Felipe Martins Elias

Perfil de expressão plasmática dos microRNAs miR-200c e miR-210 em pacientes portadores de diferenças do desenvolvimento sexual (DDS) 46,XY de causa indeterminada

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

2020

Felipe Martins Elias

Perfil de expressão plasmática dos microRNAs miR-200c e miR-210 em pacientes portadores de diferenças do desenvolvimento sexual (DDS) 46,XY de causa indeterminada

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

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Elias, Felipe Martins

Perfil de expressão plasmática dos microRNAs miR-200c e miR-210 em pacientes portadores de diferenças do desenvolvimento sexual (DDS) 46,XY de causa indeterminada / Felipe Martins Elias. -- São Paulo, 2020.

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

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Sorahia Domenice.

Descritores: 1.Transtornos 46,XY do desenvolvimento sexual 2.Hipospadia 3.MicroRNAs 4.Processamento pós-transcricional do RNA 5.Homeobox 1 de ligação a e-box em dedo de zinco 6.Diagnóstico

USP/FM/DBD-244/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Agradecimentos

Muitos.

Mas breves:

Agradeço a minha orientadora Dra. Sorahia pelo acolhimento, que começou com uma conversa no corredor e deu origem a este trabalho, e pelos desafios constantes que mantém minha curiosidade acesa.

Agradeço a Dra. Berenice pela ajuda durante o desenvolvimento do trabalho, pelos conselhos e pelas dicas sempre bem-vindas.

Agradeço aos colegas de bancada do LIM42 pelo apoio constante, chás, cafés e comidinhas na copa. Em especial, a Anna, Bárbara e Thati.

Agradeço a Rossi por todos os cafés e por todo o cuidado comigo. A Mirian e Mari por me aguentarem. E todo pessoal que se envolveu direta e indiretamente com este trabalho ou comigo mesmo, Mara, Cidinha...

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio concedido no projeto 2018/02895-9.

Sobretudo agradeço aos meu pais pelo carinho e pelo apoio, principalmente nos momentos mais difíceis, em minha decisão de ser um cientista. Ao meu irmão por me fazer sentir forte e responsável desde sempre, mesmo que nem sempre eu seja.

E a Dedé, pela aventura.

SUMÁRIO

Lista de símbolos e abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de anexos

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Desenvolvimento sexual masculino normal em humanos	2
1.2. Classificação das diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY	4
1.3. Métodos diagnósticos utilizados na investigação dos pacientes com DDS 46,XY.	4
1.4. Síndrome da Insensibilidade aos Andrógenos	5
1.5. DDS 46,XY de causa não conhecida ou indeterminada	9
1.6. Regulação da expressão gênica.....	10
1.7. miRNAs: pequenos RNAs não codificantes de proteína	11
1.8. Os miRNAs no câncer de próstata	15
1.9. Expressão dos miRNAs no aparelho genital masculino	17
1.10. Os miRNAs no desenvolvimento sexual masculino e nas DDS.....	20
1.10.1. Os miRNAs relacionados a criptorquidia	20
1.10.2. Os miRNAs relacionados a hipospádia	23
1.11. miRNAs nos biofluidos	23
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	29

3.1. Principal.....	30
3.2. Detalhados	30
4. METODOLOGIA.....	31
4.1. Natureza do Estudo	32
4.2. Considerações Éticas	32
4.3. Critérios de seleção dos participantes	32
4.3.1. Grupo de pacientes DDS 46,XY	32
4.3.2. Grupo controle	33
4.3.2.1. Controles pós-púberes.....	33
4.3.2.2. Controles Pré-Púberes.....	34
4.4. Critério de seleção dos miRNAs	37
4.5. Coleta de amostras.....	39
4.5.1. Plasma.....	39
4.6. Extração e quantificação de RNA	39
4.7.1. Plasma.....	39
4.8. Transcrição Reversa (RT) e pré-amplificação (miR-Amp).....	40
4.8.1. RNA extraído do plasma.....	40
4.9. Reação de PCR em tempo real (qPCR).....	41
4.9.1. Análise de dados de RT-qPCR	42
4.10. Análise estatística	42
5. RESULTADOS	43
5.1. miRNAs selecionados	44
5.2. Análise da eficiência das reações, concentração e cDNA, e presença de hemólise no plasma.....	45

5.3. Análise do ΔC_t usando o miR-23a como referência	49
5.4. Análise da expressão plasmática de miR-200c intragrupos	51
5.5. Análise da expressão plasmática de miR-200c em controles Vs. pacientes DDS 46,XY	53
5.5.1. Pacientes DDS 46,XY pós-púberes classificados por EMS (PVG e MVG) Vs. Controles pós-púberes	53
5.5.2. Pacientes DDS 46,XY pré-púberes Vs. controles pré-púberes.....	53
5.5.3. Pacientes DDS 46,XY pós-púberes classificados em PVG Vs. pacientes pré-púberes DDS 46,XY Vs. Controles pré-púberes	53
5.6. Análise da expressão plasmática de miR-210 intragrupo	55
5.6.1. Pacientes DDS 46,XY pós-púberes classificados por EMS (PVG e MVG) Vs. Controles pós-púberes	56
5.6.2. Pacientes DDS 46,XY pós-púberes Vs. Controles pós-púberes	56
5.6.3. Pacientes DDS 46,XY pré-púberes Vs. controles pré-púberes.....	56
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÃO	77
7.1. Conclusão principal.....	78
7.2. Conclusão detalhada.....	78
8. REFERÊNCIAS	80
10. ANEXOS	87
11. APÊNDICES	95

Lista de símbolos e abreviações

AMH: Hormônio Anti-Mulleriano

AIS: Síndrome de Insensibilidade aos Andrógenos

AR: Receptor de Andrógenos

CAIS: AIS forma completa

cDNA: DNA complementar

Ct: Cycle threshold

DDS: Diferenças do Desenvolvimento Sexual

DHT: Di-hidrotestosterona

DICER: Double-Stranded RNA-Specific Endoribonuclease

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DROSHA: Droscha Ribonuclease III

FGF: Fator de Crescimento de Fibroblastos

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

HM: Hormônio Mulleriano

LH: Hormônio Luteinizante

miR-Amp: Reação de pré-amplificação do cDNA

miRNA: Micro RNA

mRNA: RNA mensageiro

NRxDx: Proteína/ Receptor Nuclear

Pb: Pares de Base

PAIS: AIS forma parcial

POLII: Enzima Polimerase 2

qPCR: Reação quantitativa de Cadeia Polimerase

RISC: Complexo Indutor de Silenciamento por RNA

RNA: Ácido Ribonucleico

RNAi: RNA de interferência

RT: Transcrição reversa

SD ou DP: Desvio padrão

SEM ou EMP: Erro médio padrão

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

tRNA: RNA de transporte

Wt: Selvagem

Lista de Anexos

Anexo A: Concentração de RNA e cDNA obtidas por diferentes métodos de quantificação ...	88
Anexo B: Comparação dos valores de Ct obtidos à partir de diferentes diluições do cDNA ..	89
Anexo C: Média de idade de pacientes e controles	90
Anexo D: Grafico da média de idades de Pacientes DDS 46,XY e Controles.....	91
Anexo E: Tabela com genes estudados no painel genômico para pacientes Portadores de DDS 46,XY	92
Anexo F: Estatística descritiva dos grupos para análise por $2^{-\Delta\Delta C_t}$	93
Anexo G: Estatística descritiva da análise de expressão absoluta dos miRNAs miR-200c e miR-210	94

Lista de Apêndices

Apêndice 1: Extração de RNA do plasma: Kit MagMAX mirVana Total RNA Isolation(Thermofisher).....	96
Apêndice 2: Quantificação de RNA e cDNA.....	98
Apêndice 3: Adição de cauda poli(A), Adaptador, transcrição reversa (RT) e pré-amplificação: kit Taqman Advanced miRNA Assays (Thermofisher)	99
Apêndice 4: Reação quantitativa de Polimerase Reversa em tempo real (qPCR).....	102
Apêndice 5: TCLE ilustrado.....	103
Apêndice 6: TCLE para coleta de sangue	105
Apêndice 7: TCLE para casos (coleta de material cirúrgico e sangue).....	107

Lista de Figuras

Figura 1: Etapas de transcrição e tradução e os processos de regulação em cada etapa do processamento do RNA.	11
Figura 2: Esquema da biogênese dos miRNAs e sua ação..	13
Figura 3: Análise dos Ct, obtido na reação de qPCR.	47
Figura 4: Análise de Δ Ct dos miRNAs miR-200c e miR-210, tendo o miR-23a como referência.	51
Figura 5: Análise da expressão plasmática do miR-200c intragrupos.....	52
Figura 6: Análise da expressão plasmática do miR-200c entre os grupos controle e pacientes DDS 46,XY.	54
Figura 7: Análise da expressão plasmática do miR-210 no grupo controle	55
Figura 8: Análise da expressão plasmática do miR-210 entre grupos.....	57
Figura 9: Número de publicações disponíveis em busca realizada na base PubMed.....	59
Figura 10: A. Concentração de RNA ou cDNA obtidos após extração de RNA do plasma e reação de pré-amplificação do cDNA	88
Figura 11: Análise de Ct de acordo com a diluição ou concentração de 1ng.....	89
Figura 12: Média e distribuição dos dados de idade nos grupos de pacientes (P+PP, subgrupos púberes P, e pré-púberes, PP) e controles.....	91

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação das Diferenças/Distúrbios da Determinação e Diferenciação Sexual 46,XY	6
Tabela 2: Estudos de miRNAs em órgãos do sistema genital masculino.....	22
Tabela 3: Principais estudos de miRNAs em anormalidades testiculares e hipospádia.....	26
Tabela 4: Dados clínicos dos pacientes DDS 46,XY de causa indeterminada.....	34
Tabela 5: Características clínicas dos pacientes portadores de DDS 46,XY.....	35
Tabela 6: Cálculo e nota do índice de virilização da genitália externa	36
Tabela 7: Dados dos miRNA selecionados para este estudo.....	44
Tabela 8: Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para valores de <i>Ct</i> dos miRNA controles, <i>miR-23a</i> (normalizador) e <i>miR-451</i> (controle de hemólise).....	48
Tabela 9: Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para valores de <i>Ct</i> dos miRNAs alvo deste estudo, <i>miR-200c</i> e <i>miR-210</i>	49
Tabela 10: Análise estatística do ΔCt do <i>miR-200c</i> e <i>miR-210</i>	50
Tabela 11: Resumo dos achos de trabalhos envolvendo o miRNA <i>miR-200c</i> no plasma em estudos de câncer.....	73
Tabela 12: Alvos do <i>miR-200c</i> em estudos de referência na literatura.....	75
Tabela 13: Idade média dos pacientes e controles.....	90
Tabela 14: Genes estudados no painel customizado de genes- alvos associados às DDS. Este painel foi elaborado a partir da ferramenta AgilentSure Design 2.0 (Agilent Technologies) e realizado pela plataforma Illumina.	92
Tabela 15: Estatística descritiva por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (<i>miR-200c</i>)	93
Tabela 16: Estatística descritiva por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (<i>miR-210</i>)	93
Tabela 17: Estatística descritiva da análise de expressão absoluta por $2^{-\Delta Ct}$ do <i>miR-200c</i> e do <i>miR-210</i>	94

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

Referências: ABNT, Autor (data).

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

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

Elias FM. *Perfil de expressão plasmática dos microRNAs miR-200c e miR-210 em pacientes portadores de diferenças do desenvolvimento sexual (DDS) 46,XY de causa indeterminada*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: As diferenças do desenvolvimento sexual (DDS) afetam 1:1000-4500 nascidos vivos e são definidos como alterações nas quais o desenvolvimento cromossômico, gonadal ou genital são atípicos. Os pacientes portadores de DDS 46,XY apresentam um amplo espectro fenotípico e muitos apresentam genitália atípica ao nascimento. A avaliação diagnóstica de um paciente portador de DDS inclui dosagens hormonais, estudos radiológicos, citogenéticos e moleculares. Porém, uma porcentagem significativa de pacientes permanece sem etiologia e são classificados como DDS de causa indeterminada. Este fato sugere que mecanismos epigenéticos, *i.e.*, não restritos ao DNA e, portanto, não contemplados por análises moleculares usuais, como sequenciamento tipo Sanger e Exoma, possam desempenhar um papel no seu desenvolvimento. **Objetivos:** Para melhor avaliar estes casos sem diagnóstico estabelecido, investigou-se neste projeto o perfil de expressão plasmático de microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs não codificantes de proteína, que se ligam por complementariedade a região 3'UTR de mRNA alvos, bloqueando a síntese proteica. **Metodologia:** Após análise *in silico* e da literatura os miRNAs, miR-200c, miR-210, e referências miR-23a e miR-451 foram selecionados. O RNA foi extraído do plasma de pacientes e controles, após análise de hemólise por absorbância em 414nm, com o kit MagMAX mirVana Total RNA (Thermofisher), a reação de RT-qPCR foi realizada com os kits TaqMan Advanced miRNA cDNA e Advanced miRNA Assay (Thermofisher). Os dados foram analisados por ΔCt e $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Pacientes e controles foram divididos em dois grupos, pré-púberes (de acordo com volume testicular <3ml e nível de Testosterona <30ng/dL) e, pós-púberes. Adicionalmente, os pacientes foram subdivididos em 2 subgrupos de acordo com o Escore de Masculinização da genitália Externa (EMS), em pouco virilizados (PVG, índice <5) e moderadamente virilizados (MVG, índice >5). Para análise de expressão por faixa etária os controles foram agrupados da seguinte maneira: 1-12 anos, 13-20 anos, 21-30 anos, 31-40 anos e 41-55 anos. **Resultados:** A expressão plasmática de miR-200c foi maior nos grupos de 13-20 a 41-55 anos do que no grupo de 1-12 anos (ANOVA $p=0.0067$). Adicionalmente, todos os grupos com mais de 13 anos tiveram médias individualmente maiores de miR-200c do que o grupo de 1-12 anos ($p<0.05$). A análise ANOVA dos grupos pós-púberes PVG, MVG e controles mostrou uma significância estatística $p=0.0013$, revelando uma expressão diferencial de miR-200c entre esses grupos. Em pós-púberes uma maior média de

expressão de miR-200c foi observada em MVG, com pós-teste de Tukey entre MVG e PVG de $p=0.01$. Pacientes pós-púberes tiveram maior expressão de miR-200c do que os pacientes pré-púberes ($p=0.0002$). Os pacientes pós-púberes PVG apresentaram valores de expressão de miR-200c semelhantes aos dos controles e DDS 46,XY pré-púberes. Em relação ao miR-210, a análise ANOVA de pós-púberes PVG, MVG e controles mostrou significância estatística de $p=0.005$, com MVG e PVG apresentando médias de expressão superiores ao grupo controle ($p=0.002$). O mesmo padrão foi observado em relação ao grupo pré-púberes ($p=0.022$).

Conclusão: Em vários tecidos, uma alça de retrocontrole negativo, no qual o miR-200c inibe a expressão de ZEB1 foi demonstrado e foi associado à modulação da transição epitelial-mesenquimal (EMT). Níveis elevados de ZEB1 associado a baixos níveis de miR-200c foram observados na pele genital de indivíduos adultos do sexo masculino e de ratos com hipospádia, reforçando um papel potencial do miR-200c no desenvolvimento da hipospádia. Nossas descobertas fornecem novas evidências sobre o miR-200c circulante, que pode representar uma nova estratégia para a pesquisa em DDS 46,XY, e contribuir para uma maior compreensão do processo de desenvolvimento da genitália externa masculina.

Descritores: Transtornos 46,XY do desenvolvimento sexual; Hipospádia; MicroRNAs; Processamento pós-transcricional do RNA; Homeobox 1 de ligação a e-box em dedo de zinco; Diagnóstico.

Elias FM. *Plasmatic expression profiles of microRNAs miR-200c and miR-210 in patients with differences of sexual development (DSD) 46,XY of unknown etiology* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Introduction: Differences of Sexual Development (DSD) affect 1: 1000-4500 live births and are defined as changes in which chromosomal, gonadal or genital development are atypical. Patients with 46,XY DDS have a broad phenotypic spectrum and many have atypical genitalia at birth. The diagnostic evaluation of a patient with DSD includes hormonal measurements, radiological, cytogenetic and molecular studies. However, a significant percentage of patients remain without etiology and are classified as DSD of unknown etiology. This fact suggests that epigenetic mechanisms, i.e. not restricted to DNA and, therefore, not contemplated by usual molecular analyzes, such as Sanger and Exoma sequencing, may play a role in its development. Objectives: In order to better evaluate these patients with unknown etiology, this project investigated the plasma expression profile of microRNAs (miRNAs), small non-coding protein RNAs, which bind complementarily to the 3'UTR region of target mRNA, blocking the protein synthesis. **Methodology:** *In silico* and literature analysis were used to select miRNAs miR-34c, miR-200c, miR-210, and references miR-23a and miR-451. RNA was extracted from the plasma of patients and controls with the MagMAX mirVana Total RNA kit (Thermofisher) after analysis of hemolysis by absorbance at 414 nm. RT-qPCR reaction was performed with the TaqMan Advanced miRNA cDNA and Advanced miRNA Assay kits (Thermofisher). The data were analyzed by ΔC_t and $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Patients and controls were divided into two groups, prepubertal (according to testicular volume <3ml and Testosterone level <30ng/dL), and post-pubertal group. Additionally, patients were subdivided into 2 subgroups according to the External Masculinization Score (EMS), into Poorly Virilized (PVG, score<5) and Moderately Virilized (MVG, score>5). For age expression analysis controls were grouped as follows: 1-12 years, 13-20 years, 21-30 years, 31-40 years and 41-55 years. **Results:** Plasma expression of miR-200c was higher in the groups aged 13-20 to 41-55 years than in the group aged 1-12 (ANOVA $p=0.0067$). In addition, all groups over the age of 13 had individually higher averages of miR-200c than the group aged 1-12 ($p<0.05$). ANOVA analysis of post-pubertal PVG, MVG and controls showed a statistical significance $p=0.0013$, revealing a differential expression of miR-200c between these groups. The highest mean of miR-200c expression was observed in post pubertal MVG group of patients, the Tukey's post-test between MVG and PVG showed $p=0.01$. Post pubertal patients had higher miR-200c expression than prepubertal patients

($p=0.002$). Post pubertal PVG patients showed miR-200c expression values similar to those of prepubertal 46, XY DSD and prepubertal controls. In relation to miR-210, ANOVA analysis of post pubertal PVG, MVG and controls showed statistical significance of $p=0.005$, with MVG and PVG presenting means of expression superior to the control group ($p=0.002$). The same pattern was observed in relation to the prepubertal group ($p = 0.022$). **Conclusion:** In several tissues, a negative feedback loop in which miR-200c inhibits ZEB1 expression has been demonstrated, and has been associated with modulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Elevated levels of ZEB1 associated with low levels of miR-200c have been observed in the genital skin of adult male individuals and rats with hypospadias, reinforcing a potential role of miR-200c in the development of hypospadias. Our findings provide new evidence on circulating miR-200c, which may represent a new strategy for research on 46,XY DSD, and contribute to better understand the development processes of the male external genitalia.

Descriptors: Disorder of sex development, 46,XY; Hypospadias; MicroRNAs; RNA processing, post-transcriptional; Zinc finger e-box-binding homeobox 1; Diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

Nos mamíferos, o desenvolvimento sexual constitui um processo complexo, que se inicia no período embrionário, continua na puberdade com a reativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e consequente secreção dos esteroides sexuais e fertilidade.

As diferenças ou distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) podem afetar até 1:4500 nascidos vivos e se referem às situações em que o sexo cromossômico, gonadal ou genital são atípicos (Ostrer, 2014).

As DDS podem se manifestar pela presença de atipia genital ao nascimento, o que dificulta a escolha do sexo de registro desses recém-nascidos. A impossibilidade de definir o sexo da criança no momento do nascimento é motivo de grande ansiedade e preocupação para os familiares. O diagnóstico precoce de uma criança portadora de DDS é fundamental para a obtenção de um bom resultado terapêutico e uma boa qualidade de vida para o paciente. Assim, a abordagem do paciente portador de DDS visa um diagnóstico rápido e seguro, por uma equipe multidisciplinar adequadamente preparada para oferecer a melhor orientação para a criança e sua família (Morel et al., 2002)

Alcançar este objetivo não é uma tarefa fácil, uma vez as DDS são condições altamente heterogêneas, sujeitas a múltiplos fatores moduladores (repressores/ativadores) genéticos e ambientais.

