ALINE ZAMBONI MACHADO

**Pesquisa de mutações nos genes *FGF9* e *FGFR2*
em pacientes portadores de distúrbios do
desenvolvimento sexual 46,XY por anormalidades
no desenvolvimento gonadal**

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

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Dra. Sorahia Domenice

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Machado, Aline Zamboni

Pesquisa de mutações nos genes *FGF9* e *FGFR2* em pacientes portadores de distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY por anormalidades no desenvolvimento gonadal / Aline Zamboni Machado. -- São Paulo, 2012.

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

Orientadora: Sorahia Domenice.

Descritores: 1.Desenvolvimento sexual 2.Disgenesia gonadal 46,XY 3.Fator de crescimento 9 de fibroblasto 4.Receptor de fator de crescimento de fibroblasto tipo 2

USP/FM/DBD-137/12

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM - 42 da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Apoios: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): bolsa de mestrado cotas do Programa de Pós-graduação 138091/2009-9. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): bolsa de mestrado 08/55952-8. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): auxílio à pesquisa 483416/2009-6.

Dedico esta dissertação aos meus pais, Manoel e Valdecira, pelo eterno apoio em minhas conquistas.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela sabedoria e força que me ajuda a seguir em frente e almejar sempre mais.

Aos meus pais, Manoel e Valdecira por todo amor, carinho e apoio sempre ensinando e mostrando o caminho certo a seguir mesmo que esse seja mais longo e difícil. Agradeço aos meus irmãos, Ariane e Guilherme pelo entusiasmo que fazem minha família ser completa.

Ao meu namorado Caio, o amor da minha vida que com seu companheirismo me apoiou em todos os momentos bons e ruins sempre com paciência e positivismo.

À minha avó Teresa e meu avô Jesus (*in memoriam*) que sempre se interessaram pelos meus estudos. Agradeço a minha família, que são tantos, que escreveria outra dissertação para agradecer a todos.

Ao meu cunhado Gustavo, pelo entusiasmo com o trabalho e minhas idéias e pela ajuda com a estatística.

À minha orientadora, Dra Sorahia por todos os momentos de discussão profissional e pessoal e por ter proporcionado momentos de grande aprendizado.

À Dra Berenice, uma mentora exemplar pela qual tenho muito orgulho e agradeço por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa e confiado em meu trabalho.

À Mariza que me ajudou muito a me adaptar ao novo laboratório, por me tranquilizar em momentos de nervosismos e pelos diversos momentos de desabafo e ensinamentos.

À Mirian, por sua tranquilidade e disponibilidade para ajudar.

À Dra Elaine, Dr Ivo e Dra Cândida pelos conselhos, críticas e discussões.

À secretaria Nilda por me ajudar inúmera vezes frente às dificuldades burocráticas.

À Cris pelos momentos de descontração e rápida preparação de alíquotas. À Fran pela manutenção dos materiais sempre prontos para o uso. À Cidinha pela disponibilização e compra dos materiais.

Às minhas amigas Tamaya, Mari e Bia pelos momentos ótimos de descontração, de trocas de experiências pessoais e profissionais, pelo companheirismo o qual tive o prazer de vivenciar.

À Dra Alicia Belgorosky e Dr Marco Rivarola os quais permitiram o aprendizado em seu laboratório na Argentina. À Dra Esperanza Berenztein por toda atenção e dedicação em seus ensinamentos sobre a técnica de imunohistoquímica. Aos meus novos amigos argentinos, Any, Naty, Dani, July, Romi, Pablo, Roxi, Nora e Mathias que proporcionaram um ótimo ambiente de trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Centro Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Sociedade Latino-americana de Endocrinologia Pediátrica (SLEP) que proporcionou o apoio financeiro para o intercâmbio na Argentina.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 – Introdução	1
1.1 - Genes e organogênese da gônada indiferenciada.....	3
1.2 - Gene <i>FGF9</i>	9
1.3 - Gene <i>FGFR2</i>	15
2 – Objetivos.....	22
3 – Casuística e Métodos	24
3.1 - Casuística	25
3.1.1 - Critérios de seleção de pacientes.....	25
3.1.2 - Grupo de indivíduos controles	26
3.1.3 – Tecidos Gonadais	26
3.1.4 – Tecidos Gonadais Controles.....	27
3.2 - Avaliação Molecular	27
3.2.1 - Extração do DNA a partir de sangue periférico	27
3.2.2 - Amplificação de DNA genômico por reação de polimerização em cadeia (PCR)	28
3.2.3 - “Multiplex ligation-dependent probe amplification” (MLPA).....	33

3.2.4 - Estudo da variante alélica ENST00000358487: c.1358 C>T, p.Ser453Leu, por enzima de restrição	39
3.3 - Análise estatística	40
3.4 - Avaliação histológica dos tecidos gonadais	41
3.4.1 – Preparação de Hematoxilina e Eosina	41
3.4.2 - Ensaio de detecção de apoptose	42
3.4.3 - Ensaio de imunohistoquímica	43
4 – Resultados.....	45
4.1 - Variantes alélicas no gene <i>FGF9</i>	46
4.2 - Variantes alélicas no gene <i>FGFR2</i>	47
4.3 - Estudo de dosagem dos genes <i>FGF9</i> e <i>FGFR2</i> pela técnica de MLPA.....	56
4.4 - Estudo histológico dos tecidos gonadais.....	57
4.4.1 – Estudo histológico pela técnica de hematoxilina-eosina (H.E.).	57
4.4.2 – Ensaio para detecção de apoptose celular	58
4.4.3 – Ensaio para avaliação de proliferação celular	58
5 – Discussão	68
6 – Conclusões.....	82
7 – Anexos	85
8 – Referências.....	92

Lista de Abreviaturas

3'UTR	Região 3' não traduzida
ADCY2	Adenil ciclase tipo 2
AKT	Proteína quinase B
AMH	Hormônio anti-Mulleriano
ARE	Elementos ricos em ciclase e uridil
BMP7	Proteína morfogenética de osso 7
CBX2	“Chromobox homolog 2”
CGH	Hibridização genômica comparativa
CMA	Análise cromossomal por “microarray”
Cyp26b1	Citocromo P450, família 26, subfamília B, polipeptídeo 1
DAB	Cromógeno Diaminobenzidina
DAX1	Sexo reverso dosagem-sensitivo, região crítica de hipoplasia adrenal, gene 1
DAZ1	Gene deletado em azoospermia 1
DDS	Distúrbio do desenvolvimento sexual
DGC	Disgenesia gonadal completa
DGP	Disgenesia gonadal parcial
DMRT1	Fator de transcrição relacionado com “doublesex” e “mab-3”
Dnmt3L	DNA (citosina-5-)-metiltransferase tipo 3
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpc	Dias pós coito
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

dUTP	Deoxiuridina trifosfatase
ERK	Quinase reguladora de sinal extracelular
ER α	Receptor de estrógeno tipo alfa
ER β	Receptor de estrógeno tipo beta
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FGFR	Receptor dos fatores de crescimento de fibroblastos
FOG2	Proteína ligante a GATA 2
Fst	Folistatina
Ki-67	Antígeno marcador celular de proliferação
GATA4	Fator de transcrição que se liga a sequência de DNA “GATA”
KANK1	Domínios repetidos de “KN” e “ankyrin”
L-Pgds	Lipocalina- prostaglandina D2 sintetase
Lhx9	“LIM homeobox 9”
MAGEB	Antígeno B associado a melanoma
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MLPA	Amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (“multiplex ligation-dependent probe amplification”)
Nanos2	“Nanos homology 2”
NIH3T3	Células 3T3
NR5A1/SF1	Receptor nuclear subfamília 5, grupo A, membro 1/ Fator esteroideogênico 1
OCT3/4	Fator de transcrição octamero ligantes 3 e 4
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino

PCA	Persistência de canal arterial
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PLCy	Fosfolipase Cy
Pgd2	Prostaglandina D2 sintetase
PTCH1	“Patched 1”
RA	Ácido retinóico
RAF	Oncogene viral homólogo de leucemia murino v-raf-1
RNA	Ácido ribonucléico
RAS	Oncogene relacionado com tumores espontâneos de tireóide
RSPO1	Homólogo R-spondin <i>Xenopus laevis</i>
SOX2	“SRY –box 2”
SOX9	“SRY –box 9”
SRY	Região determinante do sexo no cromossomo Y
STRA8	Gene 8 homólogo estimulado por ácido retinóico
TCF21	Fator de transcrição 21
TdT	Deoxinucleotidil terminal transferase
WNT4	“wingless-type MMTV integration site family, member 4”
WT1	Gene supressor do Tumor de Wilms 1
ZEB2	Dedo de zinco E-box que se liga a homeobox 2

Lista de Figuras

Figura 1. Genes envolvidos no desenvolvimento divergente entre as gônadas XX e XY.....	5
Figura 2. Interações gênicas na determinação sexual de mamíferos.	9
Figura 3. Oposição de sinais regulando a determinação sexual na gônada bipotencial.....	12
Figura 4. FGF9 e Ácido Retinóico (RA- “retinoic acid”) agem antagonicamente na determinação do destino das células germinativas. ...	15
Figura 5. Isoformas do FGFR geradas a partir do “splicing” alternativo dos transcritos.	16
Figura 6. Padrão de eletroforese de <i>FGF9</i> em DNA de controle normal. ...	35
Figura 7. Padrão de eletroforese de P231 em DNA de controle normal.	36
Figura 8. Padrão de eletroforese de um controle positivo para a deleção de todas as sondas do <i>FGFR2</i>	36
Figura 9. Fórmulas utilizadas em planilhas Excel para análise do número de cópias das amostras de DNA.....	38
Figura 10. Eletroferogramas do seqüenciamento do exon 10 da paciente 12 DGP.	49

Figura 11. Eletroferogramas do seqüenciamento do exon 10 da paciente 13 DGP.	49
Figura 12. Eletroferogramas do seqüenciamento de amostras de DNA da mãe e do pai das paciente 12 e 13 DGP.	50
Figura 13. Representação da digestão enzimática do produto amplificado do exon 10 do gene <i>FGFR2</i> (221 pb) com a enzima de restrição “ <i>MseI</i> ”.	51
Figura 14. Os diferentes tipos de mutações nos receptores de fibroblastos e seus respectivos fenótipos.	53
Figura 15. Resultado obtido pelo site de predição da estrutura secundária da proteína “Predict Protein” do FGFR2 sem a alteração de Serina por Leucina na posição 453 sem alteração da estrutura secundária.	54
Figura 16. Resultado obtido pelo site de predição da estrutura secundária da proteína “Predict Protein” do FGFR2 com a alteração de Serina por Leucina na posição 453 com alteração da estrutura secundária.	54
Figura 17. Eletroferogramas do seqüenciamento de uma paciente e controle normal (CN) mostrando a substituição que resulta na variante alélica p.Met186Thr.	56
Figura 18. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo disgenético da Paciente 12 com coloração de hematoxilina e eosina.	60
Figura 19. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo disgenético da Paciente 13 com coloração de hematoxilina e eosina.	60

Figura 20. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo normal de um controle de 10 anos de idade com coloração de hematoxilina e eosina.	61
Figura 21. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo normal de um controle de 1 ano de idade com coloração de hematoxilina e eosina.	61
Figura 22. Imagens do ensaio de apoptose celular do testículo disgenético da Paciente 12 (“DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System”)	62
Figura 23. Imagens do ensaio de apoptose celular do testículo disgenético da Paciente 13 (“DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System”)	62
Figura 24. Imagens do ensaio de apoptose celular do testículo normal de um controle de 10 anos de idade (“DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System”).	63
Figura 25. Imagens do ensaio de apoptose celular do testículo normal de um controle de 1 ano de idade (“DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System”).....	63
Figura 26. Imagens do ensaio de proliferação celular (marcação com anticorpo Ki-67) do testículo disgenético da Paciente 12.	64
Figura 27. Imagens do ensaio de proliferação celular (marcação com anticorpo Ki-67) do testículo disgenético da Paciente 13.	64
Figura 28. Imagens do ensaio de proliferação celular (marcação com anticorpo Ki-67) do testículo normal do controle de 10 anos.	65

Figura 29. Imagens do ensaio de proliferação celular (marcação com anticorpo Ki-67) do testículo normal do controle de 1 ano.....	65
Figura 30. Imagens do ensaio de apoptose celular do testículo disgenético de um paciente com disgenesia gonadal mista (“DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System”).....	66
Figura 31. Imagens do ensaio de apoptose celular do testículo de um paciente com insensibilidade parcial aos andrógenos (“DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System”).....	66
Figura 32. Imagens do ensaio com o anticorpo OCT3/4 do testículo disgenético da Paciente 12.....	67
Figura 33. Imagens do ensaio com o anticorpo OCT3/4 do testículo disgenético da Paciente 13.....	67

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos específicos para amplificação dos exons do gene <i>FGF9</i>	30
Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos específicos para amplificação dos exons do gene <i>FGFR2</i>	30
Tabela 3. Sondas sintetizadas para a detecção de deleções e amplificações do gene <i>FGF9</i>	34
Tabela 4. Ensaio utilizado na avaliação de deleções ou amplificações do gene <i>FGFR2</i>	35
Tabela 5. Variantes alélicas encontradas no gene <i>FGF9</i>	46
Tabela 6. Distribuição alélica do microsatélite polimórfico da região 3'UTR do gene <i>FGF9</i>	47
Tabela 7. Detecção de homologia entre as sequências de aminoácidos entre os eucariotos.....	52
Tabela 8. Dados clínicos e hormonais dos pacientes com disgenesia gonadal completa 46,XY	86
Tabela 9. Genitais internos e exame anátomo-patológico dos pacientes com disgenesia gonadal completa 46,XY	87

Tabela 10. Dados clínicos e hormonais dos pacientes com disgenesia gonadal parcial 46,XY	88
---	----

Tabela 11. Genitais internos e exame anátomo-patológico dos pacientes com disgenesia gonadal parcial 46,XY	90
---	----

Machado AZ. *Pesquisa de mutações nos genes FGF9 e FGFR2 em pacientes portadores de distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY por anormalidades no desenvolvimento gonadal* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 100p.

Introdução: Várias evidências em estudos de animais “knockout” sugerem a efetiva participação dos genes *Fgf9-Fgfr2* no processo de determinação testicular. Animais XY “knockout” para os genes *Fgf9* e *Fgfr2* apresentam reversão sexual como consequência da alteração na cascata de eventos masculinizantes nas gônadas fetais. Até o momento, mutações inativadoras dos genes *FGF9-FGFR2* não foram descritas em pacientes 46, XY portadores de disgenesia gonadal. **Objetivos:** Pesquisar a presença de mutações inativadoras nos genes *FGF9* e *FGFR2* em pacientes portadores de DDS 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal. **Casuística e Métodos:** Trinta e três pacientes com disgenesia gonadal 46, XY, 11 com a forma completa e 22 com a forma parcial. As regiões codificadoras dos genes *FGF9* e *FGFR2* de todos os pacientes foram amplificadas e sequenciadas. As investigações quanto a presença de deleções foram realizadas usando-se a técnica de MLPA (“Multiplex ligation-dependent probe amplification”). **Resultados:** Mutações ou deleções nos genes *FGF9* não foram encontradas em nenhum dos pacientes estudados, apenas alguns polimorfismos previamente descritos. No gene *FGFR2* não foram encontradas deleções. Uma nova variante não sinônima em heterozigose, c.1358 C>T (p.Ser453Leu), localizada no exon 10 do *FGFR2* foi encontrada em duas irmãs com disgenesia gonadal parcial 46,XY. A mãe é portadora da variante alélica e o estudo de 147 indivíduos controles não identificou a presença desta variante. A análise da variante em sites de previsão, “PolyPhen”, “SIFT” e “Mutation Taster” indicou que a nova proteína FGFR2 é possivelmente danificada. **Conclusões:** Se esses resultados dos sites de previsão forem confirmados em estudos funcionais futuros a participação do gene *FGFR2* na determinação gonadal masculina em humanos estará comprovada.

Descritores: Desenvolvimento sexual, disgenesia gonadal 46,XY, fator de crescimento 9 de fibroblasto e receptor de fator de crescimento de fibroblasto tipo 2.

Machado AZ. *Search for mutations on FGF9 and FGFR2 genes in patients with 46,XY disorders of sexual development by gonadal abnormalities* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012. 100p.

Introduction: Several evidence in animal studies "knockout" suggest the effective participation of *Fgf9-Fgfr2* genes in testicular determination process. Animals XY "knockout" for *Fgf9* and *Fgfr2* genes exhibit sex reversal as a result of the change in the cascade of masculinizing events in fetal gonads. To date, So far inactivating mutations of *FGF9* and *FGFR2* genes have not been described in 46,XY patients with gonadal dysgenesis. **Objectives:** To investigate the presence of inactivating mutations in the *FGF9* and *FGFR2* gene in patients with 46,XY DSD by gonadal abnormalities. **Casuistic and Methods:** Thirty-three patients with 46,XY gonadal dysgenesis, 11 with the full form and 22 with the partial form. The coding regions of *FGF9* and *FGFR2* genes of all patients were amplified and sequenced. Investigations on the presence of deletions were made using the MLPA technique ("Multiplex ligation-dependent probe amplification"). **Results:** Mutations or deletions in the *FGF9* gene were not found in any of the patients studied, only a few polymorphisms previously described. *FGFR2* gene deletions were not found. A new non-synonymous variant in heterozygosis, c.1358 C> T (p.Ser453Leu) located in exon 10 of *FGFR2* was found in two sisters with 46,XY partial gonadal dysgenesis. The mother is a carrier of the variant allele and the study of 147 control subjects did not identify the presence of this variant. The analysis of the variant on prediction sites, "PolyPhen", "SIFT" and "Mutation Taster" indicated that the new FGFR2 protein is possibly damaged. **Conclusions:** If the results of the prediction sites are confirmed by future functional studies the participation of the FGFR2 gene in human male gonadal determination will be proven.

Descriptors: Sexual development, gonadal digenesis 46,XY, Fibroblast growth factor 9 and receptor fibroblast growth factor type 2.

1 – Introdução

Uma complexa cascata de genes localizados nos autossomos e cromossomos sexuais tem sido implicada nos processos de determinação e diferenciação sexual. A interação de genes, fatores transcricionais, hormônios e de receptores hormonais determina o desenvolvimento sexual normal em mamíferos.

Embora muitos dos eventos que participam do processo de determinação sexual não tenham sido elucidados, é indiscutível que o tecido gonadal é o responsável na vida fetal pela diferenciação das estruturas genitais. Os experimentos clássicos de Alfred Jost realizados em mamíferos na década de 70 estabeleceram que o desenvolvimento da gônada embrionária bipotencial para testículo ou ovário é o primeiro passo da determinação sexual em mamíferos, sendo o fenótipo sexual adulto consequência da presença ou da ausência de ação dos hormônios sintetizados pelas gônadas (1).

A gônada embrionária indiferenciada inicia seu desenvolvimento por volta da 5ª semana de vida fetal nos humanos (1). Nas semanas seguintes (6ª - 7ª semana) um “sinal” desencadeia a diferenciação de grupos celulares específicos no tecido gonadal bipotencial. Este tecido gonadal embrionário tem a capacidade de se desenvolver em dois órgãos com arquiteturas teciduais e funções especializadas extremamente diferentes como são o ovário e o testículo. O mesmo processo ocorre em camundongos, o modelo utilizado para estudos “in vivo” de determinação sexual em mamíferos.

A gônada embrionária normalmente desenvolve-se em testículo ou ovário, mas em alguns casos podem ocorrer anormalidades no processo de desenvolvimento gonadal gerando gônadas disgenéticas. Estas situações são classificadas como distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) por anormalidades no desenvolvimento gonadal. O termo distúrbio do desenvolvimento sexual (DDS) foi estabelecido em 2006 no Consenso Internacional sobre anomalias do desenvolvimento sexual, para definir as condições congênitas nas quais o desenvolvimento do sexo cromossômico, sexo gonadal ou do sexo anatômico é atípico (2, 3). Este Consenso estabeleceu uma nova nomenclatura e uma nova classificação dos DDS 46,XY que serão seguidas neste estudo.

1.1 - Genes e organogênese da gônada indiferenciada

A organização da prega urogenital durante a embriogênese é controlada por diversos genes que agem em sincronia. A análise do padrão temporal e topográfico da expressão dos genes *WT1* e *SF1* indicam o papel importante desses genes na preparação da gônada para a determinação sexual (4, 5). O *WT1* parece estar envolvido no desenvolvimento da crista urogenital garantindo a sobrevivência das células que a constituem e agindo a montante dos genes *SF1* e *DAX1*, dois membros da família dos receptores nucleares órfãos (6). O *SF1* prepara o ambiente para a expressão do *SRY* e age também auxiliando a expressão do *AMH* (gene que codifica a produção do hormônio anti-mülleriano), que é o primeiro marcador da diferenciação testicular. Posteriormente, na diferenciação sexual, o gene *SF1* regula a

produção de esteróides pela célula de Leydig, cujo desenvolvimento depende da presença da linhagem das células de Sertoli e de uma interação celular parácrina entre essas células.

Outros genes que afetam primariamente a determinação gonadal foram descritos em modelos de camundongos “knockout”; dentre eles, o *M33*, o *Lhx9*, o *Pod1* e o *Dmtr1*. Ratos com mutação no *Lhx9* ou no *M33* (equivalente humano *CBX2*) não apresentam desenvolvimento gonadal (7, 8). *Pod1* (equivalente humano *TCF21*) é um fator de transcrição relacionado à diferenciação de células glomerulares viscerais epiteliais (podócitos) em rins e pulmões (9). Em ratos com ausência deste fator, as gônadas de ambos os sexos são hipoplásicas e nas gônadas masculinas observa-se uma vascularização comprometida devido à formação defeituosa do vaso celômico e pela migração de um número reduzido de células endoteliais a partir dos mesonéfrons (10, 11). O *Dmrt1* é outro fator de transcrição cuja deleção origina testículos dismórficos em ratos (12) (Figura 1).

Figura 1. Genes envolvidos no desenvolvimento divergente entre as gônadas XX e XY.

Muitos fatores são requeridos entre 10.5-11.5 dias pós coito (dpc) para o desenvolvimento inicial da gônada bipotencial prevenindo a apoptose ou promovendo a proliferação celular (*Sf1*, *Wt1*, *Lhx9*, *M33*, *Emx2*, *Igf1r*). Entre 10.5-12.0 dpc, GATA4/FOG2 e WT1+KTS são requeridos para a ativação da expressão do *Sry* na gônada XY. A expressão de *Sry* induz a gônada XY para o desenvolvimento de testículos no qual a expressão de *Sox9*, *Fgf9* e *Dax1* são os passos iniciais para o desenvolvimento masculino. Já para o desenvolvimento inicial da gônada feminina estão bem caracterizados os genes *Wnt4* e *Fst*. Adaptado de Brennan J e Capel B (13).

Desde que as técnicas de análise cromossômica tornaram-se disponíveis, acumulam-se evidências da existência nos mamíferos de uma regulação da organogênese testicular pelo cromossomo Y.

A identificação do gene *SRY* no braço curto do cromossomo Y no início da década de 90 permitiu o esclarecimento de uma importante etapa no processo de determinação da gônada embrionária masculina (14). Esse

gene age como um indutor na determinação sexual masculina, iniciando uma cascata de interações gênicas que leva à formação dos testículos a partir da gônada fetal indiferenciada. Apesar do *SRY* ser um gene importante no processo da determinação gonadal masculina, atualmente outros genes têm assumido papéis de destaque nos eventos desta via (15).

Na gônada XY, o *Sry* é expresso nas células de suporte bipotenciais (células primordiais de Sertoli) nos dias embrionários 10.5 e 11.5 dpc e sua expressão caracteriza o início do processo de masculinização gonadal. O *Sry* define a determinação das células de Sertoli por ativação da transcrição do *Sox9* um fator transcricional autossômico relacionado ao *Sry* (13, 16). Uma vez que as células de Sertoli tenham se diferenciado, outros tipos de células bipotenciais da gônada como as células precursoras das células intersticiais (que darão origem às células de Leydig nos indivíduos XY) e as células germinativas são direcionadas para a via de diferenciação masculina (17).

Existem evidências de que as células de Sertoli interferem na diferenciação dos outros tipos celulares gonadais. A diferenciação das células de Leydig fetais, por exemplo, depende da sinalização parácrina da proteína extracelular “Desert Hedgehog”, que é secretada pelas células de Sertoli (18). Foi demonstrado em ratos que a diferenciação dos miócitos peritubulares e consequente formação do cordão testicular é regulada pelo *Dhh* (19). Além disso, foi sugerido que a sinalização do *Dhh* (em associação ao *Ptch1*) é um regulador positivo na diferenciação das células de Leydig

produtoras de esteróides nos testículos fetais (via regulação positiva do *Sf1*) (18).

Em humanos, mutações nos genes *SRY*, *SOX9*, *SF1*, *WT1* e *DHH* assim como duplicações do “locus” DSS (genes *DAX1-MAGEB*) ou dos genes *WNT4/RSPO-1* podem alterar a rede de balanceamento da expressão gênica, causando DDS 46,XY por anormalidades no desenvolvimento gonadal associados em diversos casos a quadros sindrômicos (16, 20-25). Além disso, a deleção do “locus” 26 do braço longo do cromossomo 10 está associado com malformações genitais, criptorquidia, micropênis e genitália ambígua ou feminina em pacientes XY (26). Existem dois casos de disgenesia gonadal 46,XY descritos com deleção neste “locus” (27).

Mutações no gene *RSPO1* em humanos estão associadas à hiperqueratose palmoplantar, DDS ovariotesticular em indivíduos XX e predisposição para o desenvolvimento de carcinoma nas células da pele. Até o momento nenhuma mutação neste gene foi identificada em casos de DDS ovotesticular 46,XX isolado (28, 29).

O gene *Rspo1* é expresso nas células somáticas ovarianas e regula a sinalização do *Wnt4*, que é crucial para a estabilização da atividade nuclear da β -catenina importante na determinação ovariana (30, 31). Em contraste, no embrião XY, a via de sinalização *Sry/Sox9* desempenha um papel supressor via Wnt- β -catenina ovariana (32) (Figura 2).

Camundongos que não expressam o gene *Rspo1* não expressam o *Wnt4* e o fenótipo gonadal dos camundongos que não expressam cada um desses genes é semelhante (33). As fêmeas que apresentam bloqueio

nessa via de sinalização possuem ovotestes, com a presença de cordões testiculares e células esteroidogênicas de Leydig funcionais (34, 35). Em humanos, a duplicação do cromossomo 1 compreendendo a região onde esses genes *WNT4* e *RSPO1* estão localizados, resulta em reversão sexual em indivíduos 46,XY confirmando sua função, enquanto mutações inativadoras do *RSPO1* são relacionadas a presença de ovotestis em pacientes XX (28, 36).

O papel do gene *Sox9* na via de masculinização da gônada indeterminada está bem estabelecido. O aumento da sua expressão tem sido considerado a causa da reversão sexual em animais 46,XX sem a presença do gene *Sry* (37). Huang e colaboradores descreveram um paciente com genitália ambígua cuja análise citogenética revelou o cariótipo 46,XX,dup(17)(q23.1q24.3)/46, XX . A presença do gene *SRY* foi descartada e a origem do desenvolvimento gonadal masculino neste paciente foi relacionada à presença de cópias extras do gene *SOX9* (38). Porém, em diversas famílias com vários membros portadores de DDS 46,XX por anormalidades do desenvolvimento gonadal *SRY* negativos o excesso de dosagem do gene *SOX9* não foi identificado (39, 40).

Figura 2. Interações gênicas na determinação sexual de mamíferos.

A sinalização da *Rspo1* envolve a estabilização da β -catenina que é a parte principal da via de sinalização feminina (esquerda). Ambas as sinalizações de *Rspo1* e *Wnt4*, parecem inibir a via masculina (direita) que é caracterizada pelas interações de uma alça de retro-controle positivo. O *Sry* é o fator decisivo na determinação sexual masculina. Interessantemente, as interações, regulando a formação da crista urogenital (linha tracejada oval), influenciam a expressão de *Sry*. Provavelmente *Sry*, *Sox9* e *Fgf9* inibem a via feminina. Adaptado de Piprek R P (41).

1.2 - Gene *FGF9*

O gene *FGF9* é um dos membros da família dos fatores de crescimento de fibroblasto, está localizado no cromossomo 13 na região 13q11-q12 e é constituído de 3 exons traduzindo uma proteína de 208 aminoácidos (42). Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) são conhecidos por representar um papel na proliferação e sobrevivência de diversos tipos celulares dentre eles, células neuronais (43-45), fibroblastos

(46); células do estroma endometrial (47) e como oncogene em fibroblastos NIH3T3 (48).

Recentemente um novo modelo de interação gênica foi proposto para explicar a participação dos genes *Sox9*, *Fgf9* e *Wnt4/Rspo1* na formação gonadal. O gene *Sox9* regula o gene *Fgf9* estimulando o aumento de sua expressão, e o *Fgf9* mantém a expressão do *Sox9*, constituindo uma alça de estímulo positivo nas gônadas XY. Nessa situação, o balanço entre os sinais *Fgf9* e *Wnt4* desvia-se em favor do *Fgf9*, estabelecendo o domínio da via masculina. Na ausência desta alça de retro-controle positivo entre *Sox9* e *Fgf9*, o *Wnt4* bloqueia a expressão do *Fgf9*, iniciando a via feminina (13).

Camundongos XY “knockout” para o *Sox9*, assim como aqueles “knockout” para o *Fgf9*, apresentam reversão sexual como uma consequência da inibição dos eventos masculinizantes do desenvolvimento da gônada (49-53).

Camundongos mutantes para *Fgf9* morrem precocemente após o nascimento por possuírem defeitos na formação dos pulmões, no entanto embriões XY quando analisados também apresentavam anormalidades no desenvolvimento gonadal semelhantes aos observados em pacientes portadores de disgenesia gonadal 46, XY (51).

O *Fgf9* é expresso em gônadas XX e XY em 11.5 dpc e começa a ser XY específico por volta de 12.5 dpc sendo expresso inteiramente nos cordões testiculares (53). A diferenciação testicular é interrompida em mutantes de *Fgf9* como resultado da deficiência de precursores de Sertoli para proliferação e diferenciação destas células (53) (Figura 3).

No estudo de Adams e McLaren (54) foi evidenciado que a enzima lipocalina -prostaglandina tipo D2 sintetase (L-Pgds), que tem como função a conversão de prostaglandina H2 em prostaglandina D2 (Pgd2), possuía a expressão masculina específica nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário. A Pgd2 tem um efeito masculinizante em culturas de gônadas XX, com formação de cordões testiculares e expressão de AMH. Assim, Moniot e colaboradores (55), verificaram que Pgd2 também atuava no aumento da expressão de Sox9 em camundongos. Nos estudos com camundongos XY “knockout” para *L-Pgds* observaram que a expressão de Sox9 era diminuída e possuíam uma localização subcelular aberrante. Assim, ficou demonstrado que a via *L-Pgds/Pgd2* age como uma segunda opção de amplificação da expressão de Sox9. Uma vez que a produção testicular de L-Pgds permite o acúmulo de Pgd2, esta passa a ativar a transcrição de Sox9. Este mecanismo age simultaneamente ao *Fgf9* na amplificação do sistema Sox9 e ativa a organogênese masculina (55).

Figura 3. Oposição de sinais regulando a determinação sexual na gônada bipotencial.

Em ambas as gônada, XX e XY, em 10.5-11.5 dpc transcritos de *Fgf9* (azul) são detectados próximos a superfície da gônada, enquanto que o *Wnt4* (rosa) é detectado próximo ao mesonefro. O *Sry* é ativado na gônada XY e sua expressão desvia a gônada XY para o desenvolvimento testículo específico. O *Sox9* é ativado pelo *Sry*, o qual manterá a via masculina específica. *Sox9* tem sua expressão aumentada pelo *Fgf9* (através do *Fgfr2*) que mantém a expressão de *Sox9* em uma alça de retro alimentação positiva em gônadas XY. Na ausência de *Sox9* e *Fgf9*, *Wnt4* diminui a expressão de *Fgf9* iniciando a diferenciação feminina da gônada. Adaptado de Cotton L M *et al.*(56).

Apesar das várias evidências da participação do gene *Fgf9* no processo de determinação gonadal masculina em animais até o momento

nenhuma mutação foi identificada no gene *FGF9* em pacientes portadores de DDS 46, XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal. Apenas polimorfismos foram descritos nesses pacientes (banco de dados “Ensembl”; www.ensembl.org). Apenas uma mutação foi descrita no gene *FGF9*, p.Ser99Asn, em 12 indivíduos de uma família chinesa que apresentava Síndrome de Sinostoses Múltiplas sem descrição de alterações nas genitálias (57).

Chen e colaboradores em 2007 estudaram a região codificadora e as regiões não traduzidas do *FGF9* e identificaram nessa última microssatélites que foram associados estatisticamente ao risco de DDS 46,XY (58). Neste trabalho eles demonstraram com estudo funcional que a repetição (TG)_n na região 3’UTR modulava a expressão gênica do *FGF9* pré e pós transcrição. O alelo (TG)₁₄, que estatisticamente relacionou-se a presença de DDS 46,XY mostrou uma maior modulação da atividade do promotor e estabilidade do RNA mensageiro (58). Neste trabalho, os pacientes estudados eram portadores de DDS 46,XY de várias etiologias e não exclusivamente os portadores de anomalias do desenvolvimento gonadal, o que pode comprometer a valorização destes resultados.

A regulação pós transcricional da expressão do *FGF9* foi estudada pelo mesmo grupo de pesquisadores, os quais identificaram elementos regulatórios chamados “Adenylate/uridylate-rich elements” (AREs) que estão presentes na região 3’UTR de alguns RNAs mensageiros. Estes elementos regulatórios estão relacionados com a regulação pós transcricional mediando uma rápida degradação do RNA. Um desses elementos “ARE” foi

identificado a 593-601 pb abaixo do códon de parada do gene *FGF9* e é um elemento altamente conservado entre as espécies. Como o FGF9 é um potente fator de crescimento e sobrevivência celular é provável que sua expressão seja controlada por muitos fatores como microssatélites e proteínas desestabilizadoras de RNA como as “AREs” (59).

Camundongos XY nulos para o gene *Fgf9*, mas não os camundongos XX, perdem suas células germinativas no 12.5 dpc, sugerindo um papel específico do *Fgf9* nas células germinativas masculinas (60). Os genes *Fgf9* e *Cyp26b1* são muito expressos em testículos, mas não em ovários. Nos testículos, *Cyp26b1* degrada o ácido retinóico assim o nível desse é baixo, enquanto o do *Fgf9* é aumentado. Já nos ovários ocorre o oposto, pois o ácido retinóico não será degradado pela ausência de *Cyp26b1* e, portanto o terá níveis elevados. Ambos, ácido retinóico e *Fgf9*, atuam nas células germinativas nas quais o primeiro, aumenta a expressão de *Stra8* e o segundo diminui sua expressão. Sabe-se que a expressão de *Stra8* é essencial para que as células germinativas femininas entrem em meiose. Dessa forma, o *Fgf9* age como um antagonista da expressão do *Stra8*, mantendo a expressão de marcadores de pluripotência como *Oct3* e *Sox2* para posterior indução da masculinização das células germinativas com a expressão de *Nanos2*, *Dnmt3L* e *P15* (61) (Figura 4).

Figura 4. FGF9 e Ácido Retinóico (RA- “retinoic acid”) agem antagonicamente na determinação do destino das células germinativas.

O destino das células germinativas é determinado por duas sinalizações provenientes das células somáticas, *Fgf9* e RA. *Cyp26b1* e *Fgf9* são altamente expressos nos testículos (azul), mas baixa expressão nos ovários (rosa). O *Cyp26b1* degrada o RA endógeno, níveis de RA baixos nos testículos enquanto *Fgf9* está alto. No ovário, RA não é degradado e *Fgf9* tem níveis baixos. *Fgf9* e RA ambos agem diretamente nas células germinativas (branco no centro da figura) aumentando a expressão de *Stra8* pelo RA ou prevenindo esse aumento pelo *Fgf9*. Adaptado de Bowles J *et al.*(61).

1.3 - Gene *FGFR2*

O gene do receptor do FGF do tipo 2 (*FGFR2*) possui 18 exons sendo que o exon 1 e grande parte do exon 18 não são traduzidos. Esse gene codifica uma proteína de 821 aminoácidos que pode sofrer “splicing” alternativo no RNA mensageiro permitindo que isoformas desses receptores possuam propriedades únicas para ligação com os FGFs (62, 63). As diferentes isoformas incluem um domínio extracelular formado por 2 ou 3 domínios “Ig-like” que apresentam variações no terceiro domínio e conferem a especificidade ligante-receptor de acordo com o “splicing” alternativo (Figura 5).

As isoformas do FGFR2 são denominadas isoformas IIIb e IIIc criadas a partir de um “splicing” alternativo entre os exons 8 e 9 que codificam o terceiro domínio imunoglobulina-like e essas isoformas possuem expressão tecido-específica (64) (Figura 5).

Figura 5. Isoformas do FGFR geradas a partir do “splicing” alternativo dos transcritos.

As duas isoformas do FGFR são geradas por “splicing” alternativo dos exons 8 e 9. Metade da região do domínio de Ig-like (C-terminal) é codificado pelo exon 8 para gerar a isoforma FGFR-IIIb enquanto a outra metade deste domínio é codificado pelo exon 9 gerando a isoforma FGFR-IIIc. Adaptado de Eswarakumar V P *et al.* (64).

No intuito de identificar o receptor de Fgf (Fgfr1-4) específico para a sinalização do *Fgf9* nas gônadas, estudos “in vitro” foram conduzidos e demonstraram a capacidade do *Fgf9* em se ligar aos 4 tipos de receptores (65). Posteriormente, estudos com gônadas embrionárias de camundongos XY no tempo 11.0 e 11.6 dpc mostraram por imunofluorescência que o Fgfr2 (e não outro receptor de Fgf) estava presente na membrana de células

proliferativas do epitélio celômico, que darão origem às células de Sertoli (53). Além disso, camundongos “knockout” para *Fgfr1* com 90% de inativação apresentam desenvolvimento testicular normal e camundongos “knockout” para *Fgfr3* e *Fgfr4* são férteis indicando que esses receptores não são solicitados para a determinação sexual ou agem redundantemente (66-68).

Apesar dos estudos sobre a especificidade dos ligantes FGFs aos seus receptores demonstrarem resultados controversos na literatura, demonstrou-se que no mesênquima são expressos os ligantes Fgf9, Fgf4, Fgf6 e Fgf8 ativando *Fgfr2-IIIc* e os ligantes Fgf7 e Fgf10 ativando a isoforma *Fgfr2-IIlb* (65, 69).

Por outro lado, a proteína *Fgfr2* é expressa nos núcleos das células de Sertoli em diferenciação em camundongos no tempo 11.5 dpc, coincidentemente com a elevada expressão da proteína Sox9 o que implica o gene *Fgfr2* no processo de determinação sexual (53).

Recentemente, estudos “in vivo” avaliando a participação do *Fgfr2* na determinação sexual foram realizados em camundongos mutantes condicionais para o *Fgfr2* (nos quais a perda de expressão do receptor de Fgf do tipo 2 está restrita ao epiblasto), uma vez que camundongos “knockout” para *Fgfr2* morrem precocemente antes da determinação sexual (70, 71). Bagheri-Fam e colaboradores em 2008 demonstraram que os embriões XY apresentavam um fenótipo da gônada similar aos camundongos “knockout” para *Fgf9* e que os camundongos XY duplo heterozigotos para *Fgfr2/Sox9* apresentavam reversão sexual.

Schmahl e colaboradores identificaram a presença do Fgfr2 no citoplasma e na membrana plasmática de células do epitélio celômico na superfície de ambas as gônadas XX e XY. Porém, a presença do Fgfr2 no núcleo celular foi encontrada exclusivamente nas células XY espalhadas no interior da gônada. Esse trabalho demonstrou também que a localização nuclear deste receptor iniciou-se no 11.0 dpc. Primeiramente, o Fgfr2 foi identificado apenas em algumas células no interior da gônada e progressivamente, com o desenvolvimento testicular, o número de células com Fgfr2 nuclear aumentou. Esse padrão de localização nuclear do Fgfr2 não foi observado em nenhum estágio do desenvolvimento das gônadas XX no período de 11.0- 12.5 dpc (53).

Na gônada embrionária XY selvagem a presença do *Fgf9* é detectada nas células precursoras de Sertoli utilizando-se técnicas de imunofluorescência. Nos experimentos de Bagheri-Fam e colaboradores não foi possível a detecção do receptor Fgfr2 nas gônadas embrionárias dos camundongos mutantes condicionais, indicando que Fgfr2 é de fato o receptor do Fgf9 (70).

As células germinativas residentes nas gônadas XY tornam-se dependentes da sinalização do *Fgf9/Fgfr2* entre 10.5 dpc e 11.5 dpc, que promove diretamente a sobrevivência dos gonócitos XY depois deste período, independentemente da diferenciação das células de Sertoli. Sendo assim, o *Fgf9* atua precocemente na regulação sexo-específica da sobrevivência das células germinativas (60).

Em humanos, estudos identificaram até o momento diversas mutações de ponto nos receptores de FGF do tipo 1, 2, 3 relacionadas a anormalidades no desenvolvimento esquelético e craniofacial (72, 73). No que diz respeito ao *FGFR2*, foram identificadas mutações “missense” em pacientes com anormalidades congênitas esqueléticas portadores das síndromes de Crouzon, Pfeiffer, Jackson –Weiss e Apert. No entanto, essas mutações relacionadas com o desenvolvimento de malformações esqueléticas, em sua maioria promovem um ganho de função resultando numa hiperativação do receptor (64).

Mutações somáticas “missense” no gene *FGFR2*, foram identificadas em alguns tipos de câncer dentre eles câncer de mama (74), câncer de próstata e câncer gástrico (64).

As diversas evidências experimentais da participação do gene *Fgf9* e do seu receptor *Fgfr2* no processo do desenvolvimento da gônada masculina, relatadas anteriormente, sugerem que a perda de função (inativação) deste gene (*Fgf9*) e/ou do gene que codifica o seu receptor (*Fgfr2*) promoveria anormalidades na dinâmica da determinação testicular gerando provavelmente gônadas disgenéticas. Esta hipótese é ratificada pela descrição de casos clínicos de pacientes portadores de DDS 46,XY com gônadas disgenéticas nos quais foram identificadas deleções no “locus” 26 do braço longo do cromossomo 10 (10q26) onde o gene do *FGFR2* está localizado.

O gene *FGFR2* está localizado próximo de regiões críticas para o desenvolvimento urinário e genital (10q26) como descrito originalmente por

Ogata T. e colaboradores em 2000 (26). A descrição destes pacientes portadores de anormalidades urogenitais com monossomia do cromossomo 10q26 sugere que a haplosuficiência de gene(s) contidos nesta região cromossômica seja responsável pelo desenvolvimento das alterações urológicas e genitais observadas (26). Estes pacientes não apresentavam alterações ósseas compatíveis com as síndromes crânio-esqueléticas nas quais mutações ativadoras do *FGFR2* são classicamente observadas.

Uma vez que a perda de função do *Fgfr2* foi relacionada a anomalias no desenvolvimento gonadal em modelos animais, propomos o *FGFR2* como um gene candidato para pesquisas de mutações inativadoras em pacientes com disgenesia gonadal 46 XY.

Recentemente 116 crianças com DDS 46,XY idiopático tiveram o seu genoma analisados e comparados com 8951 controles sem defeitos urogenitais pela metodologia CGH (“comparative genomic hybridization”) baseada em análise de “microarray” (CMA). Defeitos nas regiões 5p15.3, 9p24.3, 22q12.1 e Xq28 foram observadas e tiveram esses resultados apoiados nas sobreposições de rearranjos cromossômicos em várias crianças não relacionadas. Genes já relacionados com a determinação gonadal foram englobados na pesquisa como o *SRY* e o *DMRT1*, além de novos genes candidatos como: *FGFR2*, *KANK1*, *ADCY2* e *ZEB2*. Em relação ao gene *FGFR2* em particular, foi encontrado uma haploinsuficiência da região 10q em uma paciente XY com genitália ambígua e múltiplas anomalias congênitas (75).

Beleza-Meireles e colaboradores (76) sequenciaram os genes *FGFR2*, *FGF8*, *FGF10* e *BMP7* em pacientes com hipospádia baseados nos fenótipos dos animais “knockout” para esses genes. Apenas polimorfismos e uma variante alélica não sinônima no gene *FGFR2*, p.Met186Thr, que não altera a estrutura secundária da proteína foram identificados. Essa variante foi considerada um polimorfismo, apesar de ter sido identificada exclusivamente nos pacientes com hipospádia em comparação com 96 controles normais estudados. Os autores sugerem que os polimorfismos encontrados nos genes *FGF8* e *FGFR2* podem interferir com as respostas do receptor androgênico durante o desenvolvimento uretral no período fetal.

O papel dos genes *FGF9* e *FGFR2* no desenvolvimento testicular humano normal ainda não está estabelecido.

2 – *Objetivos*

Pesquisar a presença de mutações inativadoras nos genes *FGF9* e *FGFR2* em pacientes portadores de DDS 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal.

3 – *Casuística e Métodos*

Este estudo foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº 0692/09). Todos os pacientes ou seus responsáveis foram esclarecidos sobre o estudo e assinaram o Termo de Consentimento Pós-Informado autorizando sua participação.

Os estudos utilizando técnicas de biologia molecular foram desenvolvidos na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os estudos utilizando técnicas de histologia em tecido gonadal foram desenvolvidos na Unidade de Investigação em Endocrinologia do Hospital de Pediatria “Prof. Dr. Juan P. Garrahan”, Buenos Aires, Argentina.

3.1 - Casuística

3.1.1 - Critérios de seleção de pacientes

Trinta e três pacientes com diagnóstico de DDS 46,XY acompanhados no Ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento (Unidade A1MN 1003) da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram selecionados para o estudo. O diagnóstico de DDS 46,XY por anomalias do desenvolvimento gonadal baseou-se na avaliação clínica, hormonal, citogenética, radiológica e histológica (Tabelas

em Anexos). Alterações nos genes: *SRY*, *SF1*, *WNT4*, *DAX1*, *DMRT1*, *GATA4*, *WT1*, *DHH* foram excluídas nestes pacientes em estudos anteriores.

Os pacientes foram divididos nos subgrupos:

- **Disgenesia Gonadal XY – forma completa (DGC)- n= 11**
- **Disgenesia Gonadal XY – forma parcial (DGP)- n= 22**

3.1.2 - Grupo de indivíduos controles

Cento e cinco homens e quarenta e duas mulheres adultos normais foram selecionados para constituir o grupo controle para a análise de variantes alélicas e/ou numéricas identificadas nos estudo dos genes *FGF9* e *FGFR2*.

Um paciente portador de síndrome de deleção do 10q26 cujo diagnóstico foi realizado pelo estudo de citogenética convencional (cariótipo) constituiu o controle positivo na reação de MLPA para deleção do gene *FGFR2*. Este paciente foi diagnosticado como DDS 46,XY por alteração cromossômica. Ele apresentava ambigüidade genital (hipospádia mediopeniana, bolsa escrotal rasa e testículos posicionados no canal inguinal) e malformações múltiplas (ânus imperfurado, lábio leporino, persistência do canal arterial e retardo psicomotor).

3.1.3 – Tecidos Gonadais

Os tecidos gonadais que foram removidos durante o tratamento cirúrgico das pacientes 12 e 13, respectivamente aos 9 anos e 10 meses e 1 ano e 2 meses de idade cronológica foram estudados. Estes tecidos

estavam arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do HC e foram recuperados.

3.1.4 – Tecidos Gonadais Controles

Como controles normais dos estudos de imunohistoquímica foram usados tecidos testiculares obtidos em necrópsias realizadas no Hospital de Pediatria Garrahan, Buenos Aires, Argentina. Os doadores não apresentavam no histórico clínico relato de distúrbios gonadais e possuíam a mesma faixa etária dos pacientes em análise (1 ano e 10 anos). Lâminas do tecido testicular normal emblocado em parafina foram confeccionadas para a realização dos ensaios.

Tecido gonadal de um paciente portador de disgenesia gonadal mista (DGM) e de um paciente portador de síndrome de insensibilidade aos andrógenos, forma parcial (PAIS) foram submetidos aos mesmos procedimentos e os achados comparados aos resultados das pacientes e controles. A idade cronológica dos pacientes com DGP e CAIS no momento da gonadectomia era de 1 ano. O cariótipo do paciente com DGM era 45,X[9]/46,XY[16].

3.2 - Avaliação Molecular

3.2.1 - Extração do DNA a partir de sangue periférico

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos pacientes e familiares selecionados. Quinze mL de

sangue venoso foram colhidos em EDTA 25mM e submetidos ao método de extração com NaCl saturado (77). A primeira etapa da técnica é a lise de hemácias (114 mM de NH_4Cl , 1 mM de NH_4HCO_3) e a segunda etapa é a lise de leucócitos (100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH8, 1 mM de EDTA pH8) utilizando-se SDS (0,2%) e proteinase K (160 mg/mL). A precipitação do DNA foi realizada com etanol absoluto gelado seguida de lavagem com etanol 70% finalizando com suspensão em TE (10:0,1) (10 mM de Tris-HCl pH8, 0,1 mM de EDTA pH8) (78).

A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Alemanha) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Foi estabelecido que a relação acima de 1,75 entre esses dois comprimentos de onda seria a ideal para a caracterização da pureza do material (79).

3.2.2 - Amplificação de DNA genômico por reação de polimerização em cadeia (PCR)

As análises mutacionais dos genes *FGF9* e *FGFR2* foram realizadas pela amplificação do DNA genômico por reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando-se pares de oligonucleotídeos específicos (“primers”) localizados em regiões intrônicas.

Oligonucleotídeos específicos para os 3 exons do gene *FGF9* foram construídos a partir do site <http://frodo.wi.mi.edu> – “Primer3” (Tabela 1). Para triagem dos microssatélites polimórficos: $(\text{GA})_3(\text{AG})_2(\text{GA})_7$ e $(\text{TG})_3\text{TA}(\text{TG})_N\text{TA}(\text{TG})_3$, localizados a 932-1199 pb em relação ao local de

início da transcrição do *FGF9*, foi realizada a amplificação com os “primers” e condições já descritos por Chen e colaboradores (58).

Os oligonucleotídeos para os 18 exons traduzidos do gene *FGFR2* (2-19) (Tabela 2) foram construídos baseados no estudo de Mendoza S. *et al.*, 2005 e revisados utilizando a seqüência genômica do gene *FGFR2* do banco de dados “Ensembl” (www.ensembl.org/index.html) (80).

Todas as reações foram realizadas em um volume final de 25 µL utilizando-se 100-300 ng de DNA genômico, 200 µM de dNTPs, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, tampão de reação (50 mM KCl, 1,5 Mm MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 9) e 1 unidade de enzima “Taq” DNA polimerase (5 U/µL) (Promega Corporation, WI, EUA).

O protocolo básico de amplificação constituiu-se de um ciclo inicial de temperatura inicial de 94°C durante 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 96°C, temperatura variável dependendo do par de oligonucleotídeos utilizado (Tabela 1 e 2) e 72°C, durante 30 segundos para cada temperatura, mais um ciclo final de 72°C por 10 minutos, realizado em um termociclador (9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos específicos para amplificação dos exons do gene *FGF9*.

Exon	Oligonucleotídeos específicos	Produto (pb)	Temperatura de hibridação (°C)
1	F: 5'- TGTGTGAGTATAAAGTGGTGGTTTC-3' R: 5'- CAATTCCGGAGGCATTTTT-3'	749	59
2	F: 5'- AGTGGGGAGCTGGGCTTAGT-3' R: 5'- AGTGAAGGTGCAGAGCTGTTT-3'	736	57
3	F: 5'- GTAGGATGCGCAGGTTTGT-3' R: 5'- CAAAGTTTGGCAACAGTCGA-3'	497	59

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos específicos para amplificação dos exons do gene *FGFR2*.

Exon	Oligonucleotídeos específicos	Produto (pb)	Temperatura de hibridação (°C)
2	F: 5'-TCCACATGGAGATATGGAAGAGG-3' R: 5'-GCCCCCAGACAAATCCCAAAAC-3'	206	62
3	F: 5'-CTTCTCTCTCCACCTTTCTGCAG-3' R: 5'-AGCATAGTGCTGGCGGGCCAACTC-3'	322	69
4	F: 5'-GGTCTCAGTTGTAGATAATTGCAACC-3' R: 5'-GGGGACCATCGGAGCCGGGCAGT-3'	183	59
5	F: 5'-AGGGGAAGCTGTCCATCAGTA-3' R: 5'-GTAAGAAATGTGATGTTCAAGTAAGC-3'	263	58
6	F: 5'-GTGCTAGGATTGTTAAATAACCGCC-3'	214	65

	R: 5'-AAGAATGGGCTGGTATGCAGCC-3'		
7	F: 5'-CTCCTTTCTTCCCTCTCTCCA-3' R: 5'-GGAGACCCCAGTTGTGG-3'	259	55
8	F: 5'-CAATCATTCCTGTGTCTGTCTAGCC-3' R: 5'-CCCAGAGAGAAAGAACAG-3'	150	57
9	F: 5'-GACCTTCCTGGTTGGCCGTT-3' R: 5'-CTGCAGTCTCCCAAAGCACC-3'	278	59
10	F: 5'-ATGGCCTGCTTATCTGTTCTCC-3' R: 5'-CCACAAGCTGGCTGGGTCAT-3'	352	61
11	F: 5'-GGAGCCAGGATTACATCTGTG-3' R: 5'-CTGGGACATGGCCAAGAGAAGTAC-3'	221	64
12	F: 5'-CAGATGCTATGTGCTAATCCCCT-3' R: 5'-CGTGCCATGATAGAGTTCACATGC-3'	251	65
13	F: 5'-GTAGCTGCCCATGAGTTAGAGG-3' R: 5'-GGCGAATGCAGTTTTCTCTCC-3'	198	60
14	F: 5'-GGGAGCTTCTCTTCTTCTCA-3' R: 5'-CACCCAGCCAAGTAGAATGTG-3'	245	60
15	F: 5'-GTTCTGGCGGTGTTTTGAAATTAG-3' R: 5'-CCACTGTGTTACTGCCATCG-3'	202	60
16	F: 5'-CATAGCCCTATTGAGCCTGC-3' R: 5'-CAAGCCCAGGAAAAAGCCAGAG-3'	184	59
17	F: 5'-GATGGGTTAGTAATGCCGTGC-3' R: 5'-GCACCGGCAGGAAAGACAACA-3'	209	60
18	F: 5'-CTGACTATAACCACGTACCCAGTG-3' R: 5'-CAAGGACAAGGGGCTTCTAG-3'	199	61

19	F: 5'-CAGTCAGCCTCTCGAACCGT-3'		
	R: 5'-CTGTTTGGGGACAGGCAGAC-3'	273	59

O produto amplificado foi quantificado através de uma eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 1% em TAE (0,004 M Tris, ácido acético glacial, 0,001 M EDTA, pH 8) contendo brometo de etídio (Sigma, St Louis, MO, EUA) na concentração de 0,5 µg/mL de gel, utilizando –se como padrão de massa 500 ng do marcador de peso molecular ΦX174/HaeIII ou “DNA Mass Ladder” (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, EUA; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA).

Aproximadamente 30 ng deste produto amplificado foi submetido a uma reação de purificação enzimática com 10 U da enzima “ExoSAP-IT” (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 15 minutos a uma temperatura de 37°C, seguida por 15 minutos a 80°C para inativação da enzima. Após a purificação, o material foi submetido a uma reação de seqüenciamento utilizando o “kit” “ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Utilizou-se 20 ng do produto purificado, 1 µL de “BigDye Terminator”, 1 µL de tampão de seqüenciamento e 5 pmol de um dos “primers” específicos para cada exon (Tabelas 1 e 2) que foram submetidos a um protocolo no termociclador (9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por cinco segundos e 60°C por quatro minutos.

O produto da reação de seqüenciamento foi transferido para uma placa de 96 poços ("MicroAmp optical 96-well Reaction Plate", Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e precipitado de acordo com o protocolo de isopropanol/etanol (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Após o acréscimo de 15 µL de formamida ("Formamida Hi-Di", Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em cada poço da placa, esse produto foi submetido a uma eletroforese capilar no seqüenciador automático "ABI Prism 3100 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise foi realizada pelo programa "Sequencing Analysis" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

3.2.3 - "Multiplex ligation-dependent probe amplification" (MLPA)

A técnica de MLPA (81), um método de quantificação relativa de diferentes sequências de DNA por amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação numa mesma reação, foi utilizada na pesquisa de deleções dos genes *FGF9* e *FGFR2*.

O gene *FGF9* não possui um ensaio comercial disponível e por isso foi desenhado um conjunto de sondas específicas para a dosagem dos três exons do gene de acordo com as instruções do fabricante ("Designing synthetic MLPA probes", MRC- Holland Amsterdam, Holanda); as sondas controles utilizadas foram sintetizadas conforme o artigo de Barbaro *et al.* de 2009 (82) (Tabela 3).

Tabela 3. Sondas sintetizadas para a detecção de deleções e amplificações do gene *FGF9*.

Sonda	Tamanho (pb)	Sonda 5 ^a	Sonda 3 ^b	Chr
GABRA*	84	CAGCCTGTTGTCATAACCATC G	AGCAAAGTGTCCAGGATG CG	4p12
FGF9- Exon2	94	CTCCCTTAGGTGAAGTTGGG AACTATTTCGGTGTG	CAGGATGCGGTACCGTTT GGGAAT	13q11-q12
FGF9- Exon 1	101	AGTGGACTCTACCTCGGGAT GAATGAGA	AGGGGGAGCTGTATGGAT CAGTAA	13q11-q12
FGF9- Exon 3	112	ACCTATATAAGCACGTGGACA CTGGAAGGCGATAC	TATGTTGCATTAAATAAAG ATGGGACCCCGAGAGA	13q11-q12
MPDZ*	123	GTGATCCAGTACTTGATCTGC ATATGTCTCTGGAGGACT	ATATACCCAGAATCTCCTG CAAAGACAGGATGAGAAT ACAC	9p23
RB1*	129	GTCACCAATACCTCACATTCC TCGAAGCCCTTACAAGTTTCC TT	AGTTCACCCTTACGGATTC CTGGAGGAACATCTATATT TCACC	13q14.2
UHRF2*	132	GTACGAGAGAATGTACTATTG TCCCTTCTAATCATTATGGAC CCATTC	CTGGTATTCTGTTGGATC AACTTGGAGATTTAGAGTT CAGG	9p24.1

^aA sonda 5´sempre será precedida por um “primer” universal aderido a sequência: GGGTTCCTAAGGGTTGGA.

^bA sonda 3´sempre será seguida por um “primer” universal aderido a sequência: TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC e possuem a sua extremidade 5´ fosforilada.

*Sondas controles.

Figura 6. Padrão de eletroforese de *FGF9* em DNA de controle normal.

A pesquisa de deleções ou amplificações do gene *FGFR2* foi investigada utilizando-se um ensaio comercial “Salsa MLPA Kit P231FGF10-FGFR2” (MRC- Holland Amsterdam, Holanda) (Tabela 4). Neste ensaio comercial há sondas para os genes *FGFR2* e *FGF10* geralmente utilizado na identificação de deleções para pacientes portadores da doença autossômica de lacrimoauriculodentodigital (LADD).

Tabela 4. Ensaio utilizado na avaliação de deleções ou amplificações do gene *FGFR2*.

Ensaio	Genes ou Sondas Controles	“locus”	Quantidade de Sondas	Tamanho dos Produtos Amplificados (pb)
P231 FGF10- FGFR2	FGF10	5p13	8	
	FGFR2	10q26	9*	136 a 382
	Sondas Controles	-	18	

*Há mais uma sonda específica para uma deleção já conhecida 3-pb Del, 1947 AGA encontrada somente em pacientes com lacrimoauriculodentodigital (LADD).

Nas figuras 7 e 8 estão representados os padrões de eletroforese do ensaio P231 para um DNA de controle normal e para um controle positivo para a deleção de todas as sonda do *FGFR2*, respectivamente. Na figura 8 está representado o padrão de eletroforese das sondas sintetizadas para o gene *FGF9*.

Figura 7. Padrão de eletroforese de P231 em DNA de controle normal.

Figura 8. Padrão de eletroforese de um controle positivo para a deleção de todas as sondas do *FGFR2*.

As setas indicam as sondas deletadas e os respectivos exons.

Cerca de 100 ng de DNA genômico dos pacientes e dos controles foram diluídos em água ultrapura num volume final de 5 μ L. Os tubos com o DNA diluído foram incubados em termociclador (9700 Applied Biosystems,

Foster City, CA, EUA) por 5 minutos a 98°C para a desnaturação do DNA. A temperatura foi diminuída para 25°C e foram acrescentados os 3 µL do “mix” de sondas, preparado a partir de 1,5 µL do “Salsa Probe mix” e 1,5 µL do Tampão MLPA. Essa mistura foi submetida a uma temperatura de 95°C por um minuto, seguida por 16 horas a 60°C, para que as sondas hibridassem aos seus respectivos alvos.

Após a hibridação, a temperatura foi reduzida para 54°C e foram adicionados em cada tubo 32 µL do “mix” Ligase-65 (3 µL Tampão Ligase-65 A, 3 µL Tampão Ligase-65 B, 1 µL da Ligase-65 e 25 µL de água ultrapura). As amostras foram incubadas a 54°C por 15 minutos para que a ligação das sondas previamente hibridadas pudessem ocorrer e em seguida foi realizada a inativação das enzimas remanescentes pelo aumento de temperatura da reação para 98°C por cinco minutos.

Dez µL do produto de ligação foram transferidos para um novo tubo contendo 30 µL do “mix” PCR (4 µL Tampão Salsa PCR e 26 µL de água ultrapura). Os tubos foram colocados no termociclador a 60°C e mantidos nessa temperatura enquanto foram adicionados 10 µL do “mix” polimerase (2 µL Salsa PCR “primers”, 2 µL Tampão Salsa enzyme dilution, 0,5 µL da enzima Salsa polimerase e 5,5 µL de água ultrapura). Nessa etapa, se iniciou a reação de amplificação por PCR das sondas ligadas. O protocolo de amplificação consistiu em 35 ciclos de 95°C, temperatura de hibridação dos “primers” de 60°C e 72°C, durante 30 segundos para cada temperatura, mais um ciclo final de extensão a 72°C por 20 minutos.

Estas amostras amplificadas foram submetidas a uma eletroforese capilar no seqüenciador automático "ABI Prism 310 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e analisadas pelo programa de análise de fragmentos "GeneScan" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que determina o tamanho de cada fragmento e sua correspondente altura e área do pico no eletroferograma.

O conjunto de dados de altura dos picos de cada amostra foi transferido para uma planilha Excel (Microsoft Corporation, Redmon, WA, EUA). Em cada ensaio foram utilizados no mínimo dois controles que tiveram seus DNAs extraídos pela mesma metodologia das amostras analisadas. Inicialmente, a média da altura dos picos de cada sonda dos controles da reação foi determinada. Posteriormente, para cada amostra foi calculada a média das proporções (P_n) de cada sonda. O valor obtido desta média (média das proporções) é o número de cópias estimado de cada sonda (Figura 9).

$$P_n = \frac{(\text{Altura da sonda analisada} / \text{Altura da sonda controle})_{n^{\text{amostra}}}}{(\text{Altura da sonda analisada} / \text{Altura da sonda controle})_{n^{\text{média dos controles}}}}$$

$$\text{Média das proporções} = \frac{P_1 + P_2 + P_3 + \dots + P_n}{n}$$

$n = \text{número de sondas controles}$

Figura 9. Fórmulas utilizadas em planilhas Excel para análise do número de cópias das amostras de DNA.

Uma determinada região analisada foi considerada normal quando a média das proporções esteve entre 0,7 e 1,3; com diminuição do número de cópias quando fosse inferior a 0,7 e com aumento do número de cópias quando fosse superior a 1,3. Um ensaio foi considerado válido somente quando as amostras se apresentavam diplóides para as sondas controles. Todas as exceções em que foram detectadas alterações no número de cópias dos genes em estudo foram repetidas para fins de confirmação.

3.2.4 - Estudo da variante alélica ENST00000358487: c.1358 C>T, p.Ser453Leu, por enzima de restrição

A fim de verificar a frequência da variante alélica (c.1358 C>T), encontrada no exon 10 do gene *FGFR2* em 2 irmãs portadoras de DGP (Pacientes 12 e 13), na população foi realizado um estudo de 294 alelos normais com a enzima de restrição “*MseI*” (New England, Biolabs Inc., Ipswich, MA, EUA).

O fragmento do exon 10 do *FGFR2* foi amplificado nas amostras de DNA de 147 indivíduos controles normais a partir do mesmo protocolo utilizado para o sequenciamento do gene. Cerca de 100 ng do produto amplificado foi incubado por 16 horas a 37°C com 2 U da enzima de restrição “*MseI*”, 100 µg/mL BSA e “NEBuffer 4” em um volume final de 10 µL.

Após a digestão, o produto foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 2% em TAE (0,004 M Tris,

ácido acético glacial, 0,001 M EDTA, pH 8) contendo brometo de etídio (Sigma, St Louis, MO, EUA) na concentração de 0,5 µg/mL de gel, utilizando-se como padrão de massa 500 ng do marcador de peso molecular ΦX174/HaeIII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, EUA; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA).

Nos indivíduos sem a variante alélica c.1358 C>T, p.Ser453Leu o fragmento amplificado de 221 pb não é digerido. Já nos indivíduos que possuem a variante alélica cria-se o sítio de restrição e o fragmento é digerido em dois fragmentos com tamanhos de 111 pb e 110 pb. Devido ao tamanho muito semelhante estes fragmentos (111 e 110pb) são visualizados no gel de agarose como uma banda única de aproximadamente 110 pb. Os indivíduos heterozigotos para a variante apresentam dois fragmentos um de 221 pb e outro de 110 pb.

3.3 - Análise estatística

A análise estatística do microssatélite na região 3'UTR foi realizada por teste do Qui-quadrado para amostras categóricas, como apropriado. O valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa "SigmaStat" para Windows (version 2.03; SPSS, Inc., San Rafael, CA, USA).

3.4 - Avaliação histológica dos tecidos gonadais

As lâminas dos tecidos gonadais das pacientes 12 e 13 com disgenesia gonadal parcial 46,XY, portadoras da variante alélica c.1358C>T, p.Ser453Leu, foram coradas pelo método de hematoxilina-eosina e revistas pela patologista Profa Dra Filomena Marino Carvalho da Disciplina de Patologia da FMUSP.

Este material foi também submetido a ensaios para avaliação do índice de apoptose celular (células de Sertoli, células de Leydig e células germinativas) e técnica de imunohistoquímica para avaliação de proliferação das células testiculares (células de Sertoli, células de Leydig e células germinativas).

3.4.1 – Preparação de Hematoxilina e Eosina

Depois de desparafinar e hidratar os cortes corou-se com hematoxilina durante 2 a 10 minutos. Depois lavou-se as lâminas em água corrente por 10 minutos. Logo após, corou-se com eosina por 2 minutos e novamente lavou-se em água corrente. Após esta etapa as lâminas foram desidratadas (seguindo uma incubação crescente dos seguintes alcoóis: 70%, 85%, 96%, 100% e tolueno 100%) e montadas com Bálsamo do Canadá sintético (Biopack- n 2000130300) e lamínulas para preservação das amostras. Assim, podemos diferenciar partes basófilas pela hematoxilina e as acidófilas, ou eosinófilas pela eosina.

3.4.2 - Ensaios de detecção de apoptose

A detecção de apoptose nas células testiculares foi realizada usando o “kit” “DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System” (Promega Corp., Madison, WI). Este ensaio consiste na incorporação de nucleotídeos biotinilados na extremidade 3’OH do DNA, ou seja, marcação das terminações de DNA fragmentado de células apoptóticas utilizando-se da enzima deoxinucleotidil transferase (TdT). A peroxidase marcada com streptavidina resalta esses nucleotídeos biotinilados. Esta peroxidase é detectada usando o substrato, peróxido de hidrogênio e o cromógeno estável diaminobenzidina (DAB). Com esse procedimento, o núcleo apoptótico é corado de marrom escuro.

Primeiramente, as lâminas contendo os tecidos foram desparafinadas com soluções de tolueno 100% “overnight” a 42°C, rehidratadas com álcool etílico 100% e água deionizada seguida de fixação em solução de paraformaldeído 4% em PBS. O tratamento com a proteinase K (20µg/mL) foi de 20 minutos seguida por uma segunda fixação em paraformaldeído 4% em PBS. Cem microlitros de mistura de reação de TdT consistindo em: tampão de equilíbrio, nucleotídeo biotinilado e enzima TdT, de acordo com as recomendações do fabricante, foram colocados sobre cada tecido o qual foi deixada a 37°C por uma hora em câmara úmida. Após a reação, as lâminas foram lavadas por pelo menos duas vezes, primeiramente com o tampão SSC 1X (“DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System”, Promega, código G7130) seguido de uma lavagem com PBS adicionado de 0,1% de TritonX-100 e 5mg/mL de BSA. Essas lâminas foram então imersas em 0,3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos, para bloqueio de peroxidases

endógenas. Logo após foram incubadas por 30 minutos em solução de streptavidina-HRP em câmara úmida. Finalmente, foi adicionado 100µL de solução de DAB sobre cada tecido e incubado por pelo menos 10 minutos até aparecer à cor marrom da reação. As lâminas foram também coradas com hematoxilina, e posteriormente desidratadas (seguindo uma incubação crescente dos seguintes alcoóis: 70%, 85%, 96%, 100% e tolueno 100%) e montadas com Bálsamo do Canadá sintético (Biopack-n 2000130300) e lamínulas para preservação das amostras.

Um controle positivo para a detecção de fragmentação de DNA foi incluído em cada experimento, adicionando-se solução de deoxiribonuclease I (1µg/mL) e incubado por 15 minutos a 37°C, previamente a reação com TdT. Um controle negativo também foi realizado o qual não foi adicionado enzima TdT. Os resultados foram posteriormente avaliados em microscópio óptico.

3.4.3 - Ensaios de imunohistoquímica

Os tecidos gonadais fixados nas lâminas foram desparafinados e rehidratados como citado anteriormente. Para que o antígeno não fique mascarado e acabe resultando em uma marcação diminuída as lâminas são imersas em solução de citrato de sódio 1M e aquecidas de 95 a 99°C por 20 minutos. Para permeabilizar os tecidos, o mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado com a proteinase K. O protocolo de marcação consistiu em peróxido de hidrogênio por 30 minutos a temperatura ambiente para o bloqueio de peroxidases endógenas. Logo após foi adicionada a proteína bloqueante (CSA- DAKO Corp., código K1500) por 30 minutos a

temperatura ambiente seguida da incubação com anticorpo primário e/ou controle negativo da reação, “overnight” a 4°C. Para o ensaio de detecção de proliferação celular foi utilizado o anticorpo monoclonal de rato anti-Ki-67 (DAKO Corp., Clone Ki-S5, código Nº 7187) na diluição de 1/100 de uma solução de 80mg/L. e para a detecção de OCT3/4 foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-OCT3/4 (Santa Cruz Biothecnology Inc., SC-5279) na diluição de 1/50 de uma solução 200µg/mL. Em seguida houve a incubação do anticorpo secundário na mesma diluição do anticorpo de interesse, por 15 minutos em temperatura ambiente. Após esta etapa de incubação com os anticorpos, foi adicionado conjugado de streptavidina com biotina seguida do reativo de amplificação (CSA- DAKO Corp., código K1500) e estreptavidina conjugada com peroxidase os quais foram mantidos por 15 minutos em temperatura ambiente cada passo. Em sequencia, o DAB foi adicionado e a reação foi mantida por 5 a 10 minutos dependendo do tempo de reação em que a mudança da cor foi verificada. As lâminas foram também coradas com hematoxilina, e posteriormente desidratadas e montadas como descrito anteriormente.

4 – Resultados

4.1 - Variantes alélicas no gene *FGF9*

A pesquisa de mutações no gene *FGF9* neste grupo de pacientes portadores de DDS 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal identificou 9 variantes alélicas, todas já descritas na literatura (Tabela 5). Nenhuma variante alélica não sinônima foi encontrada.

Tabela 5. Variantes alélicas encontradas no gene *FGF9*.

Posição das Variantes alélicas	Porcentagem nos Pacientes DDS XY estudados (n=33)	Referência das Variantes
c.-125_-124 ins TT	27,27%	rs 35931146
c.-124 ins T	39,39%	
c.278-28 T>C	18,18%	rs 17070202
c.278 -14 C>T	45,45%	rs 3818460
c.309C>T (G103G)	3,03%	rs 17070218
c.327 C>T (G109G)	27,27%	rs 34748315
c.381 +17C>T	21,21%	rs 2274296
c.447 A>G (S149S)	75,75%	rs 9509841
c.*9G>A	96,96%	rs 9509842
Sequência referência do transcrito NM_002010.2/ ENST00000382353 (www.ncbi.nlm.nih.gov / www.ensembl.org).		

O microssatélite na região 3'UTR analisado é composto por duas repetições: (GA)₃(AG)₂(GA)₇ e (TG)₃TA(TG)_nTA(TG)₃. A primeira sequência repetitiva não foi polimórfica em nossa coorte de pacientes. Na outra sequência foram encontrados seis diferentes alelos (TG)₁₃₋₁₈ (c.*275TG_n). A

análise da distribuição dos alelos polimórficos entre pacientes com DDS 46,XY e controles normais masculinos encontra-se na Tabela 6.

Tabela 6. Distribuição alélica do microssatelite polimórfico da região 3'UTR do gene *FGF9*.

Alelo	Pacientes (n= 33)	Grupo controle (n= 89)	Qui-quadrado	P valor
(TG) ₁₃	0	4	0,436	0,509
(TG) ₁₄	28	83	0,195	0,659
(TG) ₁₅	30	86	0,064	0,800
(TG) ₁₆	4	4	1,169	0,280
(TG) ₁₇	3	1	2,590	0,108
(TG) ₁₈	1	0	0,268	0,605

4.2 - Variantes alélicas no gene *FGFR2*

O estudo de mutações no gene *FGFR2* neste grupo de pacientes portadores de DDS 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal identificou variantes alélicas não sinônimas (p.Ser453Leu) e sinônimas (p.Tyr345Tyr) ainda não descritas na literatura. O transcrito ENST00000358487 (www.ensembl.org) foi utilizado como sequência referência para esta avaliação.

As variantes alélicas identificadas no *FGFR2* não descritas previamente na literatura foram:

1- No exon 9 do gene *FGFR2*, foi identificada uma troca de base em heterozigose c.1035 T>C em um paciente com DGP 46,XY. Esta variante

alélica não acarreta troca de aminoácido na posição 345 (tirosina, Tyr ou Y), correspondendo a uma variante alélica silenciosa.

2- No exon 10 do gene *FGFR2*, foi identificada uma nova variante alélica em heterozigose em 2 irmãs (pacientes 12 e 13) portadoras de DGP 46,XY. A troca de base c.1358 C>T corresponde à substituição UCA (serina, Ser ou S) na posição 453 da proteína, pelo códon UUA (leucina, Leu ou L) (Figura 10 e 11).

A análise do DNA dos pais dessas pacientes identificou a presença da mesma variante em heterozigose na mãe (Figura12).

A frequência desta variante alélica na população foi avaliada estudando-se 147 indivíduos normais com a enzima de restrição “*MseI*” (New England, Biolabs Inc., Ipswich, MA, EUA) (Figura 13). Não foi identificada essa variante em nenhum dos 294 alelos analisados.

Figura 10. Eletroferogramas do seqüenciamento do exon 10 da paciente 12 DGP.

A– Eletroferograma do seqüenciamento da paciente 12 DGP mostrando a substituição, em heterozigose, de uma citosina por uma timina no segundo nucleotídeo do códon 453 do exon 10, que resulta na variante alélica p.Ser453Leu. **B**– Eletroferograma do seqüenciamento de um controle normal (CN).

Figura 11. Eletroferogramas do seqüenciamento do exon 10 da paciente 13 DGP.

A– Eletroferograma do seqüenciamento da paciente 13 DGP mostrando a substituição, em heterozigose, de uma citosina por uma timina no segundo nucleotídeo do códon 453 do exon 10, que resulta na variante alélica p.Ser453Leu. **B**– Eletroferograma do seqüenciamento de um controle normal (CN).

Figura 12. Eletroferogramas do seqüenciamento de amostras de DNA da mãe e do pai das paciente 12 e 13 DGP.

A – Eletroferograma do seqüenciamento da mãe das paciente 12 e 13 mostrando a substituição, em heterozigose, de uma citosina por uma timina no segundo nucleotídeo do códon 453 do exon 10, que resulta na variante alélica p.Ser453Leu. **B**- Eletroferograma do seqüenciamento do pai das pacientes 12 e 13 mostrando que não há a substituição.

Figura 13. Representação da digestão enzimática do produto amplificado do exon 10 do gene *FGFR2* (221 pb) com a enzima de restrição “*MseI*”.

Obteve-se dois fragmentos de 110 pb e 221 pb nos portadores da troca nucleotídica C>T (1: mãe das pacientes 12 e 13; 3: paciente 12; 4: paciente 13). Na ausência da variante alélica observa-se a presença de um único fragmento de 221 pb (2: pai das pacientes 12 e 13; CN 1 e CN2: controles normais 1 e 2), M: marcador de peso molecular Φ X 174.

Para avaliar o efeito dessa variante alélica do exon 10 do *FGFR2* foram utilizados os “sites” de predição “PolyPhen” (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>), “Sift” (<http://sift.jcvi.org/>) e “Mutation Taster” (www.mutationtaster.org). As comparações da sequência alterada com o banco de sequências dos “sites” mostraram que essa substituição de serina por leucina provavelmente acarreta uma mudança prejudicial na estrutura da proteína. De acordo com o “HomoloGene” do “site” do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) essa mudança de aminoácido ocorreu em uma região conservada (representada em amarelo) da proteína entre a maioria das espécies (Tabela 7).

Tabela 7. Detecção de homologia entre as sequências de aminoácidos entre os eucariotos.

Espécies	Alinhamento dos aminoácidos	Referência da Sequência
<i>H. sapiens</i>	PLVRITTRLSS ^S TADT-----PMLAGVSEYELPEDPKWEFPRDKL	NP_000132.3
<i>P. troglodytes</i>	PLVRITTRLSS ^S TADT-----PMLAGVSEYELPEDPKWEFPRDKL	XP_001157227.1
<i>C. familiaris</i>	PLVRITTRLSS ^S TADT-----PMLAGVSEYELPEDPKWEFPRDKL	NP_001003336.1
<i>B. taurus</i>	PLVRITTRLSS ^S TADT-----PMLAGVSEYELPEDPKWEFPRDKL	XP_001789758.1
<i>M. musculus</i>	PLVRITTRLSS ^S TADT-----PMLAGVSEYELPEDPKWEFPRDKL	NP_034337.2
<i>R. norvegicus</i>	PLVRITTRLSS ^S TADT-----PMLAGVSEYELPEDPKWEFPRDKL	XP_341941.3
<i>G. gallus</i>	PLVRITTRLSS ^S TADA-----PMLAGVSEYELPEDPKWEFPRDKL	NP_990650.1
<i>D. rerio</i>	PLVRITTRRSS ^S AHDD-----P----IPEYDLPEDPRWEFSRDKLTL	NP_840088.1
<i>D. melanogaster</i>	PVIRIEKQRT ^T IVSTTGTGGTDPAQGFNEYEFPLDSNWEIPR	NP_001014583.1
<i>D. melanogaster</i>	PVVRIQKQR ^T ITVLQN---GNEPAP-FNEYEFPLDSNWELPRS	NP_732287.1
<i>A. gambiae</i>	PIVRIEKQRST ^T LVQS--GNCDPTM-ISEYEFPIDLNWEFPRNK	XP_562866.3

Figura 14. Os diferentes tipos de mutações nos receptores de fibroblastos e seus respectivos fenótipos.

O círculo roxo indica a localização intracelular da alteração p.Ser453Leu das pacientes 12 e 13 com DGP no receptor FGFR2. Demais círculos correspondem a mutações nos FGFRs identificadas em pacientes com anormalidades congênitas esqueléticas (Síndromes de Crouzon, Pfeiffer, Jackson-Weiss e Apert). TM- domínio transmembrana; Ig-like- domínio imunoglobulina-like. Adaptado de Yamaguchi T P e Rossant J (83).

O “site” “Predict Protein” (www.predictprotein.org) foi utilizado na análise de uma predição da possível repercussão da variante p.Ser453Leu na estrutura secundária da proteína FGFR2. Este estudo indicou que a alteração do aminoácido (Ser→Leu) mudou a estrutura do “loop” próximo a essa região. Na proteína original o “loop” é constituído por quatro aminoácidos (ADTP- alanina, ácido aspártico, treonina, prolina) duas posições a frente da serina 453 e na presença da substituição pelo

aminoácido leucina esse “loop” passa a ser composto por apenas dois aminoácidos (DT- Ácido aspártico, treonina) evidenciando uma mudança significativa na estrutura secundária do receptor FGFR2. (Figuras 15 e 16).

```

      .....43.....44.....45.....46.....47.....48
AA      LTKRIPLRRQVSAESSSSMNSNTPLVRITTRLSTADTPMLAGVSEYELPEDPKWEFPRD
OBS_sec
PROF_sec  E  EE EEEEEEE                                     EEE
Rel_sec   001000011010011233234432000012334445555433334321223320000101
SUB_sec   .....LLL.....

```

Figura 15. Resultado obtido pelo site de predição da estrutura secundária da proteína “Predict Protein” do FGFR2 sem a alteração de Serina por Leucina na posição 453 sem alteração da estrutura secundária.

(L-loop, E-fita, . –sem predição).

```

      .....43.....44.....45.....46.....47.....48
AA      LTKRIPLRRQVSAESSSSMNSNTPLVRITTRLSTADTPMLAGVSEYELPEDPKWEFPRD
OBS_sec
PROF_sec  E  EEEEEEEEEEE                                     EE
Rel_sec   000000111111002233222322000123333334554434344332223200000001
SUB_sec   .....LL.....

```

Figura 16. Resultado obtido pelo site de predição da estrutura secundária da proteína “Predict Protein” do FGFR2 com a alteração de Serina por Leucina na posição 453 com alteração da estrutura secundária.

(L-loop, E-fita, . –sem predição).

As variantes alélicas identificadas no *FGFR2* já descritas previamente na literatura foram:

- No exon 3 do gene *FGFR2* foi identificada em uma paciente com DGC completa 46,XY uma troca em heterozigose c.294 G>A. Nesta troca já

descrita na literatura não há substituição do aminoácido treonina na posição 98, tratando-se portanto de uma variante alélica silenciosa.

- No exon 5 do *FGFR2* foi identificada uma troca de base em heterozigose c.557 T>C em 7 pacientes; 3 com DGC (Pacientes 4, 9 e 10) e 4 com DGP (Pacientes 16, 20, 25 e 30). Esta troca já descrita na literatura corresponde à substituição do códon AUG (metionina, Met ou M) na posição 186, pelo códon ACG (treonina, Thr ou T). A frequência desta variante alélica no grupo de pacientes já descritos por Beleza-Meireles e colaboradores corresponde ao encontrado nos pacientes deste estudo (Figura 17). Porém, quando analisamos a frequência desta variante em nosso grupo controle não foi a mesma descrita no grupo controle deste estudo o qual não encontrou em 96 indivíduos controles (76). A frequência desta variante alélica foi analisada estudando-se 91 controles totalizando 182 alelos normais por PCR seguido de sequenciamento automático. Essa variante foi identificada em 10 controles em heterozigose e um controle em homozigose, portanto 12 alelos dos analisados.

Figura 17. Eletroferogramas do seqüenciamento de uma paciente e controle normal (CN) mostrando a substituição que resulta na variante alélica p.Met186Thr.

A– Eletroferograma do seqüenciamento de uma paciente mostrando a substituição, em heterozigose, de uma timina por uma citosina no segundo nucleotídeo do códon 186 do exon 5, que resulta na variante alélica p.Met186Thr. **B**– Eletroferograma do seqüenciamento de um controle normal (CN).

4.3 - Estudo de dosagem dos genes *FGF9* e *FGFR2* pela técnica de MLPA

O estudo de dosagem dos genes *FGF9* e *FGFR2* pela técnica de MLPA nestes 33 pacientes portadores DDS 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal não identificou nenhuma alteração de dosagem, deleções ou amplificações, desses genes.

4.4 - Estudo histológico dos tecidos gonadais

4.4.1 – Estudo histológico pela técnica de hematoxilina-eosina (H.E.)

A análise dos tecidos corados por H.E mostrou que o tecido gonadal da paciente¹² era constituído por um testículo disgenético com a estrutura tecidual extremamente alterada. As gônadas apresentavam túbulos seminíferos com luz evidente decorrente do afilamento do revestimento, este composto predominantemente por células de Sertoli com raras espermatogônias. A membrana basal estava discretamente espessada. As células de Leydig eram numerosas e caracterizando hiperplasia (citoplasma acidófilo) (Figura 18).

A paciente 13 apresentava um tecido gonadal com um grau de disgenesia mais branda. Essa possuía um testículo composto por túbulos seminíferos agrupados compactamente, com luz virtual, sem espessamento de membrana basal. As células de Sertoli eram numerosas e vacuoladas. As espermatogônias eram raras e identificadas sem sinais de maturação (sem espermatogênese ou espermiogênese). As células de Leydig estavam presentes no estroma, em pequeno número. O testículo esquerdo era um pouco mais lobulado que o direito e possuía um pouco mais de espermatogônias (avaliação subjetiva). A morfologia testicular era do tipo pré-púbere. Havia hiperplasia de células hilares com citoplasma amplo identificada bilateralmente. Em ambos os lados observou-se cistos de inclusão mesotelial com áreas de hiperplasia mesotelial (Figura 19).

Os tecidos gonadais das pacientes foram comparados com tecidos gonadais controles de indivíduos da mesma faixa etária (Figura 20 e 21).

4.4.2 – Ensaio para detecção de apoptose celular

Neste ensaio utilizado para a detecção de apoptose celular os núcleos de células apoptóticas são corados de marrom.

Em relação a esse estudo, verificou-se que a paciente 12 apresentava um índice alto de apoptose das células de Sertoli e também apresentava algumas células germinativas marcadas, estando ausente essa marcação nas células de Leydig (Figura 22). O mesmo padrão apoptótico foi encontrado na paciente 13, porém a taxa de apoptose era menor e essa possuía predomínio de mais células de Sertoli sem marcação (Figura 23).

Em ambos os tecidos normais controles observou-se uma ausência de marcação, apenas algumas células de Sertoli foram marcadas levemente (Figura 24 e 25).

4.4.3 – Ensaio para avaliação de proliferação celular

Realizou-se o estudo da proliferação celular nesses tecidos testiculares com o anticorpo Ki-67 o qual é identificado pela mudança de cor para marrom.

Na paciente 12, a marcação de proliferação celular foi exclusivamente no citoplasma das células germinativas dos cordões testiculares (Figura 26). Em comparação, a paciente 13 apresentou marcação de proliferação celular

principalmente no citoplasma das células de Leydig, mas houve também marcação em citoplasmas de algumas células de Sertoli (Figura 27). Analisando os resultados dos tecidos controle verificou-se que o tecido controle de 10 anos de idade apresentou ausência de marcação para proliferação celular (Figura 28). Já o tecido controle de 1 ano de idade apresentou marcação em algumas células intersticiais dos cordões testiculares e também alguns cordões apresentavam células de Sertoli com marcação citoplasmática semelhante ao padrão encontrado na paciente 13 (Figura 29B).

Como esse ensaio apresentou algumas marcações inespecíficas em alguns tecidos, considerou-se como marcação específica aquelas que apresentavam uma marcação uniforme por todo o tecido, desconsiderando as bordas desses tecidos.

Figura 18. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo disgenético da Paciente 12 com coloração de hematoxilina e eosina.

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. CL- Célula de Leydig; CS- Célula de Sertoli; CG- Célula Germinativa.

Figura 19. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo disgenético da Paciente 13 com coloração de hematoxilina e eosina.

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. CL- Célula de Leydig; CS- Célula de Sertoli; CG- Célula Germinativa.

Figura 20. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo normal de um controle de 10 anos de idade com coloração de hematoxilina e eosina.

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. CL- Célula de Leydig; CS- Célula de Sertoli; CG- Célula Germinativa.

Figura 21. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo normal de um controle de 1 ano de idade com coloração de hematoxilina e eosina.

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. CL- Célula de Leydig; CS- Célula de Sertoli; CG- Célula Germinativa.

Figura 22. Imagens do ensaio de apoptose celular do testículo disgenético da Paciente 12 (“DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System”)

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. CL- Célula de Leydig; CS- Célula de Sertoli; CG- Célula Germinativa.

Figura 23. Imagens do ensaio de apoptose celular do testículo disgenético da Paciente 13 (“DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System”)

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. CL- Célula de Leydig; CS- Célula de Sertoli; CG- Célula Germinativa.

Figura 24. Imagens do ensaio de apoptose celular do testículo normal de um controle de 10 anos de idade (“DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System”).

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. CS- Célula de Sertoli.

Figura 25. Imagens do ensaio de apoptose celular do testículo normal de um controle de 1 ano de idade (“DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System”).

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. SC- Célula de Sertoli.

Figura 26. Imagens do ensaio de proliferação celular (marcação com anticorpo Ki-67) do testículo disgenético da Paciente 12.

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. CL- Célula de Leydig; CS- Célula de Sertoli; CG- Célula Germinativa.

Figura 27. Imagens do ensaio de proliferação celular (marcação com anticorpo Ki-67) do testículo disgenético da Paciente 13.

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. CL- Célula de Leydig; CS- Célula de Sertoli; CG- Célula Germinativa.

Figura 28. Imagens do ensaio de proliferação celular (marcação com anticorpo Ki-67) do testículo normal do controle de 10 anos.

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. CS- Célula de Sertoli; CG- Célula Germinativa.

Figura 29. Imagens do ensaio de proliferação celular (marcação com anticorpo Ki-67) do testículo normal do controle de 1 ano.

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. CL- Célula de Leydig; CS- Célula de Sertoli.

Figura 30. Imagens do ensaio de apoptose celular do testículo disgenético de um paciente com disgenesia gonadal mista (“DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System”).

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. CL- Célula de Leydig; CS- Célula de Sertoli; CG- Célula germinativa.

Figura 31. Imagens do ensaio de apoptose celular do testículo de um paciente com insensibilidade parcial aos andrógenos (“DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System”).

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. CL- Célula de Leydig; CS- Célula de Sertoli.

Figura 32. Imagens do ensaio com o anticorpo OCT3/4 do testículo disgenético da Paciente 12.

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. CG- célula germinativa.

Figura 33. Imagens do ensaio com o anticorpo OCT3/4 do testículo disgenético da Paciente 13.

A - Imagem do testículo obtida com um aumento de 40X. **B** - Imagem do testículo obtida com um aumento de 100X. GC- célula germinativa.

5 – Discussão

A determinação sexual nos mamíferos consiste num processo dinâmico durante o qual as células germinativas e as células somáticas adquirem características sexo-específicas.

A gônada embrionária bipotencial inicia seu desenvolvimento por volta da 5ª semana de vida fetal nos humanos (1). Nas semanas seguintes (6ª - 7ª semana) ocorrerá a diferenciação de grupos celulares específicos no tecido gonadal bipotencial que determinará o desenvolvimento em ovário ou em testículo, dois órgãos com arquiteturas teciduais e funções especializadas extremamente diferentes.

Apesar do grande avanço nos conhecimentos dos mecanismos envolvidos nos processos de determinação e diferenciação sexual o papel exato dos inúmeros genes, que participam das diferentes etapas deste complexo processo, não está completamente esclarecido.

O modelo de interação gênica do qual participam os genes *Sox9*, *Fgf9/Pdg2* e *Wnt4/Rspo1* trouxe uma nova visão dos mecanismos gênicos envolvidos na especialização do tecido gonadal bipotencial.

O gene *Sox9*, tradicionalmente reconhecido com um importante fator indutor masculino, regula a expressão do gene *Fgf9* estimulando o seu aumento, e o *Fgf9* por sua vez mantém a expressão do *Sox9*, constituindo uma alça de estímulo positivo nas gônadas XY. Neste ambiente, o balanço entre os sinais *Fgf9* e *Wnt4* desvia-se em favor do *Fgf9*, estabelecendo o domínio da via masculina. Contrariamente, a via feminina se inicia na ausência da alça de retro-controle positivo entre *Sox9* e *Fgf9*, permitindo que o *Wnt4* bloqueie a expressão do *Fgf9* (13).

Recentemente, Bowles, J. e colaboradores (61) propuseram a participação do gene *Fgf9* na manutenção das características masculinas específicas das células germinativas em gônadas XY de camundongos. A expressão de *Fgf9* inadequadamente diminuída na gônada fetal masculina possibilita a expressão aumentada de ácido retinóico, que por sua vez resulta na expressão anômala de *Stra8*. A expressão do *Stra8* no tecido gonadal induz o processo de meiose das células germinativas favorecendo a feminilização do ambiente gonadal. Nestas circunstâncias, ocorre a perda da expressão de vários genes pluripotentes e de marcadores associados com as células germinativas masculinas (61). Estes novos achados em camundongos reforçam o papel do sistema *Fgf9* nas vias de amplificação dos genes masculinizantes gonadais.

Apesar das várias evidências da participação do gene *Fgf9* no processo de determinação gonadal masculina em animais até o momento, apenas polimorfismos no *FGF9* foram descritos no estudo de pacientes portadores de ambigüidade genital (banco de dados “Ensembl” (www.ensembl.org)). A única mutação descrita (p.Ser99Asn) no gene *FGF9*, foi identificada numa família chinesa que apresentava a Síndrome de Sinostoses Múltiplas. Os estudos “in vitro” mostraram uma queda na proliferação e diferenciação de condrócitos acompanhado de um aumento na diferenciação osteogênica e mineralização da matriz óssea de células mesenquimais derivadas de células tronco. Houve também uma queda na sinalização via FGFR com a diminuição da atividade da via Erk1/Erk2. Não

houve relato da presença de anormalidades genitais nos indivíduos afetados (57).

Baseados nestas evidências, propomos o estudo do gene *FGF9* numa grande coorte de pacientes 46,XY portadores de disgenesia gonadal nas formas parcial e completa. Neste estudo, pesquisamos a presença de anormalidades gênicas que pudessem determinar uma redução da função da proteína FGF9 na alça de retroalimentação positiva *FGF9* – *SOX9* e que poderiam atuar negativamente na cascata gênica masculinizante da gônada embrionária.

Neste grupo de pacientes identificamos 9 variantes alélicas, que constituem polimorfismos do gene *FGF9* já descritas previamente.

Em 2007, Chen *et al.* estudaram a região 3'UTR do gene *FGF9* e identificaram um microssatélite (TG)_n. Eles determinaram quatro diferentes alelos (TG₁₃₋₁₆) (* c.275TG_n) e clonaram essas seqüências em um plasmídeo de expressão com luciferase. O microssatélite (TG)₁₄ foi encontrado em cinco alelos dos 21 pacientes com DDS 46,XY de diferentes etiologias e três alelos de 72 controles. Estudos funcionais demonstraram que o alelo (TG)₁₄ teve uma maior modulação do promotor do *FGF9* em ensaios de expressão e que também possuíam uma maior estabilidade do mRNA em comparação com os demais alelos (58).

Com base nestes resultados os autores sugeriram que o microssatélite (TG)₁₄ da região 3'UTR do *FGF9* é um polimorfismo funcional e foi relacionado estatisticamente com a presença de DDS 46,XY. Os

mecanismos envolvidos está na capacidade do microssatélite regular a expressão gênica de forma pré e pós-transcrição.

Nosso estudo da região 3'UTR do *FGF9* em uma coorte de paciente, exclusivamente, com disgenesia gonadal 46,XY está em desacordo com os resultados reportados anteriormente. Seis alelos diferentes (TG)₁₃₋₁₈ (c. * 275TG_n) na 3'UTR do *FGF9* foram identificados em nossos pacientes, mas nenhum deles, incluindo o alelo (TG)₁₄, foram estatisticamente associados à presença de disgenesia gonadal (Tabela 6). A heterogeneidade na etiologia dos paciente DDS 46,XY de Chen (58) pode ter contribuído para os resultados divergentes observados.

Os mecanismos responsáveis pela regulação da expressão *FGF9* ainda são mal compreendidos. O papel crucial do elemento “Adenylate/uridylate-rich elements” (AREs) na região 3'UTR do *FGF9* no controle da expressão gênica foi recentemente demonstrada (59). Anormalidades destes elementos reguladores podem causar redução na expressão do *FGF9* e, secundariamente, pode afetar o desenvolvimento gonadal masculino normal. O papel exato dos elementos reguladores na expressão do gene *FGF9* e sua possível consequência no desenvolvimento testicular deve ser melhor avaliado.

Os resultados observados neste estudo indicam que mutações inativadoras ou deleções do *FGF9* são provavelmente eventos infrequentes como mecanismos gênicos desencadeantes do desenvolvimento de gônadas masculinas disgenéticas em humanos.

A expressão do *FGF9* e sua atuação na via gênica do desenvolvimento testicular embrionário poderiam estar prejudicadas também pela presença de alterações na região promotora do *FGF9*, assim esta região deverá ser avaliada oportunamente.

A confirmação de que o *Fgfr2* é o receptor do *Fgf9* e o real envolvimento do *Fgfr2* no desenvolvimento gonadal masculino de camundongos foi demonstrado no estudo de Bagheri-Fam e colaboradores em 2008. Neste trabalho foi observado que os embriões XY duplo heterozigotos para *Fgfr2/Sox9* apresentavam um fenótipo da gônada similar ao observado em camundongos “knockout” para *Fgf9* além da presença de reversão sexual nestes animais (70).

As gônadas XY duplo heterozigotos para *Fgfr2/Sox9* expressavam marcadores somáticos femininos e marcadores meióticos indicando que no polo anterior e posterior das gônadas mostravam reversão sexual. O espectro fenotípico das gônadas eram desde uma estrutura desorganizada dos testículos até ausência de marcadores testiculares específicos (51, 70).

O gene *FGFR2* em humanos está localizado no braço longo do cromossomo 10 e constitui um dos genes deletados nos pacientes portadores da síndrome da deleção do 10q. Nesta síndrome as manifestações fenotípicas compreendem além das anormalidades genitourinárias (ambigüidade genital, hipospádia, criptorquidia) como as malformações múltiplas (lábio leporino, ânus imperfurado, malformações cardíacas e retardo psicomotor) que foram as mesmas características apresentadas pelo paciente controle positivo utilizado na técnica de MLPA.

Mutações “missense” no *FGFR2* com ganho de função e hiperativação deste receptor são amplamente reconhecidas como a causa etiológica de diferentes síndromes: Crouzon, Pfeiffer, Jackson-Weiss e Apert que apresentam anormalidades congênitas esqueléticas, classicamente não acompanhadas por anormalidades genitais.

Na literatura apenas uma variante alélica não sinônima do *FGFR2*, p.Met186Thr, foi relacionada à presença de anormalidades do desenvolvimento genital masculino. Esta variante do *FGFR2*, considerada um polimorfismo, foi identificada unicamente em pacientes com hipospádia em comparação com 96 controles normais estudados por Beleza-Meireles e colaboradores (76). Os autores sugerem que este polimorfismo poderia interferir na ação dos andrógenos em seu receptor nuclear durante o desenvolvimento uretral. Esta mesma variante alélica do *FGFR2* foi identificada em sete pacientes (3 com DGC e 4 com DGP) da nossa casuística. Nestes sete pacientes (Pacientes 4, 9, 10, 16, 20, 25 e 30) não encontramos nenhuma particularidade clínico-laboratorial que os diferenciasses do grupo de pacientes estudados. Quando realizado o estudo de frequência dessa variante em nossa população controle encontramos em 11 indivíduos normais, sendo um deles em homozigose. Esta frequência corresponde a 6,6% (12 alelos dos 182 analisados), tratando-se, portanto de um polimorfismo freqüente na população brasileira, o que não confirmou os dados anteriormente descritos por Beleza-Meireles e colaboradores. Assim, é possível que essa variante não gere efeitos deletérios na proteína do *FGFR2* como sugerido anteriormente e, portanto não relacionamos a

presença desta variante ao fenótipo dos 8 pacientes portadores de disgenesia gonadal 46,XY.

Uma nova variante, c.1358 C>T (p.Ser453Leu), localizada no exon 10 do *FGFR2* identificada em heterozigose em duas irmãs com DGP 46,XY e na mãe. Não foi possível estender a pesquisa da presença desta variante nos indivíduos do sexo masculino da família materna, pois o avô materno já era falecido e pela ausência de tios maternos. Apesar destas informações não serem disponíveis, a identificação da mãe como portadora da variante alélica não afasta a hipótese desta variante ter participação no fenótipo das pacientes. Vários trabalhos já descritos nesta dissertação mostram como a via de sinalização do FGFR2 é importante para a cascata de sinalização masculina em animais, porém sem repercussões conhecidas no desenvolvimento gonadal feminino (53, 70).

Esta variante não foi encontrada em 147 indivíduos 46,XY controles estudados. O aminoácido serina 453 é conservado entre as espécies de vertebrados e nesta variante ocorreu a troca de um aminoácido de cadeia lateral polar não carregada (serina) por um aminoácido de cadeia lateral apolar (leucina). Esta região conservada (PLVITTRLSSSTA – Tabela 7) foi analisada no BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e verificou ser uma sequência de aminoácidos conservados, mas presente apenas no receptor FGFR2 das espécies. O estudo da variante p.Ser453Leu em “sites” de previsão, “PolyPhen” e “SIFT”, indicou que a nova proteína FGFR2 é possivelmente danificada. Prováveis alterações na estrutura secundária desta variante da proteína FGFR2 foram analisadas no site de predição

“Predict Protein”. Neste estudo, uma alteração em um “loop” próximo do aminoácido 453 trocado foi demonstrada, o que poderia causar danos a função normal da proteína.

O aminoácido 453 (Ser→Leu) localiza-se no domínio intracelular da molécula do FGFR2, entre o domínio transmembrana e o domínio tirosina-quinase (Figura 14). O receptor FGFR2 possui sítios de ligação extracelulares e intracelulares e interage com as vias de transdução de sinais: RAS-RAF-MAPK, PI13K-AKT e fosfolipase Cy (PLCy) (56, 84, 85). Ligantes da via MAPK/ERK (“mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinases”) podem interagir nesta região do receptor e modificações na estrutura conformacional do FGFR2 poderá comprometer esta interação e consequentemente interferir nas funções celulares. (69).

Buscando avaliar as possíveis repercussões nas atividades de apoptose e de proliferação celular secundárias às modificações estruturais e conformacionais da nova proteína FGFR2 realizou-se o estudo do material gonadal das pacientes. Os estudos histológicos realizados nos tecidos parafinizados das gônadas das pacientes 12 e 13 com disgenesia gonadal parcial mostraram resultados interessantes para os ensaios de apoptose e proliferação celular.

Para a detecção de apoptose foi utilizada o “kit DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System” (Promega Corp., Madison, WI), o qual cora em marrom os núcleos apoptóticos. As pacientes que possuem a variante p.Ser453Leu (casos 12 e 13), apresentavam neste ensaio um grau de apoptose relativamente maior do que os tecidos controles. A paciente 12 que

foi operada mais tardiamente, aos 10 anos de idade, possuía um maior número de células apoptóticas que a sua irmã (paciente 13), que foi operada com 1 ano e dois meses de idade.

A presença de um maior número de células de Sertoli e células germinativas apoptóticas nas gônadas destas pacientes portadoras da variante alélica do *FGFR2* poderiam ser causadas pela permanência da gônada na região abdominal, decorrente da não migração do testículo para o escroto especialmente na paciente submetida à cirurgia com 10 anos de idade. Na paciente operada precocemente, com 1 ano de idade, o grau de apoptose celular era mais discreto porém maior do que o observado nos controles da mesma faixa etária e com testículos tópicos.

Outra hipótese proposta para justificar a presença de um grande número de células testiculares apoptóticas nas pacientes portadoras de disgenesia gonadal 46,XY forma parcial é que a ocorrência deste processo celular seja inerente a evolução natural da gônada disgenética independentemente da origem gênica da doença.

Na tentativa de esclarecer essas hipóteses anteriormente discutidas o ensaio para detecção de apoptose celular no tecido gonadal foi realizado também em testículos de pacientes portadores de DDS por outras etiologias, a saber, disgenesia gonadal mista (DGM) e síndrome de resistência androgênica parcial (PAIS) que também apresentavam testículos criptorquídicos.

O paciente portador de DGM foi operado com 1 ano de idade e no ensaio de apoptose não foi observada a presença de células de Sertoli,

Leydig ou germinativas apoptóticas (Figura 30). Apresentando características similares ao controle normal da mesma faixa etária. O estudo do testículo da paciente portadora de PAIS, submetida a gonadectomia com 1 ano de idade, apresentou o mesmo padrão do ensaio de apoptose celular encontrado na gônada da paciente com DGM (Figura 30 e 31) apresentando características similares ao controle normal da mesma faixa etária. Estes achados são contrários a hipótese de que a localização do testículo intra-abdominal por si só poderia justificar o processo acelerado de apoptose das células testiculares.

Por outro lado, a descrição histológica do tecido testicular do paciente com DGM confirma a presença de alterações morfológicas significativas, como túbulo seminífero em parte sólido, células germinativas esparsas em estroma fusocelular primitivo caracterizando o tecido como um testículo disgenético. Os achados no ensaio de apoptose mostraram diferenças marcantes e sugerem que somente a presença do tecido testicular disgenético não é suficiente para promover o processo acelerado de apoptose das células testiculares no grau observado nas pacientes portadoras da variante alélica p.Ser453Leu no gene *FGFR2*. Outros estudos em testículos disgenéticos devem ser realizados para confirmar estes achados

Especulamos que a variante alélica p.Ser453Leu poderia determinar modificações na estrutura conformacional do FGFR2, prejudicando a interação de ligantes das vias de sinalização intracelular do receptor. As vias MAPK/ERK e PI3K-AKT relacionadas às funções celulares de inibição de

apoptose e de proliferação celular poderiam estar prejudicadas nestas pacientes aumentando o processo apoptótico das células gonadais. Os os achados no ensaio de apoptose celular no tecido gonadal destas duas irmãs indiretamente reforçam estas hipóteses.

A metodologia de TUNEL é amplamente utilizada na detecção de células apoptóticas. A principal vantagem do ensaio de TUNEL é a sua versatilidade, pois permite a comparação de materiais em condições muito diferentes como tecidos fixados e “in vivo”, entre tecidos e células e até mesmo entre células animais e vegetais (86).

A metodologia de TUNEL baseia-se na marcação direta e específica do DNA fragmentado no núcleo celular, o que resulta na marcação de células em fases iniciais de apoptose assim como na marcação de células após fagocitose (87, 88). Células que sofreram necrose também podem ser marcadas por esse método (89, 90).

Para o estudo de apoptose celular em material parafinado, além da metodologia de TUNEL as marcações de imunohistoquímica para os diferentes tipos de caspase constitui uma abordagem informativa e de simples execução (86).

Todas as técnicas utilizadas para a detecção de apoptose celular apresentam restrições e pontos desfavoráveis e a combinação de mais de uma técnica para a obtenção de um resultado confiável é recomendada (89, 90). Uma das restrições aos resultados obtidos pela metodologia de TUNEL são os falsos-positivos secundários à marcação de células necróticas (86). Dessa forma, a confirmação dos achados preliminares de apoptose

aumentada nas células testiculares nas pacientes portadoras da variante alélica p.Ser453Leu do *FGFR2* identificadas pela metodologia de TUNEL deverão ser realizadas por outras metodologias para detecção de apoptose celular.

No ensaio para avaliação da proliferação celular nos tecidos gonadais foi utilizado o anticorpo anti-Ki-67. Esse antígeno é expresso durante as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, enquanto que células que não estão ciclando, fase G0, bloqueiam a expressão desse antígeno.

No ensaio para avaliação de proliferação celular verificou-se que a paciente mais velha portadora da variante alélica do *FGFR2* possuía a grande maioria das suas células germinativas marcadas. Essa marcação intensa das células germinativas da paciente 12 foi explicada posteriormente com a complementação do estudo utilizando o anticorpo anti-OCT3/4, o qual marca a pluripotencialidade das células germinativas. Este estudo complementar indicou que a grande maioria das células germinativas da paciente possuíam expressão de OCT3/4, mostrando a potencialidade de proliferação dessas células e o risco de ocorrência de um carcinoma “in situ” (Figura 32) No testículo disgenético da paciente 13 não foi identificada nenhuma marcação com o anticorpo anti-OCT3/4 (Figura 33). Nos tecidos controles houve ausência deste marcador em todos os tipos celulares analisados.

O ensaio para avaliação de proliferação celular na paciente 13 mostrou a presença de marcação apenas nas células de Leydig o qual também foi identificado em sua irmã (paciente 12). O controle de 1 ano de

idade também apresentava marcação nas células de Leydig. Estas células apresentavam características de células hiperplásicas na coloração por HE refletindo um estado de estimulação e aumento da atividade proliferativa celular cujos mecanismos não estão esclarecidos

Assim, o real significado da nova variante alélica p.Ser453Leu no gene *FGFR2* encontrada nessa família brasileira com DGP e sua correlação com os resultados observados nos ensaios de avaliação de apoptose e de proliferação celular deverão ser esclarecidas por estudos funcionais “in vitro” da proteína alterada.

6 – Conclusões

1. Os resultados observados neste estudo indicam que mutações inativadoras do *FGF9* e deleções dos genes *FGF9* e *FGFR2* são causas incomuns de DDS 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal não síndrômica.
 2. A variante p.Met186Thr anteriormente relacionada ao desenvolvimento de hipospádia foi encontrada em pacientes e indivíduos normais e provavelmente não está relacionada ao fenótipo das pacientes.
 3. Uma nova variante alélica, p.Ser453Leu, foi encontrada em duas irmãs com DGP alterando o aminoácido serina na posição 453 o qual é conservado entre as espécies de vertebrados. Esta variante não foi identificada em 147 indivíduos normais estudados. O estudo da variante em “sites” de predição, “PolyPhen” e “SIFT”, indicou que a nova proteína *FGFR2* é possivelmente danificada. Possíveis alterações na estrutura secundária foram analisadas no “site” de predição “Predict Protein” o qual demonstrou uma alteração em um “loop” próximo do aminoácido 453 alterado, o que poderia causar danos a função normal desta proteína.
-

4. Se os resultados dos “sites” de predição e os dados dos estudos de imunohistoquímica dos testículos disgenéticos das pacientes forem confirmados em estudos funcionais futuros poder-se-á correlacionar definitivamente a alteração p.Ser453Leu no *FGFR2* identificada nesta família brasileira com a etiologia da disgenesia gonadal parcial 46,XY. Estes resultados demonstrariam pela primeira vez a participação do gene *FGFR2* na determinação gonadal masculina em humanos.
-

7 – Anexos

Tabela 8. Dados clínicos e hormonais dos pacientes com disgenesia gonadal completa 46,XY

Caso	Sexo social ^b	Quadro clínico inicial ^{c,d}	Idade 1 ^a avaliação ^e	Pais consanguíneos	Genitália externa ^b	LH ^f UI/L	FSH ^f UI/L	T basal ^f ng/dL	T após hCG ^f ng/dL
1	F	Ausência do desenvolvimento puberal	24	Não	F	22,6*	64,6*	22	22
2	F	Ausência do desenvolvimento puberal	24	Sim	F	9	41	<14	NR ^o
3	F	Ausência do desenvolvimento puberal	23	Não	F	21	76	35	NR ^o
4	F	Ausência do desenvolvimento puberal	22	Não	F	17,6	74,8	<14	NR ^o
5	F	Ausência do desenvolvimento puberal	19	Sim	F	14,3	75,3	14	NR ^o
6 ^a	F	Ausência do desenvolvimento puberal	15,8	Não	F	5,5	27	11	NR ^o
7 ^a	F	Ausência do desenvolvimento puberal	11,1	Não	F	1,8	3,4	<10	NR ^o
8	F	Ausência do desenvolvimento puberal	45	Sim	F	13,6*	56*	34	<14
9	F	Ausência do desenvolvimento puberal	25	Não	F	31,6	47,1	55	NR ^o
10	F	Ausência do desenvolvimento puberal	32	Não informado	F	12,7	44,2	<11	NR ^o
11	F	Ausência do desenvolvimento puberal	21	Não	F	35,6	67,9	51	NR ^o
		Valores	Normais	IFME*	Crianças	0,6-1,3*	1,0-3,1*		
					Adultos	1,4-9,2*	1,0-12*		
				RIE	Crianças	1,0-10	1,0-10	<30	391±129
					Adultos	1,0-10	1,0-10	441-925	1306±577

^a casos familiares; ^b F-feminino; ^c anos; ^d exames hormonais pré-operatórios; * IFME- método imunofluorométrico; RIE- método radioimunoensaio; NR^o - exame não realizado

Tabela 9. Genitais internos e exame anátomo-patológico dos pacientes com disgenesia gonadal completa 46,XY

Caso	US pélvico útero	AP: Gônadas^b	AP: Derivados Mullerianos^b	AP: Derivados Wolffianos^b
1	Presente	Disgenéticas Bilaterais	Tubas uterinas bilaterais	Ausentes
2	Presente	Disgenéticas Bilaterais ^c	Tubas uterinas bilaterais	E ^e bilaterais
3	Presente	Disgenéticas Bilaterais	Tubas uterinas bilaterais	Ausentes
4	Presente	Disgenéticas Bilaterais	Tubas uterinas bilaterais	Ausentes
5	Presente	Disgenéticas Bilaterais	Tubas uterinas bilaterais	Presentes ^d
6 ^a	Presente	ND [#]	ND [#]	ND [#]
7 ^a	Presente	ND [#]	ND [#]	ND [#]
8	Presente	Disgenéticas Bilaterais	Tubas uterinas bilaterais	Presentes ^d
9	Presente	Disgenéticas Bilaterais	ND	ND
10	Presente	Disgenéticas Bilaterais	Tubas uterinas bilaterais	E ^e direito
11	Presente	ND	Tubas uterinas bilaterais	ND

^a casos familiares; ^b AP- Anátomo Patológico; ^c Presença de gonadoblastoma; ^d remanescentes wolffianos não diferenciados; E^e – epidídimo; ND[#] - material não disponível- manipulação cirúrgica prévia; ND- material não disponível

Anexos

Tabela 10. Dados clínicos e hormonais dos pacientes com disgenesia gonadal parcial 46,XY

Caso	Sexo social ^c	Quadro clínico inicial	Idade 1ª avaliação ^d	Pais consanguíneos	Genitália externa	LH ^e UI/L	FSH ^e UI/L	T basal ^e ng/dL	T após hCG ^e ng/dL
12 ^a	F	Genitália ambígua ao nascimento	10	Não	Ambígua	5,1*	50,4*	116	NR ^o
13 ^a	F	Genitália ambígua ao nascimento	0,2	Não	Ambígua	0,6	<1,0	98	574
14	F	Genitália ambígua ao nascimento	2	Não	Ambígua	NR ^o	NR ^o	25,1	33
15	M	Genitália ambígua ao nascimento	5	Não	Ambígua	<0,6*	<1,0*	<14*	494
16 ^b	M	Genitália ambígua ao nascimento	0,9	Não	Ambígua	<0,6	<1	<14	800
17	M	Genitália ambígua ao nascimento	23	Não	Ambígua	11,4	29,2	420	468
18 ^b	M	Genitália ambígua ao nascimento	34	Sim	Ambígua	10	78	75	NR ^o
19 ^b	M	Genitália ambígua ao nascimento	16	Não informado	Ambígua	NR ^o	NR ^o	NR ^o	NR ^o
20	F	Genitália ambígua ao nascimento	1,7	Não	Ambígua	<0,6*	2,7*	11	107
21 ^b	M	Genitália ambígua ao nascimento	7,3	Não	Ambígua	NR ^o	NR ^o	<10	NR ^o
22	M	Genitália ambígua ao nascimento	0,8	Sim	Ambígua	NR ^o	NR ^o	NR ^o	310
Valores			Normais	IFME*	Crianças	0,6-1,3*	1,0-3,1*		
					Adultos	1,4-9,2*	1,0-12*		
				RIE	Crianças	1,0-10	1,0-10	<30	391±129
					Adultos	1,0-10	1,0-10	441-925	1306±577

^a casos familiares; ^b manipulação cirúrgica prévia; ^c F-Feminino, M-Masculino, M→F- mudança de sexo social de masculino para feminino; ^danos; ^e exames hormonais pré-operatórios; * IFME- método imunofluorométrico; RIE- método radioimunoensaio; NR^o - exame não realizado

Anexos

Caso	Sexo social ^c	Quadro clínico inicial	Idade 1 ^a avaliação ^d	Pais consanguíneos	Genitália externa	LH ^e UI/L	FSH ^e UI/L	T basal ^e ng/dL	T após hCG ^e ng/dL
23	M	Genitália ambígua ao nascimento	21	Não	Ambígua	16,5	49	<14	<14
24 ^a	M→F	Genitália ambígua ao nascimento	1,8	Não	Ambígua	NR ^o	NR ^o	<10	14
25 ^a	M	Criptorquidia e micropênis	1,8	Não	Ambígua	11,8	115	9	9
26 ^b	F	Genitália ambígua ao nascimento	38	Não	Ambígua	8	42	22	NR ^o
27 ^b	F	Genitália ambígua ao nascimento	43	Não	Ambígua	31,7	51,9	324	NR ^o
28 ^b	M	Criptorquidia e micropênis	3,5	Não	Ambígua	3*	88*	<10	29
29	F	Ausência de Menarca	15	Não	Clitoromegalia	74	96	36	40,2
30	M	Genitália ambígua ao nascimento	11,5	Não	Ambígua	20	41	<7	NR ^o
31	F	Genitália ambígua ao nascimento	18	Não	Feminina	43	97	14	NR ^o
32	M→F	Genitália ambígua ao nascimento	4	Sim	Ambígua	3,2	87	30	<10
33 ^b	M	Genitália ambígua ao nascimento	34	Não informado	Ambígua	-	-	42	493
Valores			Normais	IFME*	Crianças	0,6-1,3*	1,0-3,1*		
					Adultos	1,4-9,2*	1,0-12*		
				RIE	Crianças	1,0-10	1,0-10	<30	391±129
					Adultos	1,0-10	1,0-10	441-925	1306±577

^a casos familiares; ^b manipulação cirúrgica prévia; ^c F-Feminino, M-Masculino, M→F- mudança de sexo social de masculino para feminino; ^d anos; ^e exames hormonais pré-operatórios; * IFME- método imunofluorométrico; RIE- método radioimunoensaio; NR^o - exame não realizado; - Não disponível

Anexos

Tabela 11. Genitais internos e exame anátomo-patológico dos pacientes com disgenesia gonadal parcial 46,XY

Caso	US pélvico útero	UCGR^c Seio urogenital	AP: Gônadas^d	AP: Derivados Mullerianos^d	AP: Derivados Wolffianos^d
12 ^a	Presente	Presente	T ^e à esquerda + T ^e à direita	U ^h e T ⁱ bilaterais	Ausentes
13 ^a	Ausente	Presente	T ^e à esquerda + T ^e à direita	T ⁱ bilaterais	E ^j e V ^k bilaterais
14	Ausente	Presente	D ^f à esquerda + D ^f à direita	T ⁱ bilaterais	E ^j e V ^k bilaterais
15	NR ^o	Presente	*	U ^h rudimentar	Ausentes
16 ^b	NR ^o	Presente	D ^f à direita**	U ^h e T ⁱ bilaterais	Ausentes
17	Ausente	NR ^o	G ^t à esquerda e T ^e à direita	U ^h e T ⁱ esquerda	Presentes bilaterais ^l
18 ^b	NR ^o	Ausente	ND [#]	U ^h e T ⁱ bilaterais	E ^j e V ^k bilaterais
19 ^b	Presente	NR ^o	ND [#]	U ^h	ND [#]
20	Presente	NR ^o	T ^e à esquerda + T ^e à direita	Ausentes	E ^j e V ^k bilaterais
21 ^b	NR ^o	NR ^o	T ^e à esquerda + T ^e à direita	Ausentes	E ^j à direita
22	Presente	Ausente	T ^e à esquerda + T ^e à direita	U ^h e T ⁱ bilaterais	Ausentes

^a casos familiares; ^b manipulação cirúrgica prévia; ^c UCGR ^d AP- Anátomo Patológico; T^e Testículo disgenético; D^f- gônada indiferenciada disgenética; G^g- gonadoblastoma; A^h- Gônada ausente; Uⁱ- útero; T^j- tuba uterina; E^k- epidídimo; V^l- vaso deferente; NR^o- exame não realizado; ND[#]- material não disponível

Anexos

Caso	US pélvico útero	UCGR^c Seio urogenital	AP: Gônadas^d	AP: Derivados Mullerianos^d	AP: Derivados Wolffianos^d
23	Ausente	NR ^o	ND [#]	ND [#]	ND [#]
24 ^a	Presente	Presente	A ^h à esquerda + D ^f à direita	T ^j à direita	E ^k e V ^l à direita
25 ^a	Ausente	NR ^o	A ^h à esquerda + A ^h à direita	Restos mullerianos	E ^k bilaterais
26 ^b	NR ^o	Ausente	ND [#]	ND [#]	ND [#]
27 ^b	Presente	NR ^o	A ^h à esquerda + T ^e à direita	T ^j à direita	E ^k à esquerda
28 ^b	Ausente	Ausente	A ^h à esquerda + A ^h à direita	Ausente	Ausentes
29	Presente	Presente	A ^h à esquerda + T ^e à direita.	T ^j bilaterais	E ^k à direita
30	Ausente	Presente	A ^h à esquerda + A ^h à direita	Ausentes	E ^k bilaterais
31	NR ^o	Presente	T ^e à esquerda + A ^h à direita	Ausentes	E ^k bilaterais
32	Ausente	Presente	D ^f à esquerda + A ^h à direita	U ⁱ e T ^j bilaterais	Ausentes
33	NR ^o	NR ^o	T ^e à esquerda + D ^f à direita	ND [#]	ND [#]

^a casos familiares; ^b manipulação cirúrgica prévia; ^c UCGR ^d AP- Anátomo Patológico; T^e Testículo disgenético; D^f- gônada indiferenciada disgenética; G^g- gonadoblastoma; A^h- Gônada ausente; Uⁱ- útero; T^j- tuba uterina; E^k- epidídimo; V^l- vaso deferente; NR^o- exame não realizado; ND[#]- material não disponível

8 – *Referências*

1. Jost A. A new look at the mechanisms controlling sex differentiation in mammals. *Johns Hopkins Med J*. 1972 Jan;130(1):38-53.
 2. Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA. Consensus statement on management of intersex disorders. *J Pediatr Urol*. 2006 Jun;2(3):148-62.
 3. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA. Consensus statement on management of intersex disorders. *International Consensus Conference on Intersex. Pediatrics*. 2006 Aug;118(2):e488-500.
 4. Parker KL. The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function. *Mol Cell Endocrinol*. 1998 Oct 25;145(1-2):15-20.
 5. Parker KL, Schedl A, Schimmer BP. Gene interactions in gonadal development. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:417-33.
 6. Park SY, Jameson JL. Minireview: transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology*. 2005 Mar;146(3):1035-42.
 7. Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, et al. The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):909-13.
 8. Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Shiroishi T, Nakahara Y, Hashimoto N, Noguchi K, et al. Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature*. 1998 Jun 18;393(6686):688-92.
 9. Quaggin SE, Schwartz L, Cui S, Igarashi P, Deimling J, Post M, et al. The basic-helix-loop-helix protein *pod1* is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development*. 1999 Dec;126(24):5771-83.
 10. Cui S, Ross A, Stallings N, Parker KL, Capel B, Quaggin SE. Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in *Pod1* knockout mice. *Development*. 2004 Aug;131(16):4095-105.
 11. Quaggin SE, Vanden Heuvel GB, Igarashi P. Pod-1, a mesoderm-specific basic-helix-loop-helix protein expressed in mesenchymal and glomerular epithelial cells in the developing kidney. *Mech Dev*. 1998 Feb;71(1-2):37-48.
 12. Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D. *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev*. 2000 Oct 15;14(20):2587-95.
 13. Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet*. 2004 Jul;5(7):509-21.
 14. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with
-

- homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 1990 Jul 19;346(6281):240-4.
15. Canning CA, Lovell-Badge R. Sry and sex determination: how lazy can it be? *Trends Genet*. 2002 Mar;18(3):111-3.
16. Swain A, Lovell-Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev*. 1999 Apr 1;13(7):755-67.
17. McLaren A, Southee D. Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev Biol*. 1997 Jul 1;187(1):107-13.
18. Yao HH, Whoriskey W, Capel B. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev*. 2002 Jun 1;16(11):1433-40.
19. Clark AM, Garland KK, Russell LD. Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod*. 2000 Dec;63(6):1825-38.
20. Correa RV, Domenice S, Bingham NC, Billerbeck AE, Rainey WE, Parker KL, et al. A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Apr;89(4):1767-72.
21. Domenice S, Correa RV, Costa EM, Nishi MY, Vilain E, Arnhold IJ, et al. Mutations in the SRY, DAX1, SF1 and WNT4 genes in Brazilian sex-reversed patients. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Jan;37(1):145-50.
22. 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 Mar-Apr;7(2):238-41.
23. Domenice S, Yumie Nishi M, Correia Billerbeck AE, Latronico AC, Aparecida Medeiros M, Russell AJ, et al. A novel missense mutation (S18N) in the 5' non-HMG box region of the SRY gene in a patient with partial gonadal dysgenesis and his normal male relatives. *Hum Genet*. 1998 Feb;102(2):213-5.
24. Mendonca BB, Domenice S, Arnhold IJ, Costa EM. 46,XY disorders of sex development (DSD). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 Feb;70(2):173-87.
25. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*. 2008 Jun 12;453(7197):930-4.
-

-
26. Ogata T, Muroya K, Sasagawa I, Kosho T, Wakui K, Sakazume S, et al. Genetic evidence for a novel gene(s) involved in urogenital development on 10q26. *Kidney Int.* 2000 Dec;58(6):2281-90.
 27. Wilkie AO, Campbell FM, Daubeney P, Grant DB, Daniels RJ, Mullarkey M, et al. Complete and partial XY sex reversal associated with terminal deletion of 10q: report of 2 cases and literature review. *Am J Med Genet.* 1993 Jun 15;46(5):597-600.
 28. 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 Nov;38(11):1304-9.
 29. 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 Feb;29(2):220-6.
 30. Capel B. R-spondin1 tips the balance in sex determination. *Nat Genet.* 2006 Nov;38(11):1233-4.
 31. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):1-28.
 32. Kocer A, Pinheiro I, Pannetier M, Renault L, Parma P, Radi O, et al. R-spondin1 and FOXL2 act into two distinct cellular types during goat ovarian differentiation. *BMC Dev Biol.* 2008;8:36.
 33. 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 May 1;17(9):1264-77.
 34. Heikkila M, Prunskaitė R, Naillat F, Itaranta P, Vuoristo J, Leppaluoto J, et al. The partial female to male sex reversal in Wnt-4-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. *Endocrinology.* 2005 Sep;146(9):4016-23.
 35. Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature.* 1999 Feb 4;397(6718):405-9.
 36. Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Delot E, Chen XN, Dewing P, et al. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet.* 2001 May;68(5):1102-9.
 37. Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet.* 2001 Jul;28(3):216-7.
-

38. Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet.* 1999 Dec 3;87(4):349-53.
 39. Maciel-Guerra AT, de Mello MP, Coeli FB, Ribeiro ML, Miranda ML, Marques-de-Faria AP, et al. XX Maleness and XX true hermaphroditism in SRY-negative monozygotic twins: additional evidence for a common origin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Feb;93(2):339-43.
 40. Temel SG, Gulten T, Yakut T, Saglam H, Kilic N, Bausch E, et al. Extended pedigree with multiple cases of XX sex reversal in the absence of SRY and of a mutation at the SOX9 locus. *Sex Dev.* 2007;1(1):24-34.
 41. Piprek RP. Genetic mechanisms underlying male sex determination in mammals. *J Appl Genet.* 2009;50(4):347-60.
 42. Colvin JS, Feldman B, Nadeau JH, Goldfarb M, Ornitz DM. Genomic organization and embryonic expression of the mouse fibroblast growth factor 9 gene. *Dev Dyn.* 1999 Sep;216(1):72-88.
 43. Giri D, Ropiquet F, Ittmann M. FGF9 is an autocrine and paracrine prostatic growth factor expressed by prostatic stromal cells. *J Cell Physiol.* 1999 Jul;180(1):53-60.
 44. Kanda T, Iwasaki T, Nakamura S, Kurokawa T, Ikeda K, Mizusawa H. Self-secretion of fibroblast growth factor-9 supports basal forebrain cholinergic neurons in an autocrine/paracrine manner. *Brain Res.* 2000 Sep 8;876(1-2):22-30.
 45. Song J, Slack JM. XFGF-9: a new fibroblast growth factor from *Xenopus* embryos. *Dev Dyn.* 1996 Aug;206(4):427-36.
 46. Naruo K, Seko C, Kuroshima K, Matsutani E, Sasada R, Kondo T, et al. Novel secretory heparin-binding factors from human glioma cells (glia-activating factors) involved in glial cell growth. Purification and biological properties. *J Biol Chem.* 1993 Feb 5;268(4):2857-64.
 47. Tsai SJ, Wu MH, Chen HM, Chuang PC, Wing LY. Fibroblast growth factor-9 is an endometrial stromal growth factor. *Endocrinology.* 2002 Jul;143(7):2715-21.
 48. Miyamoto M, Naruo K, Seko C, Matsumoto S, Kondo T, Kurokawa T. Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the ninth member of the fibroblast growth factor family, which has a unique secretion property. *Mol Cell Biol.* 1993 Jul;13(7):4251-9.
 49. Barrionuevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J, Kist R, Taketo MM, Englert C, et al. Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod.* 2006 Jan;74(1):195-201.
-

50. Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VI, Lutzkendorf S, van de Kant HJ, Wegner M, et al. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development*. 2004 May;131(9):1891-901.
 51. Colvin JS, Green RP, Schmahl J, Capel B, Ornitz DM. Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell*. 2001 Mar 23;104(6):875-89.
 52. Kim Y, Capel B. Balancing the bipotential gonad between alternative organ fates: a new perspective on an old problem. *Dev Dyn*. 2006 Sep;235(9):2292-300.
 53. Schmahl J, Kim Y, Colvin JS, Ornitz DM, Capel B. Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development*. 2004 Aug;131(15):3627-36.
 54. Adams IR, McLaren A. Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development*. 2002 Mar;129(5):1155-64.
 55. Moniot B, Declosmenil F, Barrionuevo F, Scherer G, Aritake K, Malki S, et al. The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development*. 2009 Jun;136(11):1813-21.
 56. Cotton LM, O'Bryan MK, Hinton BT. Cellular signaling by fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) in male reproduction. *Endocr Rev*. 2008 Apr;29(2):193-216.
 57. Wu XL, Gu MM, Huang L, Liu XS, Zhang HX, Ding XY, et al. Multiple synostoses syndrome is due to a missense mutation in exon 2 of FGF9 gene. *Am J Hum Genet*. 2009 Jul;85(1):53-63.
 58. Chen TM, Kuo PL, Hsu CH, Tsai SJ, Chen MJ, Lin CW, et al. Microsatellite in the 3' untranslated region of human fibroblast growth factor 9 (FGF9) gene exhibits pleiotropic effect on modulating FGF9 protein expression. *Hum Mutat*. 2007 Jan;28(1):98.
 59. Chen TM, Hsu CH, Tsai SJ, Sun HS. AUF1 p42 isoform selectively controls both steady-state and PGE2-induced FGF9 mRNA decay. *Nucleic Acids Res*. 2010 Aug 16.
 60. DiNapoli L, Batchvarov J, Capel B. FGF9 promotes survival of germ cells in the fetal testis. *Development*. 2006 Apr;133(8):1519-27.
 61. Bowles J, Feng CW, Spiller C, Davidson TL, Jackson A, Koopman P. FGF9 suppresses meiosis and promotes male germ cell fate in mice. *Dev Cell*. 2010 Sep 14;19(3):440-9.
-

62. Miki T, Bottaro DP, Fleming TP, Smith CL, Burgess WH, Chan AM, et al. Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jan 1;89(1):246-50.
 63. Werner S, Duan DS, de Vries C, Peters KG, Johnson DE, Williams LT. Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand-binding specificities. *Mol Cell Biol*. 1992 Jan;12(1):82-8.
 64. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 Apr;16(2):139-49.
 65. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*. 1996 Jun 21;271(25):15292-7.
 66. Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet*. 1996 Apr;12(4):390-7.
 67. Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell*. 1996 Mar 22;84(6):911-21.
 68. Weinstein M, Xu X, Ohyama K, Deng CX. FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development*. 1998 Sep;125(18):3615-23.
 69. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*. 2001;2(3):REVIEWS3005.
 70. Bagheri-Fam S, Sim H, Bernard P, Jayakody I, Taketo MM, Scherer G, et al. Loss of *Fgfr2* leads to partial XY sex reversal. *Dev Biol*. 2008 Feb 1;314(1):71-83.
 71. Xu X, Weinstein M, Li C, Naski M, Cohen RI, Ornitz DM, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development*. 1998 Feb;125(4):753-65.
 72. Webster MK, Donoghue DJ. FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *Trends Genet*. 1997 May;13(5):178-82.
 73. Wilkie AO. Craniosynostosis: genes and mechanisms. *Hum Mol Genet*. 1997;6(10):1647-56.
-

74. Yang ZQ, Moffa AB, Haddad R, Streicher KL, Ethier SP. Transforming properties of TC-1 in human breast cancer: interaction with FGFR2 and beta-catenin signaling pathways. *Int J Cancer*. 2007 Sep 15;121(6):1265-73.
 75. Tannour-Louet M, Han S, Corbett ST, Louet JF, Yatsenko S, Meyers L, et al. Identification of de novo copy number variants associated with human disorders of sexual development. *PLoS One*. 5(10):e15392.
 76. Beleza-Meireles A, Lundberg F, Lagerstedt K, Zhou X, Omrani D, Frisen L, et al. FGFR2, FGF8, FGF10 and BMP7 as candidate genes for hypospadias. *Eur J Hum Genet*. 2007 Apr;15(4):405-10.
 77. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215.
 78. Sambrook J, Gething MJ. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*. 1989 Nov 16;342(6247):224-5.
 79. Sambrook J, Fritsch, E.F., Maniatis, T., editor. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor; 1989.
 80. Mendoza S, David H, Gaylord GM, Miller CW. Allelic loss at 10q26 in osteosarcoma in the region of the BUB3 and FGFR2 genes. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005 Apr 15;158(2):142-7.
 81. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jun 15;30(12):e57.
 82. Barbaro M, Balsamo A, Anderlid BM, Myhre AG, Gennari M, Nicoletti A, et al. Characterization of deletions at 9p affecting the candidate regions for sex reversal and deletion 9p syndrome by MLPA. *Eur J Hum Genet*. 2009 Nov;17(11):1439-47.
 83. Yamaguchi TP, Rossant J. Fibroblast growth factors in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev*. 1995 Aug;5(4):485-91.
 84. Thisse B, Thisse C. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol*. 2005 Nov 15;287(2):390-402.
 85. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*. Feb;10(2):116-29.
-

86. Prochazkova J, Kylarova D, Vranka P, Lichnovsky V. Comparative study of apoptosis-detecting techniques: TUNEL, apostain, and lamin B. *Biotechniques*. 2003 Sep;35(3):528-34.
 87. Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother*. 1998;52(6):252-8.
 88. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, et al. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem*. 1996 Sep;44(9):959-68.
 89. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*. 1995 May;21(5):1465-8.
 90. Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med*. 2003 Mar;32(3):125-38.
-