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle EJ. A WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46, XX woman. *N Engl J Med.* 2004;351(8):792-8.

Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, AgoulNIK AI, Harrison WR, Behringer RR et al. A transgenic insertion upstream of sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet.* 2000;26(4):490-4.

Blaydon DC, Philpott MP, Kelsell DP. R-spondins in cutaneous biology: nails and cancer. *Cell Cycle.* 2007;6(8):895-7.

Boucekkine C, Toublanc JE, Abbas N, Chaabouni S, Ouahid S, Semrouni M et al. Clinical and anatomical spectrum in XX sex reversed patients. Relationship to the presence of Y specific DNA-sequences. *Clin Endocrinol.* 1994;40(6):733-42.

Camerino G, Parma P, Radi O, Valentini S. Sex determination and sex reversal. *Curr Opin Genet Dev.* 2006;16(3):289-92.

Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(28):11452-7.

Carré GA, Greenfield A. Characterising novel pathways in testis determination using mouse genetics. *Sex Dev*. 2014;8(5):199-207.

Chai R, Xia A, Wang T, Jan TA, Hayashi T, Bermingham-McDonogh O et al. Dynamic Expression of Lgr5, a Wnt Target Gene, in the Developing and Mature Mouse Cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2011;12(4):455-69.

Chassot AA, Gillot I, Chaboissier MC. R-spondin1, WNT4, and the CTNNB1 signaling pathway: strict control over ovarian differentiation. *Reproduction*. 2014;148(6):R97-110.

Chassot AA, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G et al. Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet*. 2008; 17(9):1264-77.

Chen PH, Chen X, Lin Z, Fang D, He X. The structural basis of R-spondin recognition by LGR5 and RNF43. *Genes Dev*. 2013;27(12):1345-50.

Chua AW, Ma D, Gan SU, Fu Z, Han HC, Song C et al. The role of R-spondin2 in keratinocyte proliferation and epidermal thickening in keloid scarring. *J Invest Dermatol*. 2011;131(3):644-54.

Chung CL, Lu CW, Cheng YS, Lin CY, Sun HS, Lin YM. Association of aberrant expression of sex-determining gene fibroblast growth factor 9 with Sertoli cell-only syndrome. *Fertil Steril*. 2013;100(6):1547-54.

Cox JJ, Willatt L, Homfray T, Woods CG. A SOX9 duplication and familial 46, XX developmental testicular disorder. *N Engl J Med*. 2011;364(1):91-3.

de Lau W, Barker N, Low TY, Koo BK, Li VS, Teunissen H et al. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*. 2011;476(7360):293-7.

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.

Domenice S, Costa EMF, Mendonça BB. Distúrbios da determinação e diferenciação sexual. In: Saad MJA, Maciel RMB, Mendonça BB. *Endocrinologia*. 1a ed. São Paulo: Atheneu; 2007. p.131-86.

Domenice S, Nishi MY, Billerbeck AE, Carvalho FM, Frade EM, Latronico AC et al. Molecular analysis of SRY gene in Brazilian 46,XX sex reversed patients: absence of SRY sequence in gonadal tissue. *Med Sci Monit*. 2001; 7(2):238-41.

Eggers S, Sinclair A. Mammalian sex determination - insights from humans and mice. *Chromosome Res*. 2012;20(1):215-38.

Gallati S. Disease-modifying genes and monogenic disorders: experience in cystic fibrosis. *Appl Clin Genet*. 2014;7:133-46.

García-Alcalde F, Okonechnikov K, Carbonell J, Cruz LM, Götz S, Tarazona S et al. Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data. *Bioinformatics*. 2012;28(20):2678-9.

Garrison E, Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. arXiv preprint arXiv:1207.3907v2 [q-bio.GN]

Georg I, Barrionuevo F, Wiech T, Scherer G. Sox9 and Sox8 are required for basal lamina integrity of testis cords and for suppression of FOXL2 during embryonic testis development in mice. *Biol Reprod*. 2012;87(4):99.

Gerger A, Zhang W, Yang D, Bohanes P, Ning Y, Winder T et al. Common cancer stem cell gene variants predict colon cancer recurrence. *Clin Cancer Res.* 2011;17(21):6934-43.

Glinka A, Dolde C, Kirsch N, Huang YL, Kazanskaya O, Ingelfinger D et al. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ β -catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep.* 2011;12(10):1055-61.

Gong X, Carmon KS, Lin Q, Thomas A, Yi J, Liu Q. LGR6 is a high affinity receptor of R-spondins and potentially functions as a tumor suppressor. *PLoS One.* 2012;7(5):e37137.

Haider AS, Peters SB, Kaporis H, Cardinale I, Fei J, Ott J et al. Genomic analysis defines a cancer-specific gene expression signature for human squamous cell carcinoma and distinguishes malignant hyperproliferation from benign hyperplasia. *J Invest Dermatol.* 2006;126(4):869-81.

Hao HX, Xie Y, Zhang Y, Charlat O, Oster E, Avello M et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature.* 2012;485(7397):195-200.

Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet.* 1999;87(4):349-53.

Jameson SA, Lin YT, Capel B. Testis development requires the repression of Wnt4 by Fgf signaling. *Dev Biol.* 2012;370(1):24-32.

Kamata T, Katsube K, Michikawa M, Yamada M, Takada S, Mizusawa H. R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1676(1):51-62.

Kawasaki M, Porntaveetus T, Kawasaki K, Oommen S, Otsuka-Tanaka Y, Hishinuma M et al. R-spondins/Lgrs expression in tooth development. *Dev Dyn*. 2014;243(6):844-51.

Kim GJ, Sock E, Buchberger A, Just W, Denzer F, Hoepffner W et al. Copy number variation of two separate regulatory regions upstream of SOX9 causes isolated 46,XY or 46,XX disorder of sex development. *J Med Genet*. 2015;52(4):240-7.

Kim KA, Kakitani M, Zhao J, Oshima T, Tang T, Binnerts M et al. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science*. 2005; 309(5738):1256-9.

Kim KA, Wagle M, Tran K, Zhan X, Dixon MA, Liu S et al. R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Mol Biol Cell*. 2008;19(6):2588-96.

Kim KA, Zhao J, Andarmani S, Kakitani M, Oshima T, Binnerts ME et al. R-spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. *Cell Cycle*. 2006a; 5(1):23-6.

Kim Y, Capel B. Balancing the bipotential gonad between alternative organ fates: a new perspective on an old problem. *Dev Dyn*. 2006;235(9):2292-300.

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*. 2006b;4(6):e187.

Kleist B, Xu L, Kersten C, Seel V, Li G, Poetsch M. Single nucleotide polymorphisms of the adult intestinal stem cell marker Lgr5 in primary and metastatic colorectal cancer. *Am J Transl Res*. 2012;4(3):279-90.

Kojima Y, Hayashi Y, Mizuno K, Sasaki S, Fukui Y, Koopman P et al. Up-regulation of SOX9 in human sex-determining region on the Y chromosome (SRY)-negative XX males. *Clin Endocrinol*. 2008;68(5):791-9.

Koo BK, Spit M, Jordens I, Low TY, Stange DE, van de Wetering M et al. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature*. 2012;488(7413):665-9.

Krieger E, Darden T, Nabuurs SB, Finkelstein A, Vriend G. Making optimal use of empirical energy functions: force-field parameterization in crystal space. *Proteins*. 2004;57(4):678-83.

Krönke G, Uderhardt S, Kim KA, Stock M, Scholtysek C, Zaiss MM et al. R-spondin 1 protects against inflammatory bone damage during murine arthritis by modulating the Wnt pathway. *Arthritis Rheum*. 2010;62(8):2303-12.

Kumar KK, Burgess AW, Gulbis JM. Structure and function of LGR5: an enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells. *Protein Sci*. 2014;23(5):551-65.

Lee GM, Ko JM, Shin CH, Yang, SW. A Korean boy with 46,XX testicular disorder of sex development caused by SOX9 duplication. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2014;19(2):108-12.

Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA. Consensus Statement on Management of Intersex Disorders. International Consensus Conference on Intersex. *Pediatrics*. 2006;118(2):e488-500.

Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-60.

Liu CF, Bingham N, Parker K, Yao HH. Sex-specific roles of beta-catenin in mouse gonadal development. *Hum Mol Genet*. 2009;18(3):405-17.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

Luisi S, Florio P, Reis FM, Petraglia F. Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. *Hum Reprod Update*. 2005;11(2):123-35.

Mandel H, Shemer R, Borochowitz ZU, Okopnik M, Knopf C, Indelman M et al. SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *Am J Hum Genet*. 2008;82(1):39-47.

Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *Eur J Endocrinol*. 2001;145(5):561-71.

Micali G, Nasca MR, Innocenzi D, Frasin LA, Radi O, Parma P et al. Association of palmoplantar keratoderma, cutaneous squamous cell carcinoma, dental anomalies, and hypogenitalism in four siblings with 46,XX karyotype: A new syndrome. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53:S234-9.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.

Nakata S, Phillips E, Goidts V. Emerging role for leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors LGR5 and LGR4 in cancer stem cells. *Cancer Manag Res*. 2014;6:171-80.

Nam JS, Turcotte TJ, Yoon JK. Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. *Gene Expr Patterns*. 2007;7(3):306-12.

Ng A, Tan S, Singh G, Rizk P, Swathi Y, Tan TZ et al. Lgr5 marks stem/progenitor cells in ovary and tubal epithelia. *Nat Cell Biol.* 2014;16(8):745-57.

Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3812-4.

Okumura N, Nakamura T, Kay EP, Nakahara M, Kinoshita S, Koizumi N. R-spondin1 regulates cell proliferation of corneal endothelial cells via the Wnt3a/ β -catenin pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(10):6861-9.

Ottolenghi C, Omari S, Garcia-Ortiz JE, Uda M, Crisponi L, Forabosco A et al. Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum Mol Genet.* 2005;14(14):2053-62.

Ottolenghi C, Pelosi E, Tran J, Colombino M, Douglass E, Nedorezov T et al. Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum Mol Genet.* 2007;16(23):2795-804.

Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S et al. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet.* 2006;38(11):1304-9.

Peng WC, de Lau W, Forneris F, Granneman JC, Huch M, Clevers H et al. Structure of stem cell growth factor R-spondin 1 in complex with the ectodomain of its receptor LGR5. *Cell Rep.* 2013a;3(6):1885-92.

Peng WC, de Lau W, Madoori PK, Forneris F, Granneman JC, Clevers H, Gros P. Structures of Wnt-antagonist ZNRF3 and its complex with R-spondin 1 and implications for signaling. *PLoS One.* 2013b;8(12):e83110.

Radi O, Parma P, Imbeaud S, Nasca MR, Uccellatore F, Maraschio P et al. XX sex reversal, palmoplantar keratoderma, and predisposition to squamous cell carcinoma: genetic analysis in one family. *Am J Med Genet.* 2005; 138A(3):241-6.

Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res.* 2010;106(12):1798-806.

Refai O, Friedman A, Terry L, Jewett T, Pearlman A, Perle MA et al. De novo 12;17 translocation upstream of SOX9 resulting in 46,XX testicular disorder of sex development. *Am J Med Genet.* 2010;152A(2):422-6.

Rey R. Anti-Müllerian hormone in disorders of sex determination and differentiation. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005;49(1):26-36.

Ruffner H, Sprunger J, Charlat O, Leighton-Davies J, Grosshans B, Salathe A et al. R-Spondin potentiates Wnt/ β -catenin signaling through orphan receptors LGR4 and LGR5. *PLoS One.* 2012;7(7):e40976.

Schwarz JM, Rödelberger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods.* 2010;7(8):575-6.

Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends Genet.* 2009;25(1):19-29.

Shi, F, Kempfle, JS, Edge, AS. Wnt-responsive Lgr5-expressing stem cells are hair cell progenitors in the cochlea. *J Neurosci.* 2012;32(28):9639-48.

Smith CA, Shoemaker CM, Roeszler KN, Queen J, Crews D, Sinclair AH. Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BMC Dev Biol.* 2008;8:72.

Sutton E, Hughes J, White S, Sekido R, Tan J, Arboleda V et al. Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J Clin Invest*. 2011;121(1):328-41.

Svingen T, Koopman P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev*. 2013;27(22):2409-26.

Szkandera J, Herzog S, Pichler M, Stiegelbauer V, Stotz M, Schaberl-Moser R et al. LGR5 rs17109924 is a predictive genetic biomarker for time to recurrence in patients with colon cancer treated with 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *Pharmacogenomics J*. 2015 Feb 10 [Epub ahead of print].

Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43(Database issue):D447-52.

Takashima S, Kadowaki M, Aoyama K, Koyama M, Oshima T, Tomizuka K et al. The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *J Exp Med*. 2011;208(2):285-94.

Tischler G, Leonard S. biobambam: tools for read pair collation based algorithms on BAM files. *Source Code for Biology and Medicine*. 2014;9:13.

Tomaselli S, Megiorni F, De Bernardo C, Felici A, Marrocco G, Maggiulli G et al. Syndromic true hermaphroditism due to an R-spondin1 (RSPO1) homozygous mutation. *Hum Mutat*. 2008;29(2):220-26.

Tomaselli S, Megiorni F, Lin L, Mazzilli MC, Gerrelli D, Majore S et al. Human RSPO1/R-spondin1 is expressed during early ovary development and augments β -catenin signaling. *PloS One*. 2011;6(1):e16366.

Tomizuka K, Horikoshi K, Kitada R, Sugawara Y, Iba Y, Kojima A et al. R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum Mol Genet.* 2008;17(9):1278-91.

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.

Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature.* 1999;397(6718):405-9.

Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature.* 2013;494(7436):185-94.

Vernole P, Terrinoni A, Didona B, De Laurenzi V, Rossi P, Melino G et al. An SRY-negative XX male with Huriez syndrome. *Clin Genet.* 2000;57(1):61-6.

Vidal VP, Chaboissier MC, Rooij DG, Schedl A. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nature Genetics.* 2001;28(3):216-7.

Vilain EJ. 46,XX Testicular Disorder of Sex Development. [Updated 2009 May 26]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP. *Gene Reviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1416/>.

Wang D, Huang B, Zhang S, Yu X, Wu W, Wang X. Structural basis for R-spondin recognition by LGR4/5/6 receptors. *Genes Dev.* 2013;27(12):1339-44.

Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Research.* 2010;38(16):e164.

Weng J, Luo J, Cheng X, Jin C, Zhou X, Qu J et al. Deletion of G protein-coupled receptor 48 leads to ocular anterior segment dysgenesis (ASD) through down-regulation of Pitx. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(16):6081-6.

Wong VS, Yeung A, Schultz W, Brubaker PL. R-spondin-1 is a novel beta-cell growth factor and insulin secretagogue. *J Biol Chem*. 2010;285(28):21292-302.

Wong VS, Oh AH, Chassot AA, Chaboissier MC, Brubaker PL. R-spondin1 deficiency in mice improves glycaemic control in association with increased beta cell mass. *Diabetologia*. 2011;54(7):1726-34.

Xiao B, Ji X, Xing Y, Chen YW, Tao J. A rare case of 46, XX SRY-negative male with approximately 74-kb duplication in a region upstream of SOX9. *Eur J Med Genet*. 2013;56(12):695-8.

Xu K, Xu Y, Rajashankar KR, Robev D, Nikolov DB. Crystal structures of Lgr4 and its complex with R-spondin1. *Structure*. 2013;21(9):1683-89.

Zebisch M, Xu Y, Krastev C, MacDonald BT, Chen M, Gilbert RJ et al. Structural and molecular basis of ZNRF3/RNF43 transmembrane ubiquitin ligase inhibition by the Wnt agonist R-spondin. *Nat Commun*. 2013;4:2787.

Zhao J, de Vera J, Narushima S, Beck EX, Palencia S, Shinkawa P et al. R-spondin1, a novel intestinotrophic mitogen, ameliorates experimental colitis in mice. *Gastroenterology*. 2007;132(4):1331-43.

Zhao J, Kim KA, De Vera J, Palencia S, Wagle M, Abo A. R-Spondin1 protects mice from chemotherapy or radiation-induced oral mucositis through the canonical Wnt/beta-catenin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(7):2331-6.

Apêndice

Tabela 1 – Características das variantes selecionadas conforme os critérios descritos no corpo da tese após re-avaliação dos dados do estudo do exoma da família brasileira

Gene	MIM	RefSeq	Éxon	Consequência		dbSNP ID	MAF	
				DNA	Proteína		1000 Genomes	ExaC
RSPO1	609595	NM_001038633	6	c.G305A	p.C102Y	-	-	-
LGR5	606667	NM_003667.3	18	c.T1997C	p.V666A	rs17109924	0,071	0,075
ZNRF3	612062	NM_001206998	1	c.G73A	p.G25S	-	-	-
RSPO4	610573	NM_001029871	4	c.A455C	p.H152P	rs191521473	0,0006	0,003
FZD6	603409	NM_001164615	4	c.G1214A	p.R405Q	rs150760762	0.0062	0,002

MAF: *minor allele frequency*. – significa ausente

Tabela 2 – Genótipos das variantes encontradas nos indivíduos estudados na família brasileira por meio de exoma

Paciente [#]	Fenótipo	RSPO1	LGR5	ZNRF3	RSPO4	FZD6
		c.G305A ^a	rs17109924	c.G73A ^b	rs191521473	rs150760762
IV-32	Mulher XX	A/A	C/C	G/A*	A/C	GA
IV-11	Homem XX	A/A	T/T	G/G	A/A	GG
III-48	Homem XX	A/A	T/T	G/G	A/A	GG
III-19	Homem XX	A/A	T/T	G/G	A/A	GG
III-16	Homem XX	A/A	T/T	G/G	A/A	GG
III-13	Homem XY	A/A	T/T	G/G	A/A	GG
IV-9	Homem XY	A/A	T/T	G/G	A/A	GG
IV-10	Homem XY	A/A	T/T	G/G	A/A	GG
IV-33	Homem XY	A/A	C/C	G/G	A/C	GG
III-39	Pai de IV-32	G/A	T/C	G/G	A/C	GA
III-24	Mãe de IV-32	G/A	T/C	G/G	A/A	GG
IV-7	Irmã de IV-11	G/G	T/T	G/G	A/A	GG
II-10	Mulher não relacionada	G/G	T/T	G/G	A/A	GG

[#] Identificação conforme heredograma representado na Figura 3 da tese. RefSeq: a NM_001038633; b NM_001206998

* Variante não descrita, *de novo*

Figura 1 – *Coverage plot* do gene ZNRF3. Fonte: Exome Aggregation Consortium (ExAC), Cambridge, MA (URL: <http://exac.broadinstitute.org>) [Accessed: 8 July, 2015]