1.1. Desenvolvimento sexual masculino normal em humanos

O complexo processo do desenvolvimento sexual em mamíferos envolve inúmeros eventos que começam pela transformação de uma gônada embrionária indiferenciada em uma gônada diferenciada com morfologia e função de um testículo ou de um ovário; envolvem a síntese de diferentes hormônios hipofisários, das suprarrenais e das gônadas diferenciadas e a ação destes hormônios nos seus respectivos tecidos alvos.

O desenvolvimento sexual masculino é dividido didaticamente em duas etapas: determinação gonadal, na qual um grupo de genes atua promovendo a transformação da gônada embrionária bipotencial em testículo e a diferenciação sexual masculina, etapa em que se segue a formação do testículo e durante a qual ocorre o desenvolvimento das genitálias interna e externa masculina durante o período embrionário e das características sexuais secundárias masculinas e fertilidade a partir da puberdade.

No processo de diferenciação sexual masculina, os hormônios sintetizados pelos testículos, hormônio anti-mülleriano (HAM) e testosterona, participam ativamente da diferenciação da genitália interna do embrião. O HAM secretado pelas células de Sertoli promove a involução dos ductos de Müller e a testosterona, secretada pelas células de Leydig, age via o receptor androgênico (AR) na diferenciação dos ductos de Wolff nas estruturas masculinas, vesícula seminal, ducto deferente e epidídimo. O metabólito ativo da testosterona, a dihidrotestosterona (DHT) participa ativamente da formação da próstata e da diferenciação da genitália externa masculina durante o período embrionário. (Mendonca et al., 2016). Ambas, testosterona e DHT agem através da sinalização celular via Receptor de Andrógenos (AR) (Tanaka et al., 2014).

A deficiência na produção de testosterona ou na sua metabolização em DHT, assim como a falta da ação via AR nos tecidos alvos destes dois hormônios podem afetar o desenvolvimento normal da genitália interna e externa masculina na vida embrionária e das características sexuais secundárias na puberdade. Essas anormalidades determinam um amplo espectro fenotípico nos portadores de DDS 46,XY.

1.2. Classificação das diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY

Vários defeitos genéticos podem causar as DDS em pacientes 46,XY. Além das anormalidades envolvendo a formação do testículo fetal (anomalias da determinação testicular) as condições que determinam deficiência da produção de testosterona (DDS por anormalidades no receptor do LH/hCG, DDS por defeitos enzimáticos na síntese de testosterona), deficiência da ação dos andrógenos (DDS por insensibilidade aos andrógenos) e da metabolização da testosterona (DDS por deficiência da 5 alfa-redutase 2) constituem as principais etiologias dos DDS 46,XY (Bennett et al., 2010). Em um número significativo de pacientes, a origem da doença pode não ser esclarecida, sendo este grupo de pacientes classificados como portadores de DDS 46,XY de causa não conhecida ou indeterminada (Tabela 1) (Mendonca et al., 2009).

1.3. Métodos diagnósticos utilizados na investigação dos pacientes com DDS 46,XY

A avaliação diagnóstica de um paciente portador de DDS inclui além do exame clínico da anatomia genital, dosagens hormonais, estudos radiológicos, citogenéticos e moleculares. Em alguns casos, é necessária a exploração laparoscópica e/ou a histologia gonadal para estabelecer o diagnóstico.

A apresentação clínica e especialmente as características da genitália atípica dos pacientes DDS 46,XY usualmente não permitem por si só, que um diagnóstico etiológico seja estabelecido, uma vez que o espectro de subvirilização genital observado pode ser variável em uma mesma condição, podendo variar de uma genitália externa masculina com micro pênis, graus variáveis de atipia genital até uma genitália externa feminina com clitoromegalia. Diferentes graus de subvirilização da genitália externa também são observados em membros

afetados de uma família com DDS 46,XY, apesar da mesma variante alélica deletéria ser identificada nestes membros.

A ação de outros fatores com capacidade de modular os efeitos dessas variantes alélicas é uma hipótese para esta variabilidade fenotípica (Robveska et al., 2018) Metodologias de estudo genético-moleculares têm sido adotadas na prática clínica com a finalidade de diagnóstico e aconselhamento genético e têm possibilitado também a identificação de novas causas de DDS.

Dos testes genéticos disponíveis, a abordagem de um gene-candidato por sequenciamento pelo método de Sanger é o mais popular e permite confirmar o diagnóstico na maioria dos casos dos DDS por anormalidades da diferenciação sexual (defeitos de síntese do cortisol e da testosterona, insensibilidade aos andrógenos, defeito da enzima 5 α -redutase 2). A utilização de técnicas mais robustas como CGH-array e sequenciamento em larga escala (painéis de genes candidatos, exoma, genoma), ainda restrita a poucos centros, expande as possibilidades de identificação de desequilíbrios de dosagem de genes e da presença de variantes alélicas patogênicas no grupo de pacientes portadores de DDS de causa indeterminada e nos DDS por anormalidades da determinação gonadal. Porém, mesmo com a utilização dessas várias metodologias uma porcentagem significativa de pacientes com DDS permanece sem diagnóstico.

1.4. Síndrome da Insensibilidade aos Andrógenos

A Síndrome de Insensibilidade aos Andrógenos (AIS, do inglês Androgen Insensitivity Syndrome) constitui a causa mais frequente de DDS 46,XY. Doença de herança recessiva ligada ao X, afeta os indivíduos com genótipo 46,XY. Esta condição clínica decorre da incapacidade de resposta dos tecidos alvos/periféricos à ação dos andrógenos, secundariamente a alterações

funcionais do receptor de andrógenos, o que determina uma falha parcial ou total do processo de virilização genital intra-útero e durante o desenvolvimento puberal masculino (Arnhold et al., 2011).

Tabela 1: Classificação das Diferenças/Distúrbios da Determinação e Diferenciação Sexual 46,XY

Diferenças do desenvolvimento sexual por alterações do desenvolvimento gonadal

- Disgenesia gonadal 46,XY
- Forma completa e parcial
- Agenesia testicular
- Síndrome de regressão testicular embrionária
- Disgenesia gonadal 46,XY associada a quadros síndrômicos
- Hipoplasia das células de Leydig (Defeito no receptor LHCGR)

Diferenças do desenvolvimento sexual 46,XY associado a defeito na síntese de colesterol

- Síndrome de Smith-Lemli-Opitz

Defeito na síntese de testosterona

- Defeito afetando a esteroidogênese adrenal e o testicular
- Deficiência da proteína reguladora da esteroidogênese (*STAR*)
- Deficiência da P450 scc (*CYP11A*)
- Deficiência da 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo II (*HSD3B2*)
- Deficiência da 17 α -hidroxilase (*CYP17A1*)
- Defeito afetando a síntese de testosterona no testículo
- Deficiência da 17-20 liase (*CYP17A1*)
- Deficiência da 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase III (*HSD17B3*)
- Defeitos em proteínas doadoras de elétrons
- Deficiência da P450 oxidoreductase (*POR*)
- Defeito no citocromo b5 (*CYB5*)

Defeito na metabolização da testosterona

- Deficiência da 5 α -redutase 2 (*SRD5A2*)

Defeito na ação da testosterona

- Defeito no receptor androgênico (*AR*)
- Formas completa e parcial

Defeito na síntese ou ação do hormônio anti-mülleriano (*AMH* e *AMHR*)

DDS 46,XY associado ao baixo peso ao nascer

DDS 46,XY por ingestão materna de estrógenos e progestágenos

DDS 46,XY de origem indeterminada

Formas não classificadas no sexo masculino

- Síndrome da persistência dos dutos de Müller
 - Micropênis
 - Hipospadia
-

Adaptado do livro “Endocrinologia – Princípios e Prática”, 2ª edição, de Maciel, Rui M. B.; Mendonça, Berenice B.; Saad, Mario J. A. – Ed. Atheneu, 2017.

O gene do Receptor de Andrógenos (*AR*, do inglês *Androgen Receptor*) está localizado no cromossomo X, na região Xq11-12; é organizado em oito éxons e codifica uma proteína

com 910 aminoácidos. Esta proteína é um fator de transcrição ativado por hormônios esteroides e apresenta três domínios funcionais principais: um domínio N-terminal, um domínio de ligação ao DNA, e um domínio que se liga a andrógenos (Bennett et al., 2010).

A AIS é classificada de acordo com o fenótipo do paciente nas formas: completa (CAIS, do inglês *Complete Androgen Insensitivity Syndrome*), parcial (PAIS, do inglês *Partial Androgen Insensitivity Syndrome*), e ainda, uma forma mais branda (MAIS, do inglês *Mild Androgen Insensitivity Syndrome*).

Os pacientes portadores de CAIS apresentam genitália externa feminina, com ausência ou rarefação de pelos pubianos, vagina em fundo-cego e ausência de útero. Na puberdade, apresentam feminização, com desenvolvimento normal das mamas, distribuição de gordura corporal feminina, devido a aromatização periférica da testosterona produzida pelo testículo em estrógeno (Mendonça et al., 2010).

Os pacientes com PAIS podem apresentar um amplo espectro de genitália externa subvirilizada, variando da presença de hipospádia proximal até genitália masculina com micropenis, já os indivíduos portadores de MAIS apresentam genitália externa masculina, mas são inférteis (Mongan et al., 2015). Em ambas as condições, a presença de ginecomastia é descrita. Como a descida dos testículos ao escroto é mediada por andrógenos, os portadores de AIS geralmente apresentam testículos não descidos (criptorquidismo). Estes pacientes apresentam genitália interna masculina rudimentar pela ausência de ação da testosterona nos Ductos de Wolff e ausência de derivados Müllerianos (tubas uterinas, útero, cérvix, e terço superior da vagina), uma vez que a secreção e ação do HAM atuando na regressão dos Ductos de Müller é normal (MacLaughlin et al., 2004).

O perfil hormonal nos pacientes portadores de AIS indica a condição de resistência aos andrógenos e é caracterizado por níveis séricos elevados de testosterona e de LH. Em recém-

nascidos, níveis elevados de testosterona, associados a níveis elevados de AMH são indicativos de AIS e excluem o diagnóstico de disgenesia gonadal completa (Jorgensen, 2015).

Classicamente o diagnóstico de AIS é confirmado pela identificação de variantes alélicas deletérias no gene do AR (Tan et al., 2015). Cerca de 600 mutações no AR, localizadas em toda a extensão do gene, foram descritas (<http://www.mcgill.ca/androgendb>) (Gottlieb et al., 2012). O diagnóstico molecular é estabelecido na grande maioria dos pacientes com CAIS e em menor frequência nos pacientes com PAIS. Em alguns pacientes, variantes alélicas causadoras de doença não são identificadas, apesar da vasta pesquisa de anormalidades nas regiões exônicas, regiões de splicing alternativo e região promotora do AR (Melo et al., 2005 & Batista et al., 2019)

Dos 272 pacientes portadores de DDS 46,XY atendidos na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da USP (HC-FMUSP), centro de referência para o diagnóstico e tratamento de DDS, 92 pacientes são portadores de DDS 46,XY por insensibilidade aos andrógenos. Apenas 2% dos pacientes com fenótipo clínico e laboratorial de AIS da nossa coorte permanecem sem diagnóstico molecular. Dados da literatura relatam que até 30% dos pacientes classificados como “PAIS símiles” não tem uma variante alélica identificada no AR (Adachi et al., 2000 & Baxter et al., 2015).

Uma correlação perfeita entre fenótipo e genótipo em AIS não é observada e pacientes portadores de CAIS e de PAIS com a mesma variante alélica no AR são descritos na literatura (Batista et al., 2019). Uma hipótese proposta para tais achados, fenótipo de AIS sem anormalidade no AR identificada e fenótipos diferentes para a mesma mutação sugere a participação de corre reguladores (fatores ativadores ou repressores) do AR na modulação do fenótipo (Bennett et al., 2010 & Gerlach et al., 2011). Estas variabilidades fenotípicas podem ser observadas também em outras condições de DDS 46,XY e abrem perspectivas para o estudo de novas causas potenciais de DDS.

1.5.DDS 46,XY de causa não conhecida ou indeterminada

A presença de atipia genital ao nascimento é observada aproximadamente em 1:4500 recém-nascidos. No entanto, o diagnóstico molecular é estabelecido em apenas 20% de todos os casos de DDS e em algumas coortes de pacientes com DDS 46,XY até 50% dos pacientes são classificados como DDS de causa não conhecida ou indeterminada (Morel et al., 2002 & Hughes et al., 2006).

Da coorte de pacientes com DDS 46,XY atendidos na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento HCFMUSP, aproximadamente 22% do total são portadores de DDS 46,XY de causa indeterminada, ou seja, o diagnóstico permanece não determinado apesar dos estudos citogenéticos, hormonais e moleculares realizados na investigação diagnóstica.

Estes índices sugerem a existência de outros genes ainda não identificados e/ou outros mecanismos moleculares de regulação da expressão gênica, que poderiam participar do processo de determinação e diferenciação sexual, e estariam envolvidos na etiologia dos pacientes DDS 46,XY sem causa conhecida.

Mecanismos regulatórios epigenéticos tem um papel fundamental durante o desenvolvimento dos mamíferos (Nicoglou & Merlin, 2017). A desregulação epigenética emergiu como um mecanismo recorrente na etiologia das desordens do neurodesenvolvimento, bem como no desenvolvimento tumoral (Bouras et al., 2019). A investigação de vias de sinalização alternativas potencialmente envolvidas na regulação de genes que participam dos processos do desenvolvimento sexual são raras em pacientes com DDS 46,XY, embora o papel da regulação epigenética já tenha sido demonstrada no processo de determinação sexual em mamíferos (Lee et al., 2019).

1.6. Regulação da expressão gênica

A informação codificada em genes ou em sistemas gênicos que resultará em um produto (proteína funcional) ou em uma função determinada é regulada por diferentes mecanismos. Várias etapas na expressão dos genes podem ser reguladas: transcrição (DNA para RNA); processamento do RNA (pós-transcricional); tradução (mRNA para proteína); alterações nas proteínas (pós-traducional).

Modificações nas sequências do DNA assim como mecanismos epigenéticos podem interferir e regular a expressão gênica. A transcrição é regulada através de sequências regulatórias denominadas sequências promotoras. Estas sequências estão localizadas habitualmente no início da região codificante do gene que sofre a regulação. A ligação de complexos de proteínas, os fatores de transcrição, a esses promotores pode levar ao aumento ou à diminuição da expressão do gene, dependendo da situação. A transcrição também pode ser regulada através de modificações epigenéticas. As modificações epigenéticas incluem alterações da cauda N-terminal das histonas, metilação do DNA, remodelação da cromatina e regulação do DNA pela expressão de RNAs não codificantes. A metilação do DNA e acetilação/desacetilação das histonas levam a alterações na cromatina e, conseqüentemente, na conformação tridimensional da molécula de DNA, o que impossibilita ou facilita o acesso dos fatores de transcrição aos promotores, o que pode resultar em silenciamento do gene, ou ao contrário, na ativação do mesmo em uma célula (Bouras et al., 2019).

Por outro lado, mecanismos pós-transcricionais regulam a expressão proteica e seu desequilíbrio pode resultar em alterações em vias de sinalização fundamentais na regulação da homeostase celular (figura 1). Os principais agentes pós-transcricionais são os microRNAs (miRNAs), presentes em todos os tecidos e fluídos corporais e largamente estudados em patologias como o câncer (Bartel et al., 2004), devido a essa capacidade de regular vias de sinalização da própria célula (regulação autócrina), de células vizinhas (regulação parácrina) e

de células distantes (regulação endócrina), pois podem ser exportados no interstício em microvesículas ou associados a proteínas (Mitchell et al., 2008).

Figura 1: Etapas de transcrição e tradução e os processos de regulação em cada etapa do processamento do RNA.

1.7. miRNAs: pequenos RNAs não codificantes de proteína

Os miRNAs são pequenos RNAs endógenos não codificantes, formados por cerca de 20 a 25 nucleotídeos. Estes RNAs interagem com o segmento 3'UTR de mRNAs por complementariedade em um processo que envolve o complexo proteico RISC (do inglês, *RNA Induced Silencer Complex*), alterando quantitativamente a expressão proteica e são fundamentais reguladores pós-transcricionais (figura 2). Sua biogênese é semelhante à de RNAs codificantes. A partir de uma sequência promotora, a RNA polimerase II (RNA POLII) transcreve o miRNA que, após esse processo, passa a ser denominado pri-miRNA (pri =

primário). Este pri-miRNA contém a cauda poli A, na extremidade 3', e o componente CAP, na extremidade 5', fatores fundamentais que inibem a degradação, e assume uma conformação semelhante ao um grampo (*hairpin*) sendo a extremidade da dobra do grampo (*loop*) formada por nucleotídeos que não interagem entre si por complementaridade, mas são essenciais para a manutenção da estrutura secundária do miRNA. Ainda no núcleo o pri-miRNA é processado pela DROSHA (do inglês, Droscha Ribonuclease III), responsável por remover as extremidades 5' e 3' do pri-miRNA, que passa a ser denominado pré-miRNA (pré = precursor). O pré-miRNA contém as fitas 5p e 3p (complementares) e o *loop* entre estas mantendo a conformação de grampo. Este é então exportado para o citoplasma através de um complexo de proteínas denominadas Exportinas. No citoplasma o *loop* é removido pela enzima DICER (do inglês, *Double-Stranded RNA-Specific Endoribonuclease*), uma endonuclease que cliva a dupla fita de DNA, e as fitas complementares 5p e 3p são separadas e capturadas no complexo RISC (do inglês, *RNA Induced Silencing Complex*). O processo pelo qual apenas uma das fitas é selecionada ainda é desconhecido. O complexo resultante, RISC/miRNA, interage – principalmente – com a região 3'UTR de mRNAs alvo, bloqueando a tradução proteica (Wightman et al., 1993).

Apesar de atual os primeiros estudos começam depois de uma análise pioneira de Lee e Feinbaum (1993) que revelaram que o *lin-4*, um gene até então conhecido por sua ação reguladora no desenvolvimento larval de *C. elegans*, não era um codificante proteico. Em seguida, Wightman (1993) revelou que os RNAs do *lin-4*, formado por aproximadamente 22 nucleotídeos, apresentavam várias regiões de complementariedade com a região 3'UTR do gene *lin-14*, propostas como regiões reguladoras.

Figura 2: Esquema da biogênese dos miRNAs e sua ação. Em 1, quando o pareamento da região *seed* do miRNA é completo na região de interação na 3'UTR do mRNA, denominado pareamento perfeito, há a degradação do mRNA. Em 2, quando o pareamento não é perfeito, o complexo RISC/miRNA pode ser removido posteriormente, não havendo degradação do mRNA e, sendo retomada a etapa de tradução. A estrutura secundária clássica em formato de grampo (*hairpin*) é observada a partir da formação do pri-miRNA, até a clivagem do *loop* pela enzima DICER no citoplasma. n - núcleo, c - citoplasma.

Wightman (1993), demonstrou a importância desta complementariedade entre os dois genes, provando experimentalmente que a redução da expressão proteica de LIN-14 ocorria sem alteração dos níveis de expressão do mRNA de *lin-14*, sugerindo um processo regulatório pós-transcricional. Como não havia evidência da ocorrência de outras regiões propostas para interações semelhantes (em nematoides ou em outro organismo), sete anos se passaram até a descoberta de outro gene regulatório, também formado por aproximadamente 22 nucleotídeos,

em *C. elegans*, o *let-7* (Reinhart et al., 2000). Posteriormente, homólogos do gene *let-7* foram identificados em humanos.

Interessantemente os RNAs destes genes apresentavam características semelhantes as observadas por Feinbaum (1993), consistiam de cerca de 22 nucleotídeos, eram endógenos e geralmente conservados evolutivamente (Pasquinelli et al., 2000).

Para catalogar estes novos genes, um banco de dados foi construído por Ambros (2004). Os programas que utilizamos neste trabalho, e que são a base bioinformática do estudo de miRNAs e mRNAs alvo, são adequações subsequentes desta base de dados.

A partir dos primeiros catálogos desenvolvidos para arquivar os miRNAs descritos e facilitar o acesso aos dados, softwares foram criados com o objetivo de auxiliar a pesquisa dos miRNAs. Estes softwares foram então associados a bancos de dados públicos e disponibilizados gratuitamente na rede. Baseados em análise de comparação a linguagem e interface destes programas foram adaptadas para o uso regular da comunidade científica. Estes programas, como o MirBase, o TargeScan Human e o miRNA.org, comparam a região de interação dos miRNAs, denominada *seed*, e composta por 6-8 nucleotídeos em média, a 3'UTR de diversos genes, uma análise denominada pareamento por predição *in silico* (Bartel et al., 2004).

Uma característica importante dos miRNAs que os diferenciam dos clássicos RNA de interferência (siRNAs) foram descritas por Ambros (2004). Além do já descrito, Ambros postulou que os miRNAs são processados a partir de transcritos capazes de gerar estruturas do tipo *hairpin* localmente no RNA, formam apenas um pre-miRNA por transcrito e suas sequências são bem conservadas em organismos evolutivamente próximos.

Já os siRNAs são geralmente derivados de mRNAs, transposons, vírus ou DNA heterocromático, e são processados a partir de duplexos de RNA longos ou *hairpins* extensos, sendo que vários duplexos de siRNA podem ser gerados a partir de cada molécula precursora

de siRNA, gerando diferentes siRNAs (Lagos-Quintana et al., 2001). Posteriormente, foi descrito por Lim (2003) que uma minoria dos genes dos miRNAs estava situada em regiões intrônicas de mRNAs, sugerindo que alguns miRNAs podem ser processados a partir de íntrons, como alguns pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs). Este mecanismo sugere que um gene codificante pode ser alvo de um miRNA intrônico presente na própria sequência do mRNA.

Adicionalmente, movendo o foco para a expressão dos miRNAs, vários experimentos descreveram os miRNAs como pequenos RNAs temporários (small temporary RNAs, stRNAs), devido a um mecanismo de ação paralelo em que os miRNAs interagem fracamente com a região 3'UTR de mRNAs alvo, bloqueando temporariamente a expressão proteica, mas não dirigindo este complexo miRNA/mRNA à degradação (Lim et al., 2003).

Mais detalhadamente, quando o miRNA se associa ao complexo proteico RISC no citoplasma, sua região de complementariedade, especifica o sítio de clivagem na 3'UTR do mRNA alvo, precisamente, entre os nucleotídeos 10 e 11 do miRNA. Neste caso apenas o mRNA é clivado e o complexo RISC-miRNA continua funcional. Se esta região do miRNA não tem complementariedade suficiente a clivagem não ocorre, mas pode haver um controle temporal sobre a expressão do mRNA alvo. Portanto a ação de clivagem é dependente do miRNA e não é exclusiva ao pareamento mRNA-miRNA (Lee e Ambros, 2001).

1.8. Os miRNAs no câncer de próstata

Vários estudos têm relacionado a expressão de miRNA na promoção e progressão de tumores (Ostling et al., 2011). No aparelho genital masculino a participação dos miRNAs no câncer de próstata tem sido estudada com frequência. No câncer de próstata (CPA) a sinalização via AR é importante para a manutenção e o desenvolvimento tumoral, e tem despertado

interesse como um possível alvo terapêutico. Buscando caracterizar os miRNAs envolvidos na regulação do AR no câncer de próstata, Ostling (2011), analisaram a expressão de 1129 miRNAs a partir da transfecção de bibliotecas gênicas em linhagens celulares de CPA. Paralelamente, a expressão proteica do AR foi quantificada nestas mesmas linhagens. A partir da relação da expressão de miRNAs e da proteína do AR foram selecionados 71 miRNAs para subsequente ensaio de validação *in vitro*. Ensaios de luciferase repórter validaram 13 dos 71 miRNAs previamente selecionados, todos com alvo na região 3'UTR do mRNA do AR: miR-9, miR-34a, miR-34c, miR-135b, miR-185, miR-297, miR-299-3p, miR-371-3p, miR-421, miR-449a, miR-449b, miR-634 e miR-654-5p. Posteriormente a análise de miRNA no tecido tumoral de CPA confirmou a relação inversa de miR-34a e miR-34c e os níveis proteicos de AR.

Em outra abordagem envolvendo um conjunto de miRNAs, Coarfa (2016), construiu um painel baseado na baixa expressão de 12 miRNAs no CPA metastático. Em um experimento utilizando linhagens celulares de CPA denominadas LNCAP e VCAP, os miRNAs do painel, miR-1, miR-24-1-5p, miR-31, miR-133-a, miR-133b, miR-135a, miR-143-3p, miR-205, miR-221-3p, miR-221-5p, miR-222-3p foram silenciados em conjunto através da transfecção transiente de moléculas denominadas antimiRs (miRVana-antimiR, ThermoFisher), que interagem com os miRNAs complementares e bloqueiam sua ação, resultando na alteração dos níveis proteicos de AR e seus coativadores, SRC-1, SRC-2 e SRC-3. Apesar de não haver uma correlação inversa forte de cada um dos miRNAs do painel e os níveis proteicos, o grupo encontrou forte relação entre os níveis do miR-135a e andrógenos.

Outros miRNAs foram validados por diferentes grupos sugerindo fortemente a participação direta ou indireta dos miRNAs na tumorigênese da próstata. Dentre os miRNA relacionados neste processo estão: miR-488* como regulador do AR (Sikand et al., 2011), o miR-185 como regulador de BRD8 ISO2, um co-ativador do AR (Jiang et al., 2015). Além

desses, miR-30b (Kumar et al., 2016), miR-34a (Kashat et al., 2012), miR-145 (Larne et al., 2015), miR-185 (Qu et al., 2013), miR-205 (Hagman et al., 2013), miR-371 (Leite et al., 2015) são reportados repetidamente com baixos níveis de expressão gênica no CPA e apresentam o AR como alvo predito.

1.9. Expressão dos miRNAs no aparelho genital masculino

Alguns estudos têm demonstrado a expressão de diferentes miRNAs em vários órgãos do aparelho genital masculino, bem como o papel regulatório de miRNAs nas células testiculares de Sertoli e Leydig. No entanto, a compreensão do exato papel destes miRNAs nestes tecidos ainda é escassa.

Em um estudo de 2013 de Ma, foram analisados microarrays de miRNAs de amostras do epidídimo de camundongos (*Mus musculus*) normais e observado que a expressão gênica do miR-29a era inferior a dos controles endógenos. A análise da região promotora deste miRNA revelou a presença de Regiões Responsivas a Andrógenos (ARE), sugerindo que a sinalização via AR poderia alterar os níveis de miR-29a. O modelo de expressão elevada deste miRNA resultou em epidídimo menor, semelhante aos apresentados em camundongos com defeitos na sinalização via AR. Apesar de não apresentar alvo direto no AR, o miR-29a tem como alvo os mRNAs de *IGF1* e *p53*. IGF1 é uma proteína relacionada à sinalização via insulina e atua no desenvolvimento celular, a p53 é uma proteína antitumoral bem descrita e que também apresenta papel na manutenção do desenvolvimento e metabolismo celular.

Buscando avaliar miRNAs que pudessem estar envolvidos no desenvolvimento das células de Leydig, Liu (2014), utilizou um modelo animal com ratos (*Rattus norvegicus*). A expressão gênica de 677 miRNAs foi aferida através do uso de *microarrays* de miRNA em cultura celular de túbulo seminífero de rato. O grupo observou que alterações na expressão dos

miRNAs miR-29a, miR-29c, miR-142-3p, e miR-451 and miR-335 eram moduladas pelo fator de crescimento de fibroblastos (bFGF) e poderia estar relacionada a inibição da produção de testosterona estimulado por LH. Dos 677 miRNAs avaliados no *microarray*, os miRNAs, miR-29a, miR-29c, miR-142-3p, e miR-451 apresentaram expressão gênica inferior à dos controles não tratados com bFGF e/ou LH, e o miR-335, apresentou expressão gênica maior. Apesar de não apresentar validação para os miRNAs selecionados, o estudo sugere que estes miRNAs possam estar envolvidos em mecanismos regulatórios da produção de esteróides pelas células de Leydig. A análise destes miRNAs no TargetScan para espécie humana mostra que o miR-29a tem como alvo predito o AR, sendo um miRNA de interesse para nosso estudo. O miR-142-3p não teve alvos no mRNA do AR, mas sua fita complementar miR-142-5p sim, dado a biogênese e processamento dos miRNAs o que pode torná-lo de interesse para nosso estudo, após outras análises *in silico*. Adicionalmente o miR-142-3p apresenta alvo em mRNAs de fatores de transcrição importantes como o NR3C1 (Receptor de Glucocorticóides/ Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1), NR5A2 (Fator de transcrição do tipo “zinc finger”/ Nuclear Receptor Subfamily 5, Group A, Member 2), e NR1D2 (Receptor nuclear de hormônios/ Nuclear Receptor Subfamily 1, Group D, Member 2), este último validado recentemente por Zheng (2016) como alvo do miR-210 e relacionado a criptorquidia. O miR-451 não apresenta alvo em componentes importantes da via AR e o miR-335 apresenta alvos para o mRNA de AR.

Em relação às células de Sertoli, Abu-Halima (2014) analisou dados de *microarrays* de miRNA, realizados com esperma de doadores e pacientes, e compararam os perfis de expressão de miRNAs em homens inférteis diagnosticados com diferentes patologias, tais como; Síndrome de células de Sertoli, Atrofia Testicular Mista, e Infertilidade relacionada as células germinativas. Os miRNAs presentes nas três patologias e que apresentaram variação da expressão gênica comparados ao grupo controle foram os miRNAs, miR-34b, miR-34c-5p,

miR-449a, miR-449b*, miR-517b e miR-129-3p. A expressão gênica destes miRNAs é menor nas amostras dos pacientes com estas patologias em relação ao grupo controle. O estudo não apresenta validação dos miRNAs ou alvos selecionados, mas é interessante que em três patologias que determinam quadro de infertilidade esse grupo de miRNAs seja comum. No TargetScan Human, o miR-34b (3p), o miR-34c-5p e o miR-449 estão descritos como um *cluster*, portanto, podem ser expressos em conjunto, sendo o AR um alvo em comum.

Apesar de não estarem envolvidos na regulação do AR, direta ou indiretamente, outros miRNAs, também já foram descritos como reguladores do desenvolvimento das células de Sertoli e podem ser regulados por FSH, testosterona ou 17 β -estradiol; miR-133b, miR-202-5p, miR-23b (regulado por FSH), miR-471 (regulado por testosterona), miR-1285 (regulado por 17 β -estradiol) (Procópio et al., 2017). Os miRNAs miR-133b e miR-202-5p foram descritos em modelos de estudo com linhagens celulares humanas, e estão relacionados a regulação da proliferação em células de Sertoli, podendo desempenhar um papel importante na espermatogênese e fertilidade.

Outro estudo importante sobre a influência de miRNAs nas células de Sertoli, foi realizado por Ma (2016), validando o miR-762 como regulador do mRNA de RNF4 (Regulador transcricional/ *Ring Finger Protein 4*), um regulador da transcrição que atua na via AR, impactando a expressão de genes relacionados ao AR, tais como: ciclina B1, FKBP5 e TMPRSS2. Estes genes estão envolvidos na regulação da proliferação e inibição da apoptose das células de Sertoli. Apesar de ter sido utilizado um modelo de estudo de linhagens celulares de porco (*Sus verrucosus*), este miRNA pode apresentar alvos conservados em humanos, sendo o estudo *in silico* subsequente essencial.

1.10. Os miRNAs no desenvolvimento sexual masculino e nas DDS

Os miRNAs representam possíveis reguladores de genes envolvidos no processo de desenvolvimento sexual, portanto, podem representar potenciais fatores etiológicos das DDS e moduladores do fenótipo genital dessas condições.

1.10.1. Os miRNAs relacionados a criptorquidia

Em um estudo de 2014, Moritoki analisou *microarrays* de miRNA de amostras de testículos criptorquídicos de ratos. Em relação ao grupo normal (testículos tópicos) e a amostras dos testículos contralaterais não criptorquídicos a expressão do miR-135a era menor nas amostras de testículos criptorquídicos. Análises *in silico* apontaram o Fox01, um fator de transcrição, como alvo potencial do miR-135a (Moritoki et al., 2014).

Para validar essa hipótese, foi estabelecida uma linhagem celular de espermatogônias, em que foi transfectado o miR-135a. Nessa linhagem, a expressão de miR-135a resultou em repressão da expressão de Fox01. Análise do TargetScan Human para o miR-135a revela o AR como alvo predito.

Em uma abordagem semelhante, Zheng (2016) analisou *microarrays* de miRNAs de amostras de testículos de homens inférteis, identificando o miR-210 altamente expresso nestas amostras em relação às amostras testículos de homens com fertilidade normal. Posteriormente, o mesmo padrão foi também encontrado em amostras de testículos criptorquídicos. Para validar o miR-210 foi realizado ensaio *in vivo* em camundongo (*Mus musculus*) e *in vitro* (linhagem celular/*Mus musculus*) com quantificação proteica dos principais alvos preditos *in silico* para o miR-210.

O grupo demonstrou que o miR-210 tinha como alvo o mRNA de *NR1D2*. A NR1D2 é uma proteína da família dos receptores de hormônio nucleares, capaz de atuar na sinalização da via hormônios esteróides, no metabolismo lipídico e também como fator de transcrição. A análise do miR-210 no banco de dados de miRNA/mRNA alvo do TargetScan Human não apresenta o AR como alvo direto do miR-210. Zheng (2016) também propõe que, a partir destas descobertas, o miR-210 possa ser utilizado como marcador biológico (biomarcador) para criptorquidia em testes clínicos.

Tabela 2: Estudos de miRNAs em órgãos do sistema genital masculino

Autor (ano)	Tecido estudado	Técnica utilizada	miRNA diferentemente expressos	Resultados observados	Potenciais alvos preditos para humanos no TargetScan Human
Ma (2013)	Epidídimo de camundongos	<i>microarrays</i> de miRNA	miR-29a	Sinalização via AR poderia alterar os níveis de miR-29a	IGF1 e p53
Liu (2014)	Culturas de células de túbulos seminíferos de ratos	<i>microarrays</i> de miRNA	miR-29a, miR-29c, miR-142-3p, miR-451 e miR-335	miRNAs poderiam participar de mecanismos regulatórios da esteroidogênese pela célula de Leydig	bFGF, AR (miR-29a e miR-335), NR1D2 (miR-142)
Abu-Halima (2014)	Esperma de homens inférteis e controles	<i>microarrays</i> de miRNA e RT-qPCR	miR-34b, miR-34c-5p, miR-449a, miR-449b, miR-517b e miR-129-3p	Diferenças nos padrões de expressão dos miRNAs em homens inférteis e controles férteis	AR (<i>cluster</i> de miRNAs miR-34bc e miR-449)
Ma (2016)	Linhagem celular de Sertoli de porcos	RT-qPCR	miR-762	Interfere na expressão de genes relacionados ao AR, como: ciclina B1, FKBP5 e TMPRSS2. Estes genes estão envolvidos na regulação da proliferação e inibição da apoptose das células de Sertoli	RNF4

1.10.2. Os miRNAs relacionados a hipospádia

A presença de hipospádia é um achado frequente em pacientes com DDS 46,XY e resulta da ação androgênica deficiente com consequente subvirilização genital. Para avaliar a influência dos miRNAs nesta condição de anormalidade da virilização genital, Qian (2016) realizou uma análise da literatura e selecionaram o miR-200c como candidato, baseados nos alvos validados para este miRNA.

O miR-200c tem como alvo o mRNA de ZEB1 (Fator de transcrição/ *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*), um repressor transcricional, e também está relacionado a sinalização via TGF-B/SMAD3, fatores importantes que, em conjunto, tem um papel no desenvolvimento da fibrose uretral. Análise de amostras de tecido genital de ratos com hipospádia e de linhagem celulares derivadas destes animais revelou baixos níveis de expressão gênica do miR-200c, em relação a amostras de animais controles. Paralelamente, a expressão proteica de ZEB1, TGF-B e SMAD3 era elevada no grupo de animais com hipospádia.

A validação de ZEB1 como alvo do miR-200c, foi realizada em linhagem celular de rato utilizando ensaios de luciferase repórter. Este estudo propõe também uma nova forma de se estabelecer graus de hipospádia, baseado nos níveis de expressão do miR-200c. Adicionalmente, a análise do TargetScan Human mostra que o ZEB1 é um alvo conservado do miR-200c na espécie humana.

1.11. miRNAs nos biofluidos

Os miRNAs já foram detectados em vários biofluidos por Mitchell (2008), como plasma, soro, saliva e urina, e sugeridos como marcadores biológicos de diversas patologias, e também em sangue, saliva, lágrimas, urina, líquido amniótico, colostro, leite materno, secreções brônquicas, líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido peritoneal, líquido pleural e líquido seminal por Weber (2010). Na circulação sanguínea, os miRNAs são exportados em

microvesículas ou ligados a proteínas carreadoras denominadas Argonautas. Desta forma são protegidos da ação de RNAses e são altamente estáveis (Komatsu et al., 2011). Adicionalmente, El-mogy (2018), mostrou que a maior disponibilidade, em número, de miRNAs era encontrada no plasma, em relação ao soro, urina, saliva e sangue total. A estabilidade e abundância da circulação de miRNAs em biofluidos, como soro e plasma, são os principais fatores que contribuem para seu uso como potenciais biomarcadores de doenças (Max et al., 2018). A detecção de perfis de microRNAs em amostras biológicas pode ser uma importante ferramenta na pesquisa clínica para o desenvolvimento de biomarcadores diagnósticos para doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, câncer entre outras (Kumar et al., 2016).

No campo da endocrinologia, os miRNAs aparecem como uma ferramenta valiosa no diagnóstico de doenças endócrinas pela sua especificidade e por oferecer a possibilidade de um diagnóstico de maneira não invasiva (Butz et al., 2016). A exemplo, Zampetaki (2010), observou que a diminuição dos níveis plasmáticos dos miRNAs miR-15a, miR-29b, e principalmente do miR-126, eram associados a estágios iniciais da diabetes tipo 2. Posteriormente, Zhong (2011) demonstrou que o perfil de expressão plasmática de nove miRNAs era alterado em pacientes com diabetes do tipo 2 em relação a controles. Em análise de soro de crianças recém-diagnosticadas com diabetes do tipo 1, Nielsen (2012) observou aumento no perfil de expressão de doze miRNAs, sendo o miR-25 positivamente relacionado ao controle glicêmico e sugerido como marcador.

Nas síndromes metabólicas, Vickers (2011) reportou que o perfil de miRNAs de controles é diferente daquele observado em pacientes portadores de hipercolesterolemia, sendo que alterações na expressão dos miRNAs miR-223 e miR-375 foram consistentemente observadas entre esses grupos. Em outro estudo, os miRNAs, miR-197, miR-23a e miR-509 foram relacionados a dislipidemia, já os miRNAs miR-130 e miR-195, a variação da pressão sanguínea e hipertensão por Karolina (2012). Ainda, um painel mostrando a alteração do perfil

de expressão plasmática de sete miRNAs, foi apresentado por Prats-Puig (2013) em um estudo sobre obesidade infantil, sugerindo que a alteração da expressão destes miRNAs é associada a obesidade em crianças, principalmente do miR-130b. Esses dados demonstram que o estudo de miRNAs é promissor e pode ajudar no diagnóstico preciso de doenças endócrinas.

Tabela 3: Principais estudos de miRNAs em anormalidades testiculares e hipospádia

Autor (ano)	Tecido estudado	Técnica utilizada	miRNA selecionado	Resultados observados	Alvos
Moritoki (2014)	Amostras de testículos criptorquídicos Vs tópicos (ratos)	<i>microarrays</i> de miRNA e RT-qPCR	miR-135a	Reduzida expressão do miR-135a em amostras de testículos criptorquídicos de ratos.	AR
Zheng (2016)	Amostras de testículos de homens inférteis Vs testículos de homens com fertilidade normal	<i>microarrays</i> de miRNA e RT-qPCR	miR-210	O miR-210 é altamente expresso nas amostras de testículos de homens inférteis.	NR1D2
Qian (2016)	Tecidos hipospádicos de camundongos e linhagem celular derivada Vs controle normal	RT-qPCR	miR-200c	Reduzida expressão do miR-200c em amostras de hipospádias de ratos e linhagens celulares derivadas.	ZEB1

2. JUSTIFICATIVA

O papel regulatório pós-transcricional exercido pelos miRNAs no processo de virilização da genitália externa masculina ainda é pouco conhecido. A investigação de alterações nos padrões de expressão de miRNAs apresenta-se como uma nova estratégia na pesquisa das DDS 46,XY, que poderá contribuir para a obtenção de dados inéditos na compreensão do desenvolvimento sexual bem como o desenvolvimento de biomarcadores diagnósticos para pacientes portadores de DDS 46,XY sem diagnóstico estabelecido.

3. OBJETIVOS

3.1. Principal

Analisar o perfil plasmático de expressão dos miRNAs selecionados como candidatos em pacientes portadores de DDS 46,XY indeterminado e comparar ao perfil observado em controles masculinos.

3.2. Detalhados

3.2.1. Analisar bancos de dados de miRNAs e a literatura médica em busca de miRNAs candidatos, que possam estar associados às Diferenças do desenvolvimento sexual 46,XY e anormalidades da formação da genitália externa masculina.

3.2.2. Analisar a presença de miRNAs no plasma de pacientes portadores de DDS 46,XY e controles, nas condições pré-púberes e pós-púberes.

3.2.3. Relacionar os perfis de expressão dos miRNAs selecionados ao escore de virilização da genitália externa dos pacientes portadores de DDS 46,XY.

3.2.4. Avaliar o papel dos miRNAs selecionados na regulação de processos envolvidos no desenvolvimento da genitália externa masculina normal e atípica

4. METODOLOGIA

4.1. Natureza do Estudo

Trata-se de um estudo exploratório. Ainda não há na literatura dados relacionando a ação de miRNAs como causa das DDS.

4.2. Considerações Éticas

Este projeto foi aprovado na Plataforma Brasil (CAAE 90497318.0.0000.0068) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (nº 5670). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado pelos pacientes e controles ou seus responsáveis, que aceitaram participar deste estudo (Apêndice 5-7). Todos os pacientes foram acompanhados na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do HC-FMUSP e os procedimentos cirúrgicos de genitoplastia masculinizante foram realizados no período de 2018 a 2019 pelo Serviço de Urologia Pediátrica desse mesmo hospital. Os controles adultos foram recrutados no banco de sangue da Fundação Pró-Sangue, também no HC-FMUSP. Os controles pré-púberes foram recrutados no Hospital Infantil Cândido Fontoura (Rua Siqueira Bueno, 1757 - Belenzinho, São Paulo - SP, 03173-010). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular /LIM42 do HC-FMUSP.

4.3. Critérios de seleção dos participantes

4.3.1. Grupo de pacientes DDS 46,XY

Indivíduos foram divididos em 2 grupos; pós-púberes e pré-púberes de acordo com nível sérico de Testosterona <30ng/dL e/ou análise do volume testicular <3ml (Tanner 1). Adicionalmente, os indivíduos foram submetidos a análise molecular e considerados sem

etiologia estabelecida. Este diagnóstico foi baseado na avaliação clínica (não sindrômicos com presença de genitália atípica), citogenética (cariótipo 46,XY), estudos hormonal, radiológico, histológico e molecular. Variantes alélicas potencialmente causadoras de doença em genes reconhecidamente associados às DDS foram pesquisadas utilizando um painel personalizado de genes-alvo (Anexo E) usando a ferramenta Agilent SureDesign 2.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) ou sequenciamento por método de Sanger.

Para a caracterização do grau de virilização da genitália externa dos pacientes com DDS foi utilizado o Índice de Masculinização Externa (EMS) proposto por Ahmed (2000), baseado em dados de prontuários e avaliação no seguimento dos pacientes. (tabelas 4-6)

4.3.2. Grupo controle

4.3.2.1. Controles pós-púberes

Composto por 29 indivíduos adultos (18-55 anos, média 30.3 (SD $\pm$ 10.8) anos) do sexo masculino, doadores do banco de sangue da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo do HC-FMUSP. Os indivíduos que aceitaram o convite de participar do estudo responderam a uma breve entrevista sobre antecedentes mórbidos e uso de medicamentos (doenças cardiovasculares, *Diabetes Mellitus* ou qualquer tipo alteração do desenvolvimento genital e/ou infertilidade, medicamentos em uso/reposição androgênica). Todos os participantes foram esclarecidos sobre a pesquisa em curso e assinaram o TCLE antes do início da doação de sangue.

4.3.2.2. Controles Pré-Púberes

Composto por 8 indivíduos (3-12 anos, média 5.7 (SD $\pm$ 3.1) anos) submetidos a cirurgia de postectomia, caracterizados como pré-púberes após análise do volume testicular (<3ml, Tanner estágio 1) no momento da cirurgia.

Os controles foram distribuídos por idade em subgrupos: 1-12 anos (n = 8), 13-20 anos (n = 8), 21-30 anos (n = 12), 31-40 anos (n = 3) e 41-55 (n = 6). Todos os controles pré-púberes estão localizados no subgrupo (1-12 anos) e os controles pós-púberes foram distribuídos nos subgrupos (13-20 a 41-55 anos).

Tabela 4: Notas para cálculo do índice de Virilização da Genitália Externa (EMS)

Característica	Detalhamento	Nota
(1) Fusão Escrotal	Presente	3
	Ausente	0
(2) Micropênis	Presente	0
	Ausente	3
(3) Posição do Meato Uretral	Tópico	3
	Glandar	2
	Peniano	1
	Perineal	0
	Escrotal	3
(4) Posição das Gônadas (D/E)	Inguinal	2
	Abdominal	1
	Ausente	0

Legenda: Baseado em Ahmed (2000): “The role of a clinical score in the assessment of ambiguous genitalia”. D/E, gônada esquerda e gônada direita, cada uma recebe uma classificação e uma nota.

Tabela 5: Características clínicas dos pacientes portadores de DDS 46,XY

Pacientes	Sexo (social)	Idade na coleta de RNA	Medicação em uso	Consanguinidade	Afetados na família	Peso ao nascer p/ IG	Presença de Útero	Resultados moleculares
1	M	2a1m	Não	Não	Não	AIG	Não	-
2	M	1a11m	Não	Não	Não	AIG	Não	-
3	M	2a7m	Não	Não	Não	AIG	Não	-
4	M	1a10m	Não	Não	Não	PIG	Não	BMP8B (VUS)
5	M	1a9m-	Não	Não	Não	AIG	Não	-
6	M	8a9m	Não	Não	Irmão	AIG	Não	DHX37 (c.G2209A;p.A737T) (PP); WVOX (c.T253D;p.Y85D) (VUS)
7	M	17a	Não	Não	Não	AIG	Não	-
8	F	33a	Estradiol	Não	Não	AIG	Não	-
9	M	12a11m	Testosterona	Sim, pais, primos 2º grau	Não	AIG	Não	-
10	M	24a	Não	Não	Não	PIG	Não	AR (p.E213E)(PP)
11	M	14a3m	Não	Não	Pai, Irmão	AIG	Não	MAMLD1 (VUS)
12	M	15a	Não	Não	Não	PIG	Não	-
13	M	64a3m	Não	Não	Não	AIG	Não	NR5A1 (c.1139-3C>A)(PP)
14	F	34a6m	Estradiol	Não	Não	AIG	Não	-
15	M	15a2m	Não	Não	Não	AIG	Não	-
16	M	48a	Não	Não	Não	AIG	Não	-
17	M	37a	Não	Não	Não	AIG	Não	DHX37 (VUS)
18	F	40a	Não	Não	Não	AIG	Não	SRD5A2 (heterozigote) (PP)

Legenda: M- masculino, F- feminino; a- anos, m- meses; IG- Idade gestacional, PIG- pequeno para a idade gestacional, AIG- adequado para a idade gestacional; ND- não disponível; classificação de variantes encontradas: P - Patogênica, PP- Potencialmente patogênica, B - Benigna, VUS - Variante de significado incerto.

Tabela 6: Cálculo e nota do índice de virilização da genitália externa

Pacientes	Bolsa Escrotal	Índice	DP Pênis	Índice	Posição da Uretra	Índice	Posição das gônadas (D/E)	Índice	EMS
1	bífida	0	-1,1	3	perineal	0	inguinal/inguinal	1,0/1,0	5
2	fusão	3	0	3	peniana	1	escrotal/escrotal	1,5/1,5	10
3	fusão	3	-1	3	peniana	1	escrotal/escrotal	1,5/1,5	10
4	bífida	0	-2,5	0	perineal	0	escrotal/inguinal	1,5/1,0	2,5
5	bífida	0	-2,3	3	perineal	0	inguinal/inguinal	1,0/1,0	5
6	fusão	3	-3,9	0	tópica	3	ausente/ausente	0/0	6
7	bífida	0	-2,3	3	escrotal	1	escrotal/escrotal	1,5/1,5	7
8	fusão de GL	3	-2,5	0	perineal	0	escrotal/escrotal	1,5/1,5	6
9	fusão	0	-3	0	perineal	0	escrotal/escrotal	1,5/1,5	3
10	bífida	0	-1,75	3	perineal	0	inguinal/escrotal	1,0/1,5	5,5
11	bífida	0	-5	0	perineal	0	inguinal/escrotal	1,0/1,5	2,5
12	bífida	0	3,3	0	peniana	1	escrotal/escrotal	1,5/1,5	3,5
13	bífida	0	-3,6	0	perineal	0	inguinal/inguinal	1,0/1,0	2
14	fusão parcial	3	-3,4	0	perineal	0	inguinal/inguinal	1,0/1,0	5
15	fusão	3	-5,5	0	peniana	1	escrotal/escrotal	1,5/1,5	7
16	fusão	3	-2,5	0	perineal	0	escrotal/escrotal	1,5/1,5	6
17	fusão	3	-2	0	tópica	3	ausente/ausente	0/0	6
18	bífida	0	-2,5	0	perineal	0	bolsa/abdominal	1,5/0,5	2

Legenda: DP, desvio padrão; D/E, direita e esquerda; EMS, índice de virilização da genitália externa masculina; GL, grandes lábios

4.4. Critério de seleção dos miRNAs

Na seleção dos miRNAs foram considerados trabalhos da literatura relacionando a ação de miRNAs relacionados à genitalia interna e externa masculina, ou seja, no processo de desenvolvimento de hipospádia, criptorquidia, relacionados a função das células de Sertoli e/ou Leydig, e miRNAs marcadores de infertilidade em homens adultos. Foram criadas listas com os miRNAs presentes em cada um dos estudos.

Adicionalmente foram avaliados trabalhos que estudaram a relação de miRNAs cujos alvos são o AR, seus co-ativadores e/ou repressores, no desenvolvimento do câncer de próstata, um campo que já usa o perfil de miRNAs como marcador biológico desta patologia. Foram criadas listas com miRNAs presentes em no soro e plasma, e cultura celular e câncer de próstata. As listas foram comparadas da seguinte maneira:

(1) miRNAs: soro e plasma em câncer de próstata

Vs

miRNAs: genitalia

(2) miRNAs: cultura celular e tumor de próstata

Vs

miRNAs: genitalia

(3) miRNAs: soro e plasma em câncer de próstata

Vs

miRNAs: cultura celular e tumor de próstata

Os miRNAs comuns nestes estudos foram selecionados e comparados aos obtidos pelo estudo *in silico*. Paralelamente, a busca *in silico* por miRNAs de interesse (e.g. que tem como alvo o AR) foi realizada no banco de dados mirpathDB (Backes et al., 2017) disponível on-line em <https://mpd.bioinf.uni-sb.de/> (out2019). Este banco de dados contém a relação de 2095 miRNAs humanos com 14.773 genes alvo já validados experimentalmente, e 19.281 interações

miRNA/mRNA preditas. Para este estudo foram selecionados miRNAs que tem como alvo o AR, ou co-reguladores do AR, que apresentavam qualquer evidencia experimental.

Um segundo programa utilizado é capaz de realizar predições de interação miRNA/mRNA através da comparação de regiões conservadas. O Target Scan Human (Argawal et al., 2015) está disponível on-line em http://www.targetscan.org/vert_72/ (out2019). Este banco de dados usa a complementariedade de regiões conservadas na região 3'UTR de mRNAs e a região de interação dos miRNAs que contém de 5-8 nucleotídeos denominada *seed*, para fornecer um valor predito de interação. Regiões mais conservadas entre espécies e/ou regiões *seed* de determinadas sequências que são flanqueadas por Adenosinas tem maiores valores. Para busca e seleção no TargetScan Human, foram selecionados miRNAs altamente conservados somente entre os mamíferos e que apresentavam maiores valores de acordo com o algoritmo.

O terceiro programa utilizado é denominado miRTarget Link (Enright et al., 2003) disponível on-line em <https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink/> (out2019). Este banco de dados utiliza a interação predita de miRNA/mRNA para criar *networks* de interação de um miRNA para vários mRNA, ou vice-versa. Para seleção foi utilizada a busca por genes humanos, selecionado o AR e os filtros adicionais para que resultado apresentasse apenas os miRNAs com maior potencial de interação.

Por fim, foi utilizado o programa miRTarBase (Chou et al., 2018) disponível on-line em <http://miRTarBase.mbc.nctu.edu.tw/>. Este banco de dados cataloga miRNAs e mRNA alvos validados experimentalmente e organiza em duas categorias: (1) Evidências fortes: Em que a interação miRNA/mRNA foi validada experimentalmente por ensaios de luciferase-repórter, Western blotting e PCR em tempo real. (2) Evidências fracas: Em a interação miRNA/mRNA não foi validada, mas uma correlação foi obtida. Esta categoria também inclui dados de microArray e sequenciamento de nova geração.

Os resultados de cada análise *in silico* foram compilados em listas individuais e comparados, a lista final desta análise contém os miRNA presentes em todos os bancos de dados ou em pelo menos três.

4.5. Coleta de amostras

4.5.1. Plasma

Aproximadamente 2 ml de sangue venoso periférico foram coletados em tubo à vácuo com EDTA (K2EDTA) e mantidos em temperatura ambiente. Como o jejum e o uso de tabaco não alteram os níveis de miRNAs circulantes (Max et al., 2018 & Mclellan et al., 2014), o jejum não foi requerido aos pacientes e controles e os mesmos não foram questionados acerca de hábitos tabagistas.

4.6. Extração e quantificação de RNA

4.7.1. Plasma

O sangue total foi mantido a temperatura ambiente e centrifugado para separação do plasma (2x 2500g por 15 minutos, 2x 3000g por 5 minutos), em até 4h após a coleta. A amostra final de plasma foi analisada em um nanofotômetro Implen P300 (Westlake Village, California, EUA), nos comprimentos de onda de 414nm, 545nm e 576nm para observação do grau de hemólise. As amostras foram consideradas não hemolisadas e adequadas para inclusão no estudo quando os valores de absorbância foram inferiores a 0.2 ($A < 0.2$) no comprimento de

onda de 414nm (Wong et al., 2006). As amostras foram armazenadas à -80°C até a extração do RNA. Para a extração do RNA foi utilizado o kit MagMAX mirVana Total RNA (ThermoFisher, Waltham, Mariland, EUA) otimizado para extração de miRNAs de amostras de plasma ou soro sanguíneo, de acordo com instruções do fabricante (Apêndice 1). O RNA extraído foi quantificado no aparelho Qubit 2.0 utilizando o kit RNA HS Assay (Thermofisher) (Apêndice 2).

4.8. Transcrição Reversa (RT) e pré-amplificação (miR-Amp)

4.8.1. RNA extraído do plasma

Para a amplificação dos miRNAs selecionados nas amostras de plasma dos pacientes e controles foi utilizado o kit TaqMan Advanced miRNA cDNA (Thermofisher). Este kit aperfeiçoa a amplificação de miRNAs em amostras líquidas antes da reação de transcrição reversa pela adição de uma extensão de cauda poli-(A) (extremidade 3') e um adaptador (extremidade 5') ao miRNA maduro, aumentando sua estabilidade e especificidade. Todos os passos foram seguidos de acordo com instrução do fabricante (Apêndice 3). A primeira etapa corresponde a reação de adição ou alongamento da cauda poli-(A) (reação de poliadenilação). Em seguida ocorre a etapa de ligação de um adaptador na extremidade 5'. Este passo é importante, pois o alongamento da extremidade 5' resulta em maior especificidade, mesmo em sequências que diferem por apenas um par de bases (pb). Após o alongamento do miRNA maduro com as extremidades 3' e 5', a reação de transcrição reversa é realizada.

A reação de transcrição reversa é seguida por uma reação de pré-amplificação (miR-Amp) da amostra. Nesta reação são utilizados *primers* universais para amplificar o cDNA

resultante da reação de transcrição reversa. Para tal, 5ul do produto da reação de transcrição reversa são adicionados a 25ul de *master mix*, 2,5ul de *primers* universais e 17,5ul de água destilada e deionizada (ddH_2O). Todos os passos foram seguidos em termociclador de acordo com instruções do fabricante descritas nos apêndices 3-4. Todas as reações foram feitas no termociclador Veriti (Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

4.9. Reação de PCR em tempo real (qPCR)

Os produtos da reação de pré-amplificação foram quantificados no aparelho Qubit 2.0 com o kit Qubit dsDNA HS Assay (Apêndice 2). A reação de PCR em tempo real (qPCR) foi realizada utilizando-se 1ng do produto da reação de pré amplificação do cDNA das amostras de plasma e 10ng das amostras de cultura celular, com o kit TaqMan Advanced miRNA Assay, com os reagentes Fast Advanced Master Mix e sondas Taqman Advanced miRNA Assay para os miRNAs miR-23a (478532_mir A25576), miR-34 (478048_mir A25576), miR-200c (478351_mir A25576), miR-210 (477970_mir A25576) e miR-451a (478107_mir A25576) de acordo com instruções do fabricante (Thermofisher).

Foi utilizado um valor mínimo de fluorescência de 0,1, de acordo com indicação do fabricante. Amostras que em que não houve amplificação do miR-23a foram removidas da análise e, amostras em que não houve detecção de Cq (no Cq) para os miRNAs miR-200c e miR-210, foram consideradas como Cq=40. As reações foram realizadas em termociclador Agilent Aria-MX Real Time System (Santa Clara, Califórnia, EUA), de acordo com o descrito abaixo, demais passos estão descritos nos apêndices 3-4:

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Ativação enzimática	95	20s	1
Denaturação	95	3s	40
Anelamento/Extensão	60	30s	

4.9.1. Análise de dados de RT-qPCR

Os dados provenientes do experimento de RT-qPCR foram analisados pela fórmula ΔC_t e $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando-se como referência o miR-23a. A análise estatística adequada a cada grupo de dados está descrita a seguir.

4.10. Análise estatística

Os testes de Anderson-Darling, D'Agostino e Pearson, Kolgomorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram utilizados para observar a distribuição dos dados. Quando necessário, os dados em distribuição não gaussiana foram transformados usando a transformação lognormal ($y = \log(y)$). Os pares dos grupos foram comparados por Mann-Whitney ou teste t de Student (bicaudal). O teste F foi usado para comparar as variâncias. Os testes ANOVA com a respectiva correção para distribuições não gaussianas foram usados para comparar 3 ou mais grupos, e o teste de Bartlett foi usado para comparar as variâncias. As análises foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. miRNAs selecionados

Baseados nos critérios previamente descritos foram obtidos os seguintes miRNAs:

(1) miRNAs: soro e plasma em câncer de próstata

V_s

miRNAs: genitália

=

miR-34b, miR-200c, miR-210

(2) miRNAs: cultura celular e tumor de próstata

V_s

miRNAs: genitália

=

miR-34c, miR-133b, miR-135a

(3) miRNAs: soro e plasma em câncer de próstata

V_s

miRNAs: cultura celular e tumor de próstata

=

miR-34a, miR-145, miR-210

(4) Estudo *in silico*:

miR-185-5p, miR-124-3p, miR-488-3p, miR-34a-5p, miR-205-5p

Adicionalmente, os miRNAs controles avaliados neste estudo foram selecionados baseado no trabalho de Blondal (2013). Os miRNAs selecionados para este estudo estão descritos na tabela 5:

Tabela 7: Dados dos miRNA selecionados para este estudo.

miRNA	Sequência	Posição genômica	Acesso miRBase	ID thermofisher
miR-23a-3p *miR-23a	45-aucacauugccagggauuucc-65	chr19:13836587-13836659	MI0000079	478532_mir (A25576)
miR-200c-3p *miR-200c	44-uaauacugccggguaaugaugga-66	chr12: 6963699-6963766	MI0000650	478351_mir (A25576)
miR-210-3p *miR-210	66-cugugcgugugacagcggcuga-87	chr11: 568089-568198	MI0000286	477970_mir (A25576)
miR-451a *miR-451a	17-aaaccguuaccuuacugaguu-38	chr17:28861369-28861440	MI0001729	478107_mir (A25576)

Legenda: *abreviação de nomenclatura utilizada neste estudo

5.2. Análise da eficiência das reações, concentração e cDNA, e presença de hemólise no plasma

Inicialmente, para testar a eficiência da reação de síntese do cDNA à partir do RNA extraído do plasma, utilizou-se o fluorômetro Qubit 2.0 (thermofisher) com kits específicos para RNA, com a capacidade de detecção em baixas concentrações (kit Qubit HS RNA <1ng/ul). A comparação das concentrações iniciais do RNA extraído do plasma revela valores distintos entre as amostras, no entanto, após a reação de pré-amplificação de cDNA, denominada miR-Amp (Materiais e métodos, e apêndice 1), as concentrações de cDNA observadas apresentam valores próximos (Anexo A; figura 10a), indicando que diferenças iniciais da concentração de RNA são minimizadas nas etapas de reações que antecedem a quantificação de miRNAs por qPCR. Ainda, a concentração de cDNA final é diferente nas diferentes reações (Anexo A; figura 10b), sendo interessante ressaltar que a quantificação do cDNA com os kits específicos de quantificação no fluorômetro Qubit 2.0, resultam em valores de concentração diferentes daqueles observados no nanofotômetro, este último, não indicado para quantificação de cDNA (Anexo A; figura 10c).

Por outro lado, como a técnica de RT-qPCR é uma quantificação de expressão gênica, o estabelecimento de medidas precisas das concentrações das amostras antes da reação de PCR é de extrema importância, uma vez que valores não normalizados entre as amostras resultarão em valores distintos e alterados de expressão gênica, cuja interpretação pode gerar dados irreais (Taylor et al., 2010). Para tal, a quantificação de todas as amostras utilizadas foi realizada no fluorômetro Qubit 2.0 (Thermofisher) com o kit Qubit HS dsDNA (Thermofisher), específico para o tipo de amostra utilizada. Outros estudos, disponíveis na literatura, tem utilizado a técnica da inserção de um miRNA exógeno sintético, baseado no miR-39 de *C. elegans* (cel-miR-39), para auxiliar no processo de normalização de diluição de amostras. Este miRNA é adicionado no plasma antes da extração de RNA, e sua quantificação direciona as diluições a

serem efetuadas. No entanto, alguns estudos mostraram que esta técnica é imprecisa (Becker et al., 2010) e que apesar de funcionar eventualmente para auxílio na diluição de algumas amostras, definitivamente não deve ser utilizado como normalizador (Sourvinou et al., 2013), da mesma forma o uso de diluições seriadas é impreciso e pode resultar em dados alterados. Para testar a hipótese de diluição de acordo com o fabricante do kit de amplificação (thermofisher), foi utilizada a diluição de 1:2 de três amostras controles, paralelamente, 1ng de cDNA foi quantificado por fluorometria.

Diferenças entre os valores de Ct para diluição 1:2 e 1ng de cDNA foram observadas em todos os miRNA estudados (miR-23a $p < 0.05$, miR-200c $p < 0.05$, e miR-210 $p = 0.055$). Mas estas diferenças não foram observadas quando aplicadas as fórmulas ΔCt e $2^{-\Delta\Delta Ct}$ demonstrado que o miR-23a é um bom gene de referência. Os resultados estão apresentados na figura 9 (Anexo B).

Kirschner (2011 e 2013), e Blondal (2013), demonstraram que a presença de hemólise em amostras de plasma, mesmo que em concentrações abaixo de 1%, resultava em valores alterados de Ct nas reações de qPCR. Apesar de a grande maioria dos trabalhos disponíveis na literatura utilizando amostras de plasma não analisar a presença de hemólise (Kirschner et al., 2013), utilizando miRNAs controles relacionados a hemólise, ou mesmo a quantificação da absorbância direta do plasma na frequência de onda de 414nm, em nosso trabalho, foram utilizados os dois métodos. Vale ressaltar, no entanto, que nem todos os miRNAs são alterados por hemólise, nos dados de Kirschner somente o miR-210 (e miR-451a que é um controle de hemólise) e não o miR-200c (nem o miR-23a, um controle estável de acordo com o trabalho) apresentava variações.

Adicionalmente, a análise de absorbância direta do plasma em nanofotômetro, revela valores inferiores a 0.15 em todas as amostras utilizadas em nosso estudo, sendo que o indicativo de hemólise está relacionado a valores acima de 0.2 (figura 3b), de acordo com dados

de Blondal (2013) e Kirschner (2011 e 2013), estudos baseados no trabalho original de Wong (2004), demonstrando como a presença de queimaduras superficiais ou profundas na pele alterava os valores de hemoglobina/ hemólise no plasma, e que a análise direta do plasma em nanofotômetro, na frequência de onda de 414nm, é uma medida precisa. Portanto, nenhum dado foi excluído com relação a presença de hemólise no plasma. Os dados nominais, teste de normalidade e distribuição, e teste estatístico estão descritos nas tabelas após os gráficos.

Figura 3: A. Análise dos Ct, obtido na reação de qPCR, dos miRNAs miR-23a, miR-451a, miR-200c e miR-210, nos grupos controle (Ctr) e pacientes (P+PP), e subgrupos de pacientes púberes (P) e pré-púberes (PP). B. Análise da absorbância direta do plasma em nanofotômetro na frequência de onda de 414nm, nos grupos controle (Ctr) e pacientes (P+PP), e subgrupos de

pacientes púberes (P) e pré-púberes (PP). Losangos são representações dos dados individuais dos controles, círculos são representações dos dados individuais dos pacientes. As barras são representações da mediana (barra média), e intervalo interquartil (barras das extremidades), sendo o quartil Q1 a barra inferior (baixo para cima), e o quartil Q3 a barra superior. Análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, ns - não significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ e *** $p < 0.0001$.

Tabela 8: Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para valores de *Ct* dos miRNA controles, *miR-23a* (normalizador) e *miR-451* (controle de hemólise).

Variáveis	miR-23a			
	Controles	Pacientes (P+PP)	Púberes (P)	Pré-Púberes (PP)
W	0.9803	0,8806	0,8568	0,7934
p (valor)	0.3479	0,0029	0,0109	0,0079
Passa no teste de normalidade? ($\alpha=0.05$)	Sim	Não	Não	Não
Média (+SD ou SEM) ou Mediana (+ intervalo interquartil)	Média	Mediana	Mediana	Mediana
Teste t (Student ou Mann-Whitney)	Student	Mann-W	Mann-W	Mann-W

Variáveis	miR-451a			
	Controles	Pacientes (P+PP)	Púberes (P)	Pré-Púberes (PP)
W	0,9593	0,8655	0,8762	0,7716
p (valor)	0.020	0,0024	0,0225	0,0045
Passa no teste de normalidade? ($\alpha=0.05$)	Não	Não	Não	Não
Média (+SD ou SEM) ou Mediana (+ intervalo interquartil)	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana
Teste t (Student ou Mann-Whitney)	Mann-W	Mann-W	Mann-W	Mann-W

Legenda: W- estatística da amostra (Shapiro-Wilk), SD – desvio padrão, SEM – erro médio padrão, Gaussiana (= simétrica), Assimétrica (= *não*-Gaussiana), Média = Mediana na distribuição Gaussiana. P=Púberes, PP=Pré-púberes. Mann-W, abreviação de Mann-Whitney.

Tabela 9: Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para valores de Ct dos miRNAs alvo deste estudo, miR-200c e miR-210.

Variáveis	miR-200c			
	Controles	Pacientes (P+PP)	Púberes (P)	Pré-Púberes (PP)
W	0,976	0.8863	0,8495	0,9330
p (valor)	0,3705	0.0192	0,0219	0,5770
Passa no teste de normalidade? ($\alpha=0.05$)	Sim	Não	Não	Sim
Média (+SD ou SEM) ou Mediana (+ intervalo interquartil)	Média	Mediana	Mediana	Média
Teste t (Student ou Mann-Whitney)	Student	Mann-W	Mann-W	Student

Variáveis	miR-210			
	Controles	Pacientes (P+PP)	Púberes (P)	Pré-Púberes (PP)
W	0,9514	0,9168	0,7773	0,8883
p (valor)	0,0086	0,0497	0,0007	0,1122
Passa no teste de normalidade? ($\alpha=0.05$)	Não	Não	Não	Sim
Média (+SD ou SEM) ou Mediana (+ intervalo interquartil)	Mediana	Mediana	Mediana	Média
Teste t (Student ou Mann-Whitney)	Mann-W	Mann-W	Mann-W	Student

Legenda: W- estatística da amostra (Shapiro-Wilk), SD – desvio padrão, SEM – erro médio padrão, Gaussiana (= simétrica), Assimétrica (= *não*-Gaussiana), Média = Mediana na distribuição Gaussiana. P=Púberes, PP=Pré-púberes. Mann-W, abreviação de Mann-Whitney.

5.3. Análise do Δ Ct usando o miR-23a como referência

Em um primeiro momento a análise estatística do Δ Ct dos miRNAs miR-200c e miR-210 foi realizada para observação de possíveis indicações estatísticas presentes entre grupos de interesse. Por exemplo, foi observado uma expressão diferencial do miR-200c entre os grupos Controles pós-púberes e DDS 46,XY separados por índice de masculinização da genitália

externa (EMS), mas não quando agrupados (tabela 10; figura 4a). Em relação ao miR-210, os grupos de pacientes DDS 46,XY agrupados, ou separados por SEM (MVG), apresentavam valores superiores aos controles pós-púberes, sendo o mesmo observado em relação aos pacientes e controles pré púberes (tabela 10; figura 4b). A análise de expressão dos miRNAs selecionados, bem como sua potencial ação, foram realizados através da análise por $2^{-\Delta\Delta Ct}$, a seguir, e estatística descritiva para este método estão descritas nas tabelas dos anexos F e G.

Tabela 10: Análise estatística do ΔCt do miR-200c e miR-210

miR-200c Grupo	Tipo de distribuição	ΔCt Média $\pm$ SD	Controles Pós-púberes	Controles Pré-púberes	DDS 46,XY Pós-púberes	PVG	MVG	DDS 46,XY Pré-púberes
Controles Pós-púberes	Gaussiana	2.7 ± 2.3	-	p=0.0007	ns	p=0.053*	ns*	p<0.001
Controles Pré-púberes	Gaussiana	6.1 ± 2.0	p=0.0007	-	-	ns	p=0.004	ns
DDS 46,XY Pós-púberes	Gaussiana	2.6 ± 2.6	ns	ns	-	-	-	p=0.004
PVG	***	4.9 ± 0.7	*p=0.053	ns	-	-	p=0.0032	ns
MVG	***	1.0 ± 2.1	*ns	p=0.004	-	p=0.0032	-	p=0.004
DDS 46,XY Pré-púberes	Gaussiana	7.7 ± 1.4	p<0.001	ns	p=0.004	ns	p=0.004	-
miR-210 Grupo	Tipo de distribuição	ΔCt Média $\pm$ SD	Controles Pós-púberes	Controles Pré-púberes	DDS 46,XY Pós-púberes	PVG	MVG	DDS 46,XY Pré-púberes
Controles Pós-púberes	Gaussiana	0.57 ± 3.0	-	ns	p=0.037	#ns	p=0.036	-
Controles Pré-púberes	Gaussiana	1.5 ± 2.6	ns	-	-	ns	p=0.04	ns
DDS 46,XY Pós-púberes	Não Gaussiana	-2.4 (-3.2/-0.57) **	p=0.037	p=0.02	-	-	-	ns
PVG	***	-0.60 ± 3.1	#ns	ns	-	-	ns	ns
MVG	***	-1.9 ± 3.1	p=0.036	p=0.04	-	ns	-	ns
DDS 46,XY Pré-púberes	Não Gaussiana	-1.2 (-1.2/-0.21) **	-	ns	ns	ns	ns	-

Legenda: O ΔCt foi calculado tendo como referência o miR-23a. PVG, pacientes DDS 46,XY pós-púberes, classificados de acordo com EMS em pouco virilizados; MVG, pacientes DDS 46,XY pós-púberes, classificados de acordo com EMS em moderadamente virilizados. # Análise por ANOVA de Controles Pós-púberes Vs PVG Vs MG, p<0.05; * Análise por ANOVA de Controles Pós-púberes Vs PVG Vs MG, p=0.017; ** mediana + intervalo interquartil; *** n pequeno para teste; ns = não significativo; - não analisado; SD = desvio padrão.

Figura 4: Análise de ΔC_t dos miRNAs miR-200c e miR-210, tendo o miR-23a como referência. PVG, pacientes DDS 46,XY pós-púberes, classificados de acordo com EMS em pouco virilizados; MVG, pacientes DDS 46,XY pós-púberes, classificados de acordo com EMS em moderadamente virilizados. Caixas e linhas representam mediana, mínimo e máximo, e intervalo interquartil.

5.4. Análise da expressão plasmática de miR-200c intragrupos

A expressão plasmática de miR-200c foi maior nos grupos de 13-55 anos que no grupo de 1-12 anos (ANOVA $p=0.0067$) (Figura 5a). Além disso, todos os grupos com mais de 13 anos de idade tiveram médias individualmente mais altas de expressão de miR-200c do que o grupo de 1-12 anos ($p<0.05$). Nenhuma diferença nos níveis de expressão do miR-200c foi observada entre os quatro grupos com idade superior a 13 anos. Maior expressão de miR-200c também foi observada quando o grupo controle pós-púbere foi comparado ao grupo controle pré-púbere ($p=0.0007$) (Figura 5b). Curiosamente, a expressão plasmática de miR-200c foi maior no grupo pós-púbere DDS 46,XY do que nos pacientes pré-púberes DDS 46,XY ($p=0.0002$), conforme observado no grupo controle (Figura 5c).

Figura 5: Análise da expressão plasmática do miR-200c intragrupos: a. Análise por intervalo de idades no grupo controle (ANOVA e pós-teste de Dunnett, $*p<0.05$); b. Análise por estágio puberal no grupo controle, pós-púberes Vs. pré-púberes (teste t de Student); c. Análise por estágio puberal em pacientes DDS 46,XY, pós-púberes Vs. pré-púberes (teste t de Student). Caixas representam (de baixo pra cima) primeiro intervalo interquartil, mediana, e terceiro intervalo interquartil. Barras representam mínimo e máximo. Pontos representam a média das duplicatas ou triplicatas. + representa a média do grupo e a linha pontilhada representa a mediana do grupo referência na fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os dados foram submetidos a testes de normalidade e transformados pela equação lognormal $y=\log(y)$ quando necessário; u.a. = unidades arbitrária; Ctr = Controles.

5.5. Análise da expressão plasmática de miR-200c em controles Vs. pacientes DDS 46,XY

5.5.1. Pacientes DDS 46,XY pós-púberes classificados por EMS (PVG e MVG) Vs. Controles pós-púberes

A análise ANOVA de PVG, MVG e controles mostrou significância estatística de $p=0.0013$, revelando uma expressão diferencial de miR-200c entre esses grupos. Em termos de médias, os pacientes MVG apresentaram maior média de expressão geral do miR-200c, seguidos do grupo controle. O grupo PVG apresentou a menor média de expressão do miR-200c. O pós-teste revelou uma significância estatística na expressão do miR-200c entre MVG e PVG (pós-teste de Tukey, $p=0.01$)(figura 6a).

5.5.2. Pacientes DDS 46,XY pré-púberes Vs. controles pré-púberes

A classificação dos pacientes DDS 46,XY pré-púberes de acordo com o índice EMS revelou que apenas um paciente era caracterizado como PVG. O pequeno número de pacientes DDS 46,XY pré-púberes e seu perfil de distribuição entre os subgrupos PVG ($n = 1$) e MVG ($n = 5$) limitaram as análises. Nenhuma significância estatística ou diferença nos níveis médios de expressão de miR-200c foi observada entre controles pré-púberes e pacientes DDS 46,XY pré-púberes (Figura 6b).

5.5.3. Pacientes DDS 46,XY pós-púberes classificados em PVG Vs. pacientes pré-púberes DDS 46,XY Vs. Controles pré-púberes

Interessantemente, nenhuma diferença estatística nos níveis de expressão de miR-200c foi identificada entre os grupos DDS 46,XY pós-púbere PVG, pré-púbere e grupo de controles pré-púberes (teste ANOVA e pós-teste de Tukey) (Figura 6c).

Figura 6: Análise da expressão plasmática do miR-200c entre os grupos controle e pacientes DDS 46,XY: a. Análise de acordo com índice de virilização PVG, MVG e grupo controle (ANOVA e pós-teste de Tukey); b. Análise de expressão nos grupos pré-púberes (teste t de Student); c. Análise por estágio puberal em pacientes DDS 46,XY, pós-púberes classificados em PVG Vs. pré-púberes Vs. Controles pré-púberes (ANOVA e pós-teste de Dunnett). Caixas representam (de baixo para cima) primeiro intervalo interquartil, mediana, e terceiro intervalo interquartil. Barras representam mínimo e máximo. Pontos representam a média das duplicatas ou triplicatas. + representa a média do grupo e a linha pontilhada representa a mediana do grupo referência na fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os dados foram submetidos a testes de normalidade e transformados pela equação lognormal $y=\log(y)$ quando necessário. u.a. = unidades arbitrárias. Ctr, controles, PVG, genitália externa pouco virilizada; MVG, genitália externa moderadamente virilizada.

5.6. Análise da expressão plasmática de miR-210 intragrupo

Nenhuma diferença estatística foi observada em relação a a expressão do miR-210 nos grupos controles separados por intervalos de anos (figura 7a) ou agrupados por estágio puberal (figura 7b). Nota-se um pequeno aumento das médias e medianas de expressão do miR-210 nos grupos 31-40 e 41-55 anos, mas não estatisticamente significante. Em relação ao estágio púbere, nota-se que o grupo de controles pré-púberes apresenta menor média e mediana de expressão em relação aos pós-púberes, mas sem significância estatística, possivelmente devido ao observado nos grupos 31-40 e 41-55 anos, agora agrupados em ‘púberes’.

Figura 7: Análise da expressão plasmática do miR-210 no grupo controle: a. Análise por intervalo de idades no grupo controle (ANOVA e pós-teste de Dunnett); b. Análise por estágio puberal no grupo controle, pós-púberes Vs. pré-púberes (teste t de Student). Caixas representam (de baixo para cima) primeiro intervalo interquartil, mediana, e terceiro intervalo interquartil. Barras nas caixas representam mínimo e máximo. Pontos representam a média das duplicatas ou triplicatas. + representa a média do grupo e a linha pontilhada representa a mediana do grupo referência na fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os dados foram submetidos a testes de normalidade e transformados pela equação lognormal $y=\log(y)$ quando necessário. u.a. = unidades arbitrárias; Ctr = Controles.

5.6.1. Pacientes DDS 46,XY pós-púberes classificados por EMS (PVG e MVG) Vs. Controles pós-púberes

Ambos os grupos DDS 46,XY pós-púberes PVG e MVG apresentaram maior média de expressão do miR-210 em relação ao grupo controle (ANOVA $p=0.005$). Esses níveis elevados são mais pronunciados no grupo MVG ($p=0.005$)(figura 8a).

5.6.2. Pacientes DDS 46,XY pós-púberes Vs. Controles pós-púberes

O padrão de expressão do miR-210 nos pacientes pós-púberes DDS 46,XY se torna ainda mais claro quando PVG e MVG são agrupados. Pacientes DDS 46,XY independente do grau de virilização da genitália externa apresentaram maior expressão do miR-210 ($p=0.002$)(figura 8b).

5.6.3. Pacientes DDS 46,XY pré-púberes Vs. controles pré-púberes

Pacientes DDS 46,XY pré-púberes apresentaram maior média de expressão que os controles pré-púberes ($p=0.022$). O mesmo padrão de expressão do miR-210 observado em pós-púberes (figura 8c).

Figura 8: Análise da expressão plasmática do miR-210 entre grupos: a. Análise de acordo com classificação por índice de virilização da genitália externa em pós-púberes (ANOVA e pós-teste de Tukey); b. Análise por grupos pós-púberes (t teste de Student); c. Análise por grupos pré-púberes (t teste de Student). Pontos representam a média das duplicatas ou triplicatas. Barras pretas representam a mediana e as linhas o intervalo interquartil. + representa a média do grupo e a linha pontilhada representa a mediana do grupo referência na fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os dados foram submetidos a testes de normalidade para melhor adequação do teste estatístico. Ctr = Controles; PVG, genitália externa pouco virilizada; MVG, genitália externa moderadamente virilizada.

6. DISCUSSÃO

Apesar de relativamente recente, o estudo de assinaturas ou perfis de miRNAs no plasma tem sido analisado em diversas patologias, representando uma ferramenta de avaliação de prognóstico e/ou diagnóstico muito promissora, por se tratar de uma metodologia não invasiva (Reid et al., 2011). Uma prova, é o crescente número de publicações disponíveis na base de pesquisa *PubMed* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> [out 2019]) quando pesquisados os termos “plasma/circulating” e “miRNAs”, observa-se um aumento do número de publicações nos últimos dez anos (figura 9).

Figura 9: Número de publicações disponíveis em busca realizada na base PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> [out 2019]). *Números referentes até outubro de 2019.

Porém, a proposição de um miRNA circulante específico como um biomarcador para doenças humanas, exige algumas características deste marcador, entre elas uma baixa variabilidade geral entre indivíduos saudáveis, uma baixa variabilidade ao longo da vida para faixas etárias e uma alta independência do processo de amostragem e do tempo de armazenamento. No estudo realizado por Keller (2017) observou-se que uma proporção significativa dos miRNAs estudados foi afetada pela idade do doador de sangue, demonstrando variabilidade do valor mensurado em amostras seriadas do mesmo indivíduo controle em

diferentes idades (intervalos de tempo de coleta de 5 anos), e uma parte não desprezível, embora pequena, pelo tempo de armazenamento das amostras (Keller et al., 2017)

Sendo os biofluidos os materiais alvo, um estudo importante de sequenciamento de miRNAs por NGS de El-mogy (2018), mostrou que a maior disponibilidade, em número, de miRNAs era encontrada no plasma. Adicionalmente, a estabilidade dos miRNAs no plasma é alta e a obtenção deste em relação ao soro é mais rápida (Balzano et al., 2015). Além disso, diversos outros fatores podem alterar a detecção ou os valores obtidos na quantificação de miRNAs do plasma, sendo o principal, a presença de hemólise na amostra do plasma. Desta forma, a exclusão da presença de hemólise nas amostras nas quais a extração de RNA total será realizada constitui uma etapa fundamental.

Vários estudos têm abordado a melhor metodologia de quantificação de hemólise nas amostras de plasma e quais seriam as reais repercussões dessa presença nos resultados, porém alguns trabalhos mostram inconstância nos achados. Cheng (2013) demonstraram que a presença de hemólise pode alterar a expressão de 72% dos miRNAs detectáveis no plasma, sendo que as variações em alguns destes pode ser superior a 1000x e, Blondal (2013) demonstram que a hemólise ou presença de hemácias em amostras de plasma, mesmo que em porcentagens abaixo de 1% pode alterar os valores de quantificação de alguns miRNAs, principalmente dos miRNAs, miR-16 e miR-451a, e, moderadamente, do miR-23a.

Complementando esses dados, o estudo de Kirschner (2011) que analisou a quantificação de hemólise no plasma obtida por leitura de absorbância à 414nm, demonstrou que a porcentagem (%) de hemácias no plasma em leituras abaixo de 0.15A é de 0%, 0.18A ~ 0,008%, 0.2A ~ 0,0016%, e ainda, que a coloração avermelhada do plasma, devido a presença de hemácias somente passa a ser observada em 1A ~ 0,25%. O estudo também mostrou que o normalizador miR-16, sugerido como normalizador de expressão pelo fabricante dos *kits* utilizados em nosso estudo, variou na presença de hemólise sendo, no entanto, o maior aumento

observado em relação ao miR-451a, que também é alvo de estudo. Posteriormente, Kirschner (2013) analisou quais miRNAs poderiam ser alterados por hemólise utilizando o *kit* Taqman Array microfluids cards com 194 miRNAs, que inclui os miRNAs miR-200 e miR-210, e demonstraram que somente os níveis plasmáticos do miR-210 eram alterados por hemólise, além daqueles miRNAs que já descrevemos previamente por outros estudos.

Em outro estudo, MacLellan (2014) demonstraram que a hemólise em amostras de soro pode aumentar os valores de expressão de pelo menos 162 miRNAs (incluindo o miR-210). Por outro lado, a análise de miRNAs em soro de indivíduos em jejum e/ou fumantes (tabaco) não apresentou diferenças de expressão significativa em relação a dos indivíduos fora do jejum ou não fumantes.

Nenhum dos estudos pesquisados referiu alterações nos valores de detecção do miR-200c na presença de hemólise. Baseado nestas evidências, dos quatro miRNAs selecionados para o nosso estudo, a hemólise poderia interferir nos resultados obtidos na análise de 2 deles, os miRNAs miR-451a e miR-210, o que exige um controle rigoroso nessa etapa.

Todas as amostras de plasma dos indivíduos controles e pacientes deste estudo apresentaram valores de absorbância abaixo de 0.2 (pico de absorbância no comprimento de onda de 414 nm, considerado um limite seguro sem hemólise) em espectrofotômetro, confirmando a adequação das amostras para a extração do RNA total e análises posteriores (Figura 3b).

A análise dos Ct ou análise da expressão absoluta (ou análise de ciclos) dos miRNAs selecionados em nosso estudo revelam uma grande variabilidade, principalmente no grupo controle. Os miRNAs controles miR-23a e miR-451a foram selecionados com base no trabalho de Blondal 2013 que demonstrou que o sangue hemolisado resultava em alteração da expressão do miR-451a, mas não do miR-23a. Ainda, a presença de hemólise poderia ser detectada pela diferença dos Cts destes miRNAs (Ct miR-23a – Ct miR-451a) quando maior que sete ciclos

($Ct\ miR-23a - Ct\ miR-451a > 7\ Ct$ = presença de hemólise), em paralelo, o grupo demonstrou que a absorbância na frequência de onda de 414 nanômetros (A_{414nm}) dos plasmas hemolisados era superior a 0.2.

Em nosso estudo, nenhuma das amostras utilizadas apresentou valores em grande proximidade a 0.2, sendo todos inferiores a 0.15 (figura 3b). No entanto, a diferença de Ct ($Ct\ miR-23a - Ct\ miR-451a > 7\ Ct$) foi superior a descrita por Blondal na grande maioria das amostras, apesar do processo de coleta de sangue e separação do plasma estarem alinhados com outros descritos na literatura, sendo a coleta realizada em tubos de EDTA, mantidos a temperatura ambiente e a centrifugação realizada em até 6h após a coleta, abaixo de 3000g para evitar hemólise (MacLellan et al., 2014), inclusive o descrito por Blondal. A centrifugação a um máximo de 3000g foi descrita por Blondal e utilizada em nosso estudo. Não foram observadas diferenças significativas dos valores de Ct em relação a idade dos controles.

Além disso, em nosso grupo amostral, o miR-23a apresenta baixos níveis de expressão no plasma, tanto para o grupo controle, quanto para os pacientes ($Ct \sim 33$ em média), mesmo quando observados em relação a vários trabalhos na literatura sendo os principais o de Blondal (2013) e Kirschner (2011). Já o miR-451a é altamente expresso em todas as amostras ($Ct \sim 25$) (figura 3a). Essas observações sugerem que o método de análise de dados utilizado por cada grupo foi diferente, principalmente em relação a determinação dos limites de detecção de luminescência por ciclo de amplificação na qPCR (*Threshold Values*). Em nosso estudo, foi seguido o protocolo do fabricante do kit Taqman, sugerindo um limite inferior de 0,1. No entanto, uma análise automática dos Cts do miR-451a, feita pelo próprio programa da plataforma do termociclador (AriaMx Software) revelou TVs acima de 7 (dados não mostrados), confirmando nossa hipótese. Como nenhuma das amostras utilizadas apresentou valores limítrofes de hemólise, não foi feita uma reanálise destes dados da qPCR, e as amostras

foram consideradas livres de hemólise com base nos valores obtidos pela análise em nanofotômetro.

Um outro aspecto importante na avaliação de miRNAs é a falta de normalização de miRNAs como referências absolutas na literatura, sendo importante a avaliação dos miRNAs estudados em cada contexto. Por exemplo, o miR-23a foi sugerido como um potencial biomarcador sérico para diferentes condições clínicas. Elevados níveis de expressão do miR-23a no plasma de pacientes com doença arterial coronariana (DAC) analisados por RT-qPCR foram identificados por Han (2015), que confirmaram os achados prévios em modelos animais com DAC. Nesse trabalho foi utilizado como gene normalizador para o estudo de expressão o snRNAU6.

Komatsu (2016), propôs o miR-23a como biomarcador de quimiorresistência em pacientes com carcinoma de células escamosas do esôfago (ESCC, do inglês, *Esophageal Squamous Cell Carcinoma*). Comparando a expressão dos níveis plasmáticos do miR-23a pré e pós cirurgia dos pacientes com ESCC, o grupo identificou um aumento significativo nos valores de expressão do miR-23a em pacientes resistentes a quimioterapia. Em paralelo, altos níveis de miR-23a foram observados em biopsia destes tumores, sugerindo um papel importante do miR-23a na progressão tumoral. Nesse manuscrito foi utilizado como gene normalizador para o estudo de expressão o snRNA RNU6B. Variações da expressão plasmática do miR-23a foram descritas em vários tipos de câncer (Wang et al., 2018), com potencial biomarcador e prognóstico.

Da mesma forma, variabilidade nos níveis plasmáticos do miR-451 foram relatados também em diferentes condições. Camkurt (2015) estudou o plasma de pacientes diagnosticados com depressão severa em busca de biomarcadores com foco nos miRNAs, e relatou altos níveis de mir-451a, em relação a um grupo controle (utilizando como normalizador de expressão o método matemático de Mestdagh et al., 2009). Apesar do grupo não ter analisado

a presença de hemólise na amostra, o miR-451a já tinha sido detectado no cérebro de camundongos em tratamento com cetamina, um anestésico utilizado para manutenção da analgesia e para o tratamento psiquiátrico de quadros clínicos agudos, em uma correlação inversa (O'Connor et al., 2013). Ainda, um alvo predito do miR-451a é a proteína SLC17A7, expressa amplamente no cérebro em regiões com grande quantidade de neurônios relacionados a produção de vesículas sinápticas e transporte de glutamato.

No plasma de pacientes com carcinoma papilífero de tireoide (CPT) foram observados altos níveis de miR-451a, em comparação com pacientes com nódulos benignos de tireoide e indivíduos controles normais, sugerindo que o miR-451a possa ser utilizado como um marcador de CPT. Nesse trabalho foram utilizados como normalizadores de expressão os snRNA U6 e U48 (Li et al., 2015).

Os efeitos da hemólise sobre a extração do RNA total e na quantificação da expressão dos miRNAs, parece não ser uniforme para todos os miRNAs. Kirschner (2011) utilizou amostras com absorbância acima de 0.25 (até 0.8) e analisou a expressão dos miRNAs (além dos miRNAs miR-16 e miR-451) miR-15b, miR-24, miR-92 e miR-155, observando que a presença de hemólise alterava os valores dos miRNAs miR-16, miR-92 e miR-155, mas não dos miRNAs miR-15b ou miR-24, e demonstrou que os valores destes são estáveis mesmo na presença de hemólise. Shkurnikov (2016) reportou que a presença de ~0,05% de hemácias no plasma era suficiente para alterar os níveis de detecção de alguns miRNAs. O grupo analisou o plasma de 39 indivíduos com o kit GeneChip microRNA 4.0 (Affymetrix) microarrays, relatando que a presença de hemólise alterava os níveis de 9 miRNAs: miR-486-5p, miR-16-5p, miR-451a, miR-106a-5p, miR-17-5p, miR-93-5p, miR-20a-5p, miR-107, e miR-20b-5p.

Analisando outros fatores, Max (2018) traçou valores de referência em 216 amostras de plasma para vários miRNAs, buscando perfis diferenciais entre homens e mulheres saudáveis, e a presença ou ausência de jejum no momento da coleta. Utilizando a relação de Pearson, uma

diferença intermediária ($r=0.68$, $p<0.05$) foi observada em alguns miRNAs entre os gêneros, sendo os miRNAs: miR-1, -141, -200a/b/c, -375, aumentado nas amostras de plasmas de indivíduos do sexo feminino, e os miRNAs, miR-146a, -218 e -429 aumentados nas amostras de plasmas de indivíduos do sexo masculino, o valor máximo de diferença dos valores foi de 4x. Em relação a presença ou ausência de jejum, uma pequena variação foi observada em relação ao miR-518 apenas.

As associações entre miRNAs plasmáticos e atributos como sexo, idade, índice de massa corporal (IMC), foram avaliadas por Ameling (2015) num grupo de indivíduos normais utilizando uma abordagem de regressão linear em duas etapas para cada miRNA avaliado. Os resultados obtidos no estudo demonstraram que os miRNAs circulantes são fortemente impactados pelos três parâmetros. Os autores sugerem, que esses parâmetros deveriam ser considerados covariáveis em estudos de associação baseados nos níveis plasmáticos de miRNA (Ameling et al., 2015).

Levando em conta que os perfis de miRNAs podem ser influenciados por esses fatores, selecionamos indivíduos controles do sexo masculino em conformidade com o sexo cromossômico dos pacientes portadores de DDS 46,XY para a comparação dos resultados. No entanto, dois realizaram cirurgia de feminização genital e gonadectomia na infância e estão em uso de estrogênioterapia. Nesta etapa do trabalho, essa paciente teve seus resultados comparados com controles masculinos e nenhuma diferença no padrão de expressão dos miRNAs foi observada. Na literatura, diferenças significativas nos níveis plasmáticos de expressão do miRNA nas diferentes fases do ciclo menstrual não foram identificadas (Rekker et al., 2013).

Apesar de ambos os miRNAs miR-200c e miR-210 selecionados para este estudo terem apresentados resultados inéditos e importantes, a análise completa das funções e integrações em vias de sinalização chaves no desenvolvimento da genitália externa masculina,

prosseguiram apenas com o miR-220c, visto que fatores externos como hemólise – por exemplo – não afetam sua biodisponibilidade, fato que ainda não pode ser confirmado em relação ao miR-210.

Nossos resultados representam a quantificação dos níveis plasmáticos de expressão dos miRNAs em indivíduos controles masculinos adultos com um número considerável de amostras, mas um número bastante reduzido de indivíduos pré-púberes, o que constitui uma limitação para as análises, visto que o grupo pediátrico não está ainda bem representado nesses controles. A idade representa um fator que pode alterar esses valores, pelo menos para alguns miRNAs (Hooten et al., 2010 & 2013). Não identificamos nenhum estudo sobre a interferência dos esteroides sexuais, (testosterona e/ou estrógeno) na expressão plasmática de miRNAs, mas esta possibilidade não pode ser desprezada.

O desenvolvimento da genitália externa em humanos ocorre em duas fases: a mais precoce (5 a 8 semanas de gestação) é independente da ação hormonal e é indistinguível entre homens e mulheres e na fase subsequente (semanas 8 a 12) a ação do hormônio masculino dihidrotestosterona (DHT), metabólito ativo da testosterona, conduz o desenvolvimento genital masculino; na ausência da DHT ou da sua ação o desenvolvimento do primórdio genital evolui no sentido da genitália feminina. Anormalidades nas vias de sinalização e interações gênicas envolvidas nas duas etapas do desenvolvimento genital podem determinar anomalias da genitália externa fetal e subvirilização nos indivíduos 46,XY. Uma limitação dos nossos achados é a temporalidade, uma vez que não podemos assegurar que os achados atuais reproduzam o mesmo perfil de expressão do miR-200c nos pacientes DDS 46,XY no período fetal época do desenvolvimento genital.

Para estudar como modificações pós-transcricionais regulam mecanismos de fertilidade, Hasuwa (2013) produziram camundongos *Knock out* (KO) para os miRNAs miR-200b e miR-429 (selecionados por estudo *in silico*). O grupo observou anovulação e infertilidade em

camundongos fêmeas, demonstrando que a repressão destes miRNAs na glândula pituitária promovia a expressão de Zeb1, reprimindo a síntese de LH, fato observado em 90% desta linhagem. No entanto, sem alterações da fertilidade em camundongos machos KO para os mesmos miRNAs.

Messina (2016) observou que a ausência de DICER, uma endonuclease central na biogênese de miRNAs (figura 2), em neurônios produtores de GnRH (hormônio liberador da gonadotrofina humana, do inglês, *Gonadotropin-Releasing Hormone*), essencial para o desenvolvimento da puberdade e da fertilidade, em linhagem de camundongo (machos e fêmeas, n=6 em cada grupo) KO para a proteína DICER, resultou em camundongos com hipogonadismo hipogonadotrófico e infertilidade. Em concordância com Hasuwa (2013) os níveis séricos de LH e FSH estavam reduzidos em camundongos KO machos e fêmeas, e altos níveis de Zeb1 foram detectados, neste caso, nos neurônios produtores de GnRH.

Para avaliar quais miRNAs poderiam estar envolvidos no controle dos níveis de GnRH, Messina analisou (com os kits *Taqman Low Density Arrays* e posteriormente por RT-qPCR) miRNAs diferentemente expressos em neurônios produtores de GnRH em relação aos não produtores de GnRH. Como resultado, foram selecionados miRNAs da família do miR-200 (incluindo membros miR-141 e miR-429), que são descritos como reguladores do Zeb1, previamente descritos (Hasuwa et al., 2013).

Nos neurônios produtores GnRH dos animais selvagens, os níveis proteicos de Zeb1, que são estáveis durante a infância dos camundongos selvagens, com a aproximação da puberdade sofrem uma redução, fato que não foi observado nos camundongos KO para DICER, pelo contrário, houve aumento dos níveis de Zeb1.

Messina (2019) estudou os efeitos da injeção direta de miR-200a/b/c e miR-155 em cérebro de camundongos fêmeas pré-púberes, e observou início precoce da puberdade nestes animais em cerca de 10 dias antes dos controles, sendo estatisticamente significantes para os

injetados com o miR-200. Adicionalmente, em camundongos fêmeas adultas férteis, a injeção direta de miR-200a/b/c na região hipotalâmica pré-óptica, resultou na queda dos níveis séricos de LH, e ovulação incompleta. Estes dados demonstram que o par miR-200/Zeb1 é um importante regulador de GnRH, atuando durante o desenvolvimento da puberdade e fertilidade, em camundongo, fato que pode ser estendido a regulação nos seres humanos, uma vez que, os sítios de interação miRNA/proteína, tanto para miR-200a/b/c, quanto para o Zeb1 e GnRH são conservados nestas espécies (Hasuwa et al., 2013). Os estudos de referência na literatura sobre os alvos do miR-200c estão resumidos na tabela 11-12.

O estudo detalhado da expressão do miR-200c no grupo controle revelou alguns aspectos deste miRNA ainda não relatados. Embora um pequeno número de controles jovens tenha sido avaliado, um incremento significativo da expressão média de miR-200c plasmático foi observado em controles mais velhos ($p < 0.05$); com nível de expressão estável nos subgrupos de indivíduos maiores de 13 anos. Nós hipotetizamos que o perfil de expressão do miR-200c possa estar relacionada a condição púber. Os indivíduos do grupo de controle não tiveram seus níveis de testosterona medidos, mas todos os controles mais jovens (idade < 13 anos) eram meninos pré-púberes confirmados por exame genital. O mesmo perfil de expressão de miR-200c foi identificado em pacientes pré-púberes DDS 46,XY quando comparados aos pacientes pós-púberes DDS 46,XY ($p = 0.008$). Esses achados reforçam nossa sugestão de que a condição puberal pode interferir nos níveis circulantes de miR-200c.

Watahiki (2013) reportou altos níveis de miR-200c em plasma e soro de pacientes com câncer de próstata resistente a castração (CRPC, do inglês, *Castration Resistent Prostate Cancer*), em relação a pacientes portadores de câncer de Próstata isolado (PCa, do inglês, *Prostate Cancer*), utilizando o miR-30e como normalizador. Já Souza (2017) observou reduzidos níveis de miR-200c no plasma de pacientes com PCa, em relação a controles normais, utilizando os snRNA RNU6B e RNU48 como normalizadores.

Zhang (2013) reportou elevados níveis de miR-200c no plasma e em amostras tumorais de pacientes com câncer colorretal em relação a controles normais, utilizando como normalizador o snRNA RNU6B. Em concordância, Chen (2014), reportou elevados níveis de miR-200c no plasma de pacientes também com câncer colorretal e em relação a controles normais, mas utilizando o cel-miR-39 como normalizador. Ainda, Maierthaler (2016), também observou elevados níveis de miR-200c no plasma de pacientes com câncer colorretal, mas somente entre os grupos em estágio I-III, em relação ao grupo em estágio IV, e não em relação a controles, utilizando o cel-miR-39 como normalizador.

Markou (2016) observou elevados níveis de miR-200c no plasma de pacientes portadores de câncer de mama em relação a controles normais, e reduzidos nos tumores em comparação a tecidos adjacentes, foi utilizado como normalizador o miR-191, outros estudos relatam as mesmas observações em tumores (Kumar et al., 2015). Em concordância, Papadaki (2018) estudou pacientes com câncer de mama divididos em dois grupos; reincidentes e não reincidentes, e observou níveis elevados de miR-200c no plasma dos reincidentes, utilizando o miR-23a como normalizador. Ademais, Fogli (2017) observou baixos níveis de miR-200c no plasma de pacientes com melanoma em estágios III e IV, em relação a controles normais, utilizando a média dos valores de cada miRNA estudado como normalizador, sem a utilização de normalizadores biológicos específicos.

No entanto, ressaltamos que a seleção do miR-200c, como um alvo do nosso estudo, foi influenciada pelo relato de Qian (2016) que identificou uma menor expressão do miR-200c em amostras de hipospádias, e cultura celular derivada destas, em um modelo animal com ratos portadores de hipospádia em comparação com animais normais sem hipospádia. Embora o processo do desenvolvimento da genitália externa masculina entre murinos e humanos tenha diferenças significativas, eles ainda são os melhores modelos animais para o estudo de mecanismos genéticos no desenvolvimento do tubérculo genital (Haller et al., 2019).

Neste contexto, avaliamos uma possível correlação dos níveis de expressão plasmática do miR-200c e o grau de virilização da genitália externa dos pacientes com DDS 46,XY, classificados de acordo com o índice de masculinização externa (EMS) proposto por Ahmed (2000). O grupo de pacientes pós-púberes com maior índice (MVG, índice ≥ 5) de virilização apresentou níveis médios de expressão do miR-200c acima ao dos indivíduos controles, e o grupo de pacientes DDS 46,XY com menor EMS (MVG, índice < 5) (ANOVA $p=0.013$). Essa diferença estatística também foi observada entre MVG e PVG ($p=0.01$).

A menor expressão do miR-200c em tecido peniano de ratos com hipospádia foi associado ao aumento da expressão de um fator de transcrição denominado, homeobox 1 de ligação à E-box do dedo de zinco (Zeb1, do inglês, *Zinc finger E-box-binding homeobox 1*) e, em paralelo, de Transforming Growth Factor- β (TGF- β) e SMAD Family Member 3 (Smad3). Ensaios de validação confirmaram a interação do par miR-200c/Zeb1, indicando que a supressão do miR-200c, aumenta Zeb1 e, consequentemente, ativa a sinalização via TGF- β /Smad3 (Qian et al., 2016)

A presença de super expressão de ZEB1 na pele peniana de pacientes com hipospádia grave foi descrita por Qiao (2011). No trabalho, a descrição das características da genitália externa desses pacientes não foi realizada, não sendo possível saber se o grupo estudado era constituído de pacientes com atipia genital ou hipospádia isolada. Nesse estudo, foi demonstrado *in vitro* que o estrogênio aumentava a expressão de ZEB1 em uma linhagem celular de fibroblasto de prepúcio humano. Em estudo subsequente, o mesmo autor sugere que um possível mecanismo pelo qual o estrogênio contribuiria para o desenvolvimento de hipospádia seria via expressão anormal do AR induzida por estrogênio e mediada pelo ZEB1 (Qiao et al., 2012).

Nossos achados em relação à expressão plasmática do miR-200c em pacientes com atipia genital se assemelham aos observados por Qian (2016) na expressão tecidual do mesmo

miRNA em modelos animais com hipospádia, sendo a via ZEB de forte interesse em nosso trabalho, como apresentado por Qiao (2011 & 2012).

Um estudo recente sobre o desenvolvimento da uretra de ratos confirmou que alguns mecanismos como (I) tubulogênese, (II) fusão da placa uretral, (III) EMT e (IV) apoptose de células epiteliais são responsáveis pelo desenvolvimento normal da uretra. Além disso, o rompimento de tais mecanismos pode explicar a malformação da uretra (Zhou et al., 2017). A variabilidade dos níveis de expressão do miR-200c entre os pacientes DDS 46,XY mostrou uma gama considerável de valores quando analisados por EMS. Esse achado pode estar associado à heterogeneidade da etiologia desses grupos de pacientes com DDS 46,XY com etiologia desconhecida e, podem explicar os padrões de expressão dos grupos PVG e MVG aqui apresentados, uma vez que diferentes mecanismos poderiam atuar em cada etiologia.

A relação miR-200c/ZEB1 tem sido amplamente discutida na literatura. Guo (2016) investigou (por RT-qPCR) a expressão dos miRNAs miR-200c e miR-141 em 10 gliomas humanos (Vs tecidos adjacentes normais) e linhagens celulares derivadas (U87, U251 e A172) e observou baixos níveis de miR-200c e miR-141 em ambos, e altos níveis de ZEB1. Adicionalmente, a transfecção das linhagens tumorais (U87 e U251) com miR-200c ou miR-141, reduziu significativamente a expressão proteica de ZEB1, e a capacidade de migração e desenvolvimento das células tumorais. Paralelamente, a transfecção de siRNA para o ZEB1 nestas linhagens apresentou efeitos semelhantes. Zhang (2017), investigaram a interação do par miR-200c/Foxf2, em câncer de mama. A transfecção do miR-200c em uma linhagem metastática de câncer de mama (denominada MDA-MD-231), reduziu significativamente a expressão proteica de Foxf2 e ZEB1.

Zhan (2019), demonstrou que o miR-200c inibe ZEB2 resultando em redução da capacidade de migração e invasão da linhagem celular derivada de carcinoma de próstata humano, transfectada com miR-200c. Adicionalmente, em linhagem não transfectada, a

repressão de ZEB2 restaura os níveis de miR-200c. A análise da expressão de miR-200c por RT-qPCR em amostras de câncer de próstata e tecidos normais adjacentes, revelou baixos níveis do miR-200c em amostras tumorais, e a análise da expressão proteica de ZEB2 por *Western blot* revelou níveis proteicos aumentados de ZEB2 nos tumores. Paralelamente, Zhan (2019) também realizou ensaios de luciferase-repórter com a 3'UTR do mRNA de ZEB2 e miR-200c validando em estudo funcional a interação do par miR-200c/ZEB2, e o miR-200c como determinante na progressão do carcinoma de próstata. A análise do miR-200c no plasma em estudos de câncer citados acima e de outros estudos importantes, estão resumidas na tabela 16.

Afastado dos estudos em câncer, Yang (2018), estudou e validou o *loop* de sinalização do par miR-200c/Zeb2, em neurônios dopaminérgicos de camundongos, demonstrando que a atenuação (ou *Knock Down*, KD) da expressão do miR-200c resulta em níveis proteicos reduzidos de NR4A2 (do inglês, *Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2*, necessário para o desenvolvimento de neurônios dopaminérgicos) no desenvolvimento do mesencéfalo, consequentemente impedindo a diferenciação. Ainda, a transfecção do miR-200c em linhagem dopaminérgica reduz os níveis proteicos de Zeb2, sendo observado, em paralelo, que a super expressão de Zeb2, nestas, eleva os níveis de pri-miR-200c, demonstrando a regulação do par miR-200c/Zeb2, na neurogênese de células do mesencéfalo.

Tabela 11: Resumo dos achadosos de trabalhos envolvendo o miRNA miR-200c no plasma em estudos de câncer

	Autores	Casuística	Níveis de miR-200c no plasma	Níveis de miR-200c nos tumores <i>Tumor Vs Tecido adjacente</i>	Método	RNA normalizador	Número de pacientes	Idade mínima-máxima (e mediana)	Número de controles	Idade mínima-máxima (e mediana)
1	Ali et al., 2011	Câncer de Pâncreas	Reduzido (em relação a controles normais)	n.a.	RT-qPCR	miR-16	32	#	10 Controles normais	#
2	Torres et al., 2012	Câncer de Endométrio	s.d.e. (em relação a controles normais)	s.d.e.	RT-qPCR	RNU48, RNU44 e U75	34**	56-63(60)	14** Controles normais	49-59(54)
3	Watahiki et al., 2013	Câncer de próstata castração-resistente CRPCa	Aumentado (CRPCa em relação a Câncer de Próstata PCa)	n.a.	RT-qPCR	miR-30e	25	#	25	#
4	Zhang et al., 2013	Câncer Colorretal	Aumentado (em relação a controles normais)	Aumentado	RT-qPCR	RNU6B	78	#(60)	86 Controles normais	#(61)
5	Chen et al., 2014	Câncer Colorretal	Aumentado (em relação a controles normais)	n.a.	RT-qPCR	cel-miR-39	15	#	20	#
6	Maiertaler et al., 2016	Câncer Colorretal	Aumentado (plasma de pacientes em estágio IV em relação a estagio I-III)	n.a.	RT-qPCR	cel-miR-39	309 (metastático, estágio I, II e III)	33-92(70)	234 (não metastático, estágio IV)	36-92 (68)

Tabela 11: fim

	Autores	Casuística	Níveis de miR-200c no plasma	Níveis de miR-200c nos tumores <i>Tumor Vs Tecido adjacente</i>	Método	RNA normalizador	Número de pacientes	Idade mínima-máxima (e mediana)	Número de controles	Idade mínima-máxima (e mediana)
7	Markou et al., 2016	Câncer de Mama	Aumentado (em relação a controles normais)	Reduzido	RT-qPCR	miR-191	55	#	20	#
8	Fogli et al., 2017	Câncer de pele	Reduzido (em relação a controles normais)	n.a.	RT-qPCR	Sem normalizador: Média global Cq – Individual e estabilidade	20 (melanoma em estágio III e IV)	#	32 Controles normais	#
9	Souza et al., 2017	Câncer de Próstata	Reduzido (em relação a controles normais)	n.a.	RT-qPCR	RNU6B e RNU48	92	#	50	#
10	Papadaki et al., 2018	Câncer de Mama	Aumentado (pacientes reincidentes em relação a não reincidentes)	n.a.	RT-qPCR	miR-23 ^a	84 Reincidentes	#	49 Não reincidentes	#

Legenda: Os grupos comparados na coluna níveis de miR-200c no plasma estão descritos entre parêntese (), n.a. - não aferido, s.d.e. - sem diferença estatística, ** femininos somente, # - idade e sexo dos grupos descritos nominalmente no estudo como “sem diferenças estatisticamente significantes”. Demais descrições em outras colunas estão entre parênteses ().

Tabela 12: Alvos do miR-200c em estudos de referência na literatura

	Autores	Alvo	Orgão	Correlação	Tipo de validação	Modelo
1	Samrat et al., 2016	FOXF2 e Foxf2	Pulmão	Inversa	Transfecção/supereexpressão	Células tumorais: Humano e camundongo
2	Zhang et al., 2017	FOXF2 e *ZEB1	Mama	Inversa	Transfecção/supereexpressão	Células tumorais: Humano
3	Guo et al., 2016	ZEB1	Cérebro	Inversa	Transfecção/supereexpressão	Células tumorais (Glioma): Humano
4	Chen et al., 2017	PTEN	Nasofaringe	Inversa	Transfecção/supereexpressão	Células tumorais: Humano
5	Zhou et al., 2018	ZEB1 e 2	Estômago	Inversa	Transfecção/supereexpressão	Células tumorais: Humano
6	Zhan et al., 2019	ZEB2	Próstata	Inversa	Transfecção/supereexpressão	Células tumorais: Humano
7	Dermani et al., 2018	β -catenina	Reto	Inversa	Tratamento com Zerumbone/Repressão	Células tumorais: Humano
8	Li et al., 2019	SOX2	Rim	Inversa	Transfecção/supereexpressão	Células tumorais: Humano
9	Cao et al., 2019	DACH1	Nasofaringe	Inversa	Transfecção/repressão	Células tumorais: Humano
10	Zhang et al., 2019	Wnt1	Placenta	Inversa	Transfecção/supereexpressão	Trofoblastos: Camundongo

Legenda: Relação de aumento/ aumento = positiva, redução/ redução = negativa, redução/ aumento ou aumento/ redução = inversa. *Não observado diretamente.

Diversos estudos também demonstram a interação do mir-200c com vias de sinalização importantes como a via WNT/ β -Catenina (do inglês, *Wingless and INT-1*) responsável por regular diversos processos do desenvolvimento embrionário, algumas reconhecidamente participantes do desenvolvimento sexual (Clevers et al., 2006).

Em nosso estudo, o grau de virilização da genitália externa de pacientes com DDS 46,XY de etiologia desconhecida, calculado pela EMS, correlacionou-se com os níveis de expressão de miR-200c no plasma. Pacientes com PVG apresentaram baixos valores de expressão de miR-200c, comparáveis aos valores observados em controles pré-púberes,

indicando que a menor expressão de miR-200c pode ter um papel no desenvolvimento anormal da genitália externa como no posicionamento do meato uretral. Em nosso grupo de pacientes pós-púberes DDS 46,XY, 4 de 5 pacientes PVG apresentavam hipospádia perineal e um apresentava hipospádia peniana. Já no grupo MVG, 3 de 7 pacientes apresentavam hipospádia perineal, 2 apresentavam hipospádia escrotal e um apresentava meato uretral tópico.

Alinhado ao disponível na literatura até o momento, nossos dados demonstram que a seleção de miRNAs realizada em nosso trabalho revelou miRNAs de interesse para o estudo em do desenvolvimento sexual masculino, e que poderão ser usados futuramente para auxiliar o diagnóstico das DDS 46,XY, especialmente quando - após o conjunto de exames de diagnóstico, por imagem, molecular e/ou citogenético - não se tem uma causa estabelecida. Além disso, o apresentado em nosso trabalho pode abrir um novo campo de investigação nas DDS, ainda pouco estudado na literatura, em um momento em que as ferramentas clássicas de diagnóstico, como NGS, estão atingindo um limiar de descobertas. A inclusão de novas ferramentas e métodos de estudo das DDS, como a análise de miRNAs, poderá melhorar a forma e a precisão diagnóstica.

7. CONCLUSÃO

7.1. Conclusão principal

Um padrão distinto de expressão do miR-200c foi observado entre pacientes e controles. Os achados mostraram um aumento da expressão plasmática do miR-200c no subgrupo de pacientes MVG DDS 46,XY pós-púberes e uma diminuição no subgrupo PVG em relação aos controles pós-púberes. Interessantemente, a análise de expressão do miR-200c se relaciona com o desenvolvimento da puberdade, tanto entre controles quanto em pacientes, dado não descrito na literatura. Em relação ao miR-210, os pacientes portadores de DDS 46,XY tanto púberes como pré-púberes revelam expressão aumentada em relação aos grupos controles respectivos. Esses achados podem estar relacionados as características fenotípicas presentes no grupo de pacientes DDS 46,XY sem etiologia estabelecida, e podem indicar a ação mecanismos epigenéticos no desenvolvimento da genitália externa masculina.

7.2. Conclusão detalhada

7.2.1. A seleção de miRNAs realizada pela análise *in silico* de bancos de dados de miRNAs e da literatura médica resultou na escolha de três miRNAs candidatos. A análise da expressão plasmática de dois dos miRNAs candidatos, o miR-200c e o miR-210, evidenciou padrões de expressão diferentes entre os grupos de pacientes DDS 46,XY de causa indeterminada e de controles masculinos.

7.2.2. Os miRNAs selecionados como candidatos e como controles internos das reações de qPCR foram detectados nas amostras do plasma de pacientes DDS 46,XY e de controles, em ambos os grupos classificados como pré-púberes e pós-púberes,

7.2.3. Pacientes com DDS 46,XY pós púberes com genitália externa pouco virilizada (PVG) apresentaram uma média dos níveis de expressão plasmática do miR-200c menor do que os controles pós-púberes, indicando que a falha no aumento da expressão do miR-200c possa estar envolvida em mecanismos temporais de desenvolvimento e também, que possa ser utilizada como uma assinatura. A maior expressão plasmática do miR-200c observada em pacientes DDS 46,XY pós púberes com genitália externa moderadamente virilizada (MVG), sugere que pelo menos dois mecanismos distintos possam estar envolvidos nas diferenças do desenvolvimento sexual nestes grupos de pacientes.

7.2.3.1. O perfil de expressão plasmática do miR-210, significativamente maior nos pacientes DDS 46,XY, independentemente do desenvolvimento puberal ou do grau de virilização genital, em relação ao nível de expressão em controles sugere uma associação deste miRNA aos mecanismos do desenvolvimento sexual atemporal, sendo que tais mecanismos ainda precisam de maiores estudos para elucidação.

7.2.4. As evidências da associação do miR-200c-ZEB1 nos processos de transição epitélio-mesenquimal e de apoptose celular, os quais reconhecidamente participam da formação da uretra masculina normal, corroboram com os nossos achados. Estudos mais aprofundados do papel dos miRNAs, miR-200c e miR210, na patogênese da genitália atípica de pacientes com DDS 46,XY necessitam ser realizados, especialmente quanto a avaliação do perfil desses miRNAs durante o período fetal. Apesar dos nossos resultados sugerirem que os miRNAs circulantes possam representar potenciais biomarcadores para algumas condições de DDS 46,XY, a ampliação do número de indivíduos estudados e a realização de novas abordagens experimentais são fundamentais para a validação dos resultados aqui apresentados.

8. REFERÊNCIAS

1. ABU-HALIMA, M.; BACKES, C.; LEIDINGER, P.; KELLER, A. *et al.* MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. **Fertil Steril**, 101, n. 1, p. 78-86.e72, Jan 2014.
2. ACHERMANN, J. C.; DOMENICE, S.; BACHEGA, T. A.; NISHI, M. Y. *et al.* Disorders of sex development: effect of molecular diagnostics. **Nat Rev Endocrinol**, 11, n. 8, p. 478-488, Aug 2015.
3. ADACHI, M.; TAKAYANAGI, R.; TOMURA, A.; IMASAKI, K. *et al.* Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease. **N Engl J Med**, 343, n. 12, p. 856-862, Sep 2000.
4. AGARWAL, V.; BELL, G. W.; NAM, J. W.; BARTEL, D. P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **Elife**, 4, Aug 2015.
5. AHMED, S. F.; KHWAJA, O.; HUGHES, I. A. The role of a clinical score in the assessment of ambiguous genitalia. **BJU Int**, 85, n. 1, p. 120-124, Jan 2000.
6. AMBROS, V.; BARTEL, B.; BARTEL, D. P.; BURGE, C. B. *et al.* A uniform system for microRNA annotation. **RNA**, 9, n. 3, p. 277-279, Mar 2003.
7. AMELING, S.; KACPROWSKI, T.; CHILUKOTI, R. K.; MALSCH, C. *et al.* Associations of circulating plasma microRNAs with age, body mass index and sex in a population-based study. **BMC Med Genomics**, 8, p. 61, Oct 2015.
8. ARNHOLD, I. J.; MELO, K.; COSTA, E. M.; DANILOVIC, D. *et al.* 46,XY disorders of sex development (46,XY DSD) due to androgen receptor defects: androgen insensitivity syndrome. **Adv Exp Med Biol**, 707, p. 59-61, 2011.
9. BACKES, C.; KEHL, T.; STÖCKEL, D.; FEHLMANN, T. *et al.* miRPathDB: a new dictionary on microRNAs and target pathways. **Nucleic Acids Res**, 45, n. D1, p. D90-D96, 01 2017a.
10. BACKES, C.; KEHL, T.; STÖCKEL, D.; FEHLMANN, T. *et al.* miRPathDB: a new dictionary on microRNAs and target pathways. **Nucleic Acids Res**, 45, n. D1, p. D90-D96, 01 2017b.
11. BALZANO, F.; DEIANA, M.; DEI GIUDICI, S.; OGGIANO, A. *et al.* miRNA Stability in Frozen Plasma Samples. **Molecules**, 20, n. 10, p. 19030-19040, Oct 2015.
12. BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, 116, n. 2, p. 281-297, Jan 2004.
13. BATISTA, R. L.; COSTA, E. M. F.; RODRIGUES, A. S.; GOMES, N. L. *et al.* Androgen insensitivity syndrome: a review. **Arch Endocrinol Metab**, 62, n. 2, p. 227-235, 2018 Mar-Apr 2018.
14. BAXTER, R. M.; ARBOLEDA, V. A.; LEE, H.; BARSEGHYAN, H. *et al.* Exome sequencing for the diagnosis of 46,XY disorders of sex development. **J Clin Endocrinol Metab**, 100, n. 2, p. E333-344, Feb 2015.
15. BECKER, C.; HAMMERLE-FICKINGER, A.; RIEDMAIER, I.; PFAFFL, M. W. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. **Methods**, 50, n. 4, p. 237-243, Apr 2010.
16. BENNETT, N. C.; GARDINER, R. A.; HOOPER, J. D.; JOHNSON, D. W. *et al.* Molecular cell biology of androgen receptor signalling. **Int J Biochem Cell Biol**, 42, n. 6, p. 813-827, Jun 2010.
17. BERBER, U.; YILMAZ, I.; NARLI, G.; HAHOLU, A. *et al.* miR-205 and miR-200c: Predictive Micro RNAs for Lymph Node Metastasis in Triple Negative Breast Cancer. **J Breast Cancer**, 17, n. 2, p. 143-148, Jun 2014.
18. BLONDAL, T.; JENSBY NIELSEN, S.; BAKER, A.; ANDREASEN, D. *et al.* Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. **Methods**, 59, n. 1, p. S1-6, Jan 2013.
19. BOURAS, E.; KARAKIOULAKI, M.; BOUGIOUKAS, K. I.; AIVALIOTIS, M. *et al.* Gene promoter methylation and cancer: An umbrella review. **Gene**, 710, p. 333-340, Aug 2019.
20. BUTZ, H.; KINGA, N.; RACZ, K.; PATOCS, A. Circulating miRNAs as biomarkers for endocrine disorders. **J Endocrinol Invest**, 39, n. 1, p. 1-10, Jan 2016.
21. CAO, W.; SUN, J. MicroRNA-200c promotes tumor cell proliferation and migration by directly targeting dachshund family transcription factor 1 by the Wnt/ β -catenin signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. **Anticancer Drugs**, 30, n. 3, p. 218-224, Mar 2019.
22. CAPRI, M.; OLIVIERI, F.; LANZARINI, C.; REMONDINI, D. *et al.* Identification of miR-31-5p, miR-141-3p, miR-200c-3p, and GLT1 as human liver aging markers sensitive to donor-recipient age-mismatch in transplants. **Aging Cell**, 16, n. 2, p. 262-272, 04 2017.
23. CHEN, J.; WANG, W.; ZHANG, Y.; CHEN, Y. *et al.* Predicting distant metastasis and chemoresistance using plasma miRNAs. **Med Oncol**, 31, n. 1, p. 799, Jan 2014.
24. CHEN, P.; GUO, X.; ZHANG, L.; ZHANG, W. *et al.* MiR-200c is a cMyc-activated miRNA that promotes nasopharyngeal carcinoma by downregulating PTEN. **Oncotarget**, 8, n. 3, p. 5206-5218, Jan 2017.
25. CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, 162, n. 1, p. 156-159, Apr 1987.

26. CHOU, C. H.; SHRESTHA, S.; YANG, C. D.; CHANG, N. W. *et al.* miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. **Nucleic Acids Res**, 46, n. D1, p. D296-D302, 01 2018.
27. CHU, J. Y. S.; CHAU, M. K. M.; CHAN, C. C. Y.; TAI, A. C. P. *et al.* miR-200c Prevents TGF- β 1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Fibrogenesis in Mesothelial Cells by Targeting ZEB2 and Notch1. **Mol Ther Nucleic Acids**, 17, p. 78-91, Sep 2019.
28. CLEVERS, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. **Cell**, 127, n. 3, p. 469-480, Nov 2006.
29. COARFA, C.; FISKUS, W.; EEDUNURI, V. K.; RAJAPAKSHE, K. *et al.* Comprehensive proteomic profiling identifies the androgen receptor axis and other signaling pathways as targets of microRNAs suppressed in metastatic prostate cancer. **Oncogene**, 35, n. 18, p. 2345-2356, May 2016.
30. D'AGOSTINO, M.; MARTINO, F.; SILENO, S.; BARILLÀ, F. *et al.* Circulating. **Clin Sci (Lond)**, 131, n. 18, p. 2397-2408, Sep 2017.
31. DERMANI, F. K.; AMINI, R.; SAIDIJAM, M.; POURJAFAR, M. *et al.* Zerumbone inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells properties by inhibiting the β -catenin pathway through miR-200c. **J Cell Physiol**, 233, n. 12, p. 9538-9547, 12 2018.
32. DUAN, Z.; HUANG, H.; SUN, F. The functional and predictive roles of miR-210 in cryptorchidism. **Sci Rep**, 6, p. 32265, Aug 2016.
33. ENRIGHT, A. J.; JOHN, B.; GAUL, U.; TUSCHL, T. *et al.* MicroRNA targets in Drosophila. **Genome Biol**, 5, n. 1, p. R1, 2003.
34. EVILEN DA SILVA, T.; GOMES, N. L.; LERÁRIO, A. M.; KEEGAN, C. E. *et al.* Genetic evidence of the association of DEAH-box helicase 37 defects with 46,XY gonadal dysgenesis spectrum. **J Clin Endocrinol Metab**, Jul 2019.
35. FOGLI, S.; POLINI, B.; CARPI, S.; PARDINI, B. *et al.* Identification of plasma microRNAs as new potential biomarkers with high diagnostic power in human cutaneous melanoma. **Tumour Biol**, 39, n. 5, p. 1010428317701646, May 2017.
36. GERLACH, C.; ROELL, D.; BANIAHMAD, A. Analysis of ligand-specific co-repressor binding to the androgen receptor. **Methods Mol Biol**, 776, p. 199-223, 2011.
37. GOTTLIEB, B.; BEITEL, L. K.; NADARAJAH, A.; PALIOURAS, M. *et al.* The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. **Hum Mutat**, 33, n. 5, p. 887-894, May 2012.
38. GUO, E.; WANG, Z.; WANG, S. MiR-200c and miR-141 inhibit ZEB1 synergistically and suppress glioma cell growth and migration. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 20, n. 16, p. 3385-3391, 08 2016.
39. HAGMAN, Z.; HAFLIDADÓTTIR, B. S.; CEDER, J. A.; LARNE, O. *et al.* miR-205 negatively regulates the androgen receptor and is associated with adverse outcome of prostate cancer patients. **Br J Cancer**, 108, n. 8, p. 1668-1676, Apr 2013.
40. HALLER, M.; MA, L. Temporal, spatial, and genetic regulation of external genitalia development. **Differentiation**, 110, p. 1-7, Sep 2019.
41. HENDERSON, A. R. Testing experimental data for univariate normality. **Clin Chim Acta**, 366, n. 1-2, p. 112-129, Apr 2006.
42. HILL, L.; BROWNE, G.; TULCHINSKY, E. ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer. **Int J Cancer**, 132, n. 4, p. 745-754, Feb 2013.
43. HIORT, O. Clinical and molecular aspects of androgen insensitivity. **Endocr Dev**, 24, p. 33-40, 2013.
44. HU, L.; WU, C.; GUO, C.; LI, H. *et al.* Identification of microRNAs predominately derived from testis and epididymis in human seminal plasma. **Clin Biochem**, 47, n. 10-11, p. 967-972, Jul 2014.
45. HUGHES, I. A.; HOUK, C.; AHMED, S. F.; LEE, P. A. *et al.* Consensus statement on management of intersex disorders. **J Pediatr Urol**, 2, n. 3, p. 148-162, Jun 2006.
46. JIANG, C. Y.; RUAN, Y.; WANG, X. H.; ZHAO, W. *et al.* MiR-185 attenuates androgen receptor function in prostate cancer indirectly by targeting bromodomain containing 8 isoform 2, an androgen receptor co-activator. **Mol Cell Endocrinol**, 427, p. 13-20, May 2016.
47. JUNG, M.; SCHAEFER, A.; STEINER, I.; KEMPENSTEFFEN, C. *et al.* Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. **Clin Chem**, 56, n. 6, p. 998-1006, Jun 2010.
48. JØRGENSEN, A.; LINDHARDT JOHANSEN, M.; JUUL, A.; SKAKKEBAEK, N. E. *et al.* Pathogenesis of germ cell neoplasia in testicular dysgenesis and disorders of sex development. **Semin Cell Dev Biol**, 45, p. 124-137, Sep 2015.
49. KAROLINA, D. S.; TAVINTHARAN, S.; ARMUGAM, A.; SEPRAMANIAM, S. *et al.* Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, 97, n. 12, p. E2271-2276, Dec 2012.
50. KASHAT, M.; AZZOUZ, L.; SARKAR, S. H.; KONG, D. *et al.* Inactivation of AR and Notch-1 signaling by miR-34a attenuates prostate cancer aggressiveness. **Am J Transl Res**, 4, n. 4, p. 432-442, 2012.

51. KATO, M.; NATARAJAN, R. MicroRNAs in diabetic nephropathy: functions, biomarkers, and therapeutic targets. **Ann N Y Acad Sci**, 1353, p. 72-88, Sep 2015.
52. KAWAGUCHI, T.; YAN, L.; QI, Q.; PENG, X. *et al.* Overexpression of suppressive microRNAs, miR-30a and miR-200c are associated with improved survival of breast cancer patients. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 15945, 11 2017.
53. KIRSCHNER, M. B.; EDELMAN, J. J.; KAO, S. C.; VALLELY, M. P. *et al.* The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. **Front Genet**, 4, p. 94, 2013.
54. KIRSCHNER, M. B.; KAO, S. C.; EDELMAN, J. J.; ARMSTRONG, N. J. *et al.* Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. **PLoS One**, 6, n. 9, p. e24145, 2011.
55. KOMATSU, S.; ICHIKAWA, D.; TAKESHITA, H.; TSUJIURA, M. *et al.* Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, 105, n. 1, p. 104-111, Jun 2011.
56. KUMAR, B.; KHALEGHZADEGAN, S.; MEARS, B.; HATANO, K. *et al.* Identification of miR-30b-3p and miR-30d-5p as direct regulators of androgen receptor signaling in prostate cancer by complementary functional microRNA library screening. **Oncotarget**, 7, n. 45, p. 72593-72607, 11 2016.
57. KUMAR, S.; NAG, A.; MANDAL, C. C. A Comprehensive Review on miR-200c, A Promising Cancer Biomarker with Therapeutic Potential. **Curr Drug Targets**, 16, n. 12, p. 1381-1403, 2015.
58. KUMAR, S.; VIJAYAN, M.; BHATTI, J. S.; REDDY, P. H. MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. **Prog Mol Biol Transl Sci**, 146, p. 47-94, 2017.
59. KUNDU, S. T.; BYERS, L. A.; PENG, D. H.; ROYBAL, J. D. *et al.* The miR-200 family and the miR-183~96~182 cluster target Foxf2 to inhibit invasion and metastasis in lung cancers. **Oncogene**, 35, n. 2, p. 173-186, Jan 2016.
60. LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, 294, n. 5543, p. 853-858, Oct 2001.
61. LARNE, O.; HAGMAN, Z.; LILJA, H.; BJARTELL, A. *et al.* miR-145 suppress the androgen receptor in prostate cancer cells and correlates to prostate cancer prognosis. **Carcinogenesis**, 36, n. 8, p. 858-866, Aug 2015.
62. LEE, I.; BAXTER, D.; LEE, M. Y.; SCHERLER, K. *et al.* The Importance of Standardization on Analyzing Circulating RNA. **Mol Diagn Ther**, 21, n. 3, p. 259-268, 06 2017.
63. LEE, M. P. Understanding Cancer Through the Lens of Epigenetic Inheritance, Allele-Specific Gene Expression, and High-Throughput Technology. **Front Oncol**, 9, p. 794, 2019.
64. LEE, R. C.; AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, 294, n. 5543, p. 862-864, Oct 2001.
65. LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, 75, n. 5, p. 843-854, Dec 1993.
66. LEITE, K. R.; MORAIS, D. R.; FLOREZ, M. G.; REIS, S. T. *et al.* The role of microRNAs 371 and 34a in androgen receptor control influencing prostate cancer behavior. **Urol Oncol**, 33, n. 6, p. 267.e215-222, Jun 2015.
67. LI, S.; FENG, Z.; ZHANG, X.; LAN, D. *et al.* Up-regulation of microRNA-200c-3p inhibits invasion and migration of renal cell carcinoma cells via the SOX2-dependent Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Cancer Cell Int**, 19, p. 231, 2019.
68. LIU, H.; YANG, Y.; ZHANG, L.; LIANG, R. *et al.* Basic fibroblast growth factor promotes stem Leydig cell development and inhibits LH-stimulated androgen production by regulating microRNA expression. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 144 Pt B, p. 483-491, Oct 2014.
69. LIU, J.; MENG, T.; YUAN, M.; WEN, L. *et al.* MicroRNA-200c delivered by solid lipid nanoparticles enhances the effect of paclitaxel on breast cancer stem cell. **Int J Nanomedicine**, 11, p. 6713-6725, 2016 2016.
70. LUDWIG, N.; LEIDINGER, P.; BECKER, K.; BACKES, C. *et al.* Distribution of miRNA expression across human tissues. **Nucleic Acids Res**, 44, n. 8, p. 3865-3877, 05 2016.
71. MA, C.; SONG, H.; YU, L.; GUAN, K. *et al.* miR-762 promotes porcine immature Sertoli cell growth via the ring finger protein 4 (RNF4) gene. **Sci Rep**, 6, p. 32783, Sep 2016.
72. MA, W.; HU, S.; YAO, G.; XIE, S. *et al.* An androgen receptor-microRNA-29a regulatory circuitry in mouse epididymis. **J Biol Chem**, 288, n. 41, p. 29369-29381, Oct 2013.
73. MACLAUGHLIN, D. T.; DONAHOE, P. K. Sex determination and differentiation. **N Engl J Med**, 350, n. 4, p. 367-378, Jan 2004.
74. MACLELLAN, S. A.; MACAULAY, C.; LAM, S.; GARNIS, C. Pre-profiling factors influencing serum microRNA levels. **BMC Clin Pathol**, 14, p. 27, 2014.
75. MAIERTHALER, M.; BENNER, A.; HOFFMEISTER, M.; SUROWY, H. *et al.* Plasma miR-122 and miR-200 family are prognostic markers in colorectal cancer. **Int J Cancer**, 140, n. 1, p. 176-187, Jan 2017.

76. MARKOU, A.; ZAVRIDOU, M.; SOURVINOU, I.; YOUSEF, G. *et al.* Direct Comparison of Metastasis-Related miRNAs Expression Levels in Circulating Tumor Cells, Corresponding Plasma, and Primary Tumors of Breast Cancer Patients. **Clin Chem**, 62, n. 7, p. 1002-1011, Jul 2016.
77. MAX, K. E. A.; BERTRAM, K.; AKAT, K. M.; BOGARDUS, K. A. *et al.* Human plasma and serum extracellular small RNA reference profiles and their clinical utility. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 115, n. 23, p. E5334-E5343, 06 2018.
78. MELO, K. F.; MENDONÇA, B. B.; BILLERBECK, A. E.; COSTA, E. M. *et al.* [Androgen insensitivity syndrome: clinical, hormonal and molecular analysis of 33 cases]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 49, n. 1, p. 87-97, Feb 2005.
79. MENDONÇA, B. B.; BATISTA, R. L.; DOMENICE, S.; COSTA, E. M. *et al.* Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 163, p. 206-211, Oct 2016.
80. MENDONÇA, B. B.; COSTA, E. M.; BELGOROSKY, A.; RIVAROLA, M. A. *et al.* 46,XY DSD due to impaired androgen production. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 24, n. 2, p. 243-262, Apr 2010.
81. MENDONÇA, B. B.; DOMENICE, S.; ARNHOLD, I. J.; COSTA, E. M. 46,XY disorders of sex development (DSD). **Clin Endocrinol (Oxf)**, 70, n. 2, p. 173-187, Feb 2009.
82. MESSINA, A.; LANGLET, F.; CHACHLAKI, K.; ROA, J. *et al.* A microRNA switch regulates the rise in hypothalamic GnRH production before puberty. **Nat Neurosci**, 19, n. 6, p. 835-844, 06 2016.
83. MESTDAGH, P.; VAN VLIJBERGHE, P.; DE WEER, A.; MUTH, D. *et al.* A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. **Genome Biol**, 10, n. 6, p. R64, 2009.
84. MITCHELL, P. S.; PARKIN, R. K.; KROH, E. M.; FRITZ, B. R. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 30, p. 10513-10518, Jul 2008.
85. MONGAN, N. P.; TADOKORO-CUCCARO, R.; BUNCH, T.; HUGHES, I. A. Androgen insensitivity syndrome. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 29, n. 4, p. 569-580, Aug 2015.
86. MOREL, Y.; REY, R.; TEINTURIER, C.; NICOLINO, M. *et al.* Aetiological diagnosis of male sex ambiguity: a collaborative study. **Eur J Pediatr**, 161, n. 1, p. 49-59, Jan 2002.
87. MORET, I.; SÁNCHEZ-IZQUIERDO, D.; IBORRA, M.; TORTOSA, L. *et al.* Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction. **PLoS One**, 8, n. 12, p. e82753, 2013.
88. MORITOKI, Y.; HAYASHI, Y.; MIZUNO, K.; KAMISAWA, H. *et al.* Expression profiling of microRNA in cryptorchid testes: miR-135a contributes to the maintenance of spermatogonial stem cells by regulating FoxO1. **J Urol**, 191, n. 4, p. 1174-1180, Apr 2014.
89. NICOGLOU, A.; MERLIN, F. Epigenetics: A way to bridge the gap between biological fields. **Stud Hist Philos Biol Biomed Sci**, 66, p. 73-82, Dec 2017.
90. NIELSEN, L. B.; WANG, C.; SØRENSEN, K.; BANG-BERTHESEN, C. H. *et al.* Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression. **Exp Diabetes Res**, 2012, p. 896362, 2012.
91. NOREN HOOTEN, N.; ABDELMOHSEN, K.; GOROSPE, M.; EJOUGU, N. *et al.* microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. **PLoS One**, 5, n. 5, p. e10724, May 2010.
92. NOREN HOOTEN, N.; FITZPATRICK, M.; WOOD, W. H.; DE, S. *et al.* Age-related changes in microRNA levels in serum. **Aging (Albany NY)**, 5, n. 10, p. 725-740, Oct 2013.
93. OSTRER, H. Disorders of sex development (DSDs): an update. **J Clin Endocrinol Metab**, 99, n. 5, p. 1503-1509, May 2014.
94. PAPADAKI, C.; STRATIGOS, M.; MARKAKIS, G.; SPILIOTAKI, M. *et al.* Circulating microRNAs in the early prediction of disease recurrence in primary breast cancer. **Breast Cancer Res**, 20, n. 1, p. 72, 07 2018.
95. PASQUINELLI, A. E.; REINHART, B. J.; SLACK, F.; MARTINDALE, M. Q. *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, 408, n. 6808, p. 86-89, Nov 2000.
96. PRATS-PUIG, A.; ORTEGA, F. J.; MERCADER, J. M.; MORENO-NAVARRETE, J. M. *et al.* Changes in circulating microRNAs are associated with childhood obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, 98, n. 10, p. E1655-1660, Oct 2013.
97. PROCÓPIO, M. S.; DE AVELAR, G. F.; COSTA, G. M. J.; LACERDA, S. M. S. N. *et al.* MicroRNAs in Sertoli cells: implications for spermatogenesis and fertility. **Cell Tissue Res**, Aug 2017.
98. QIAN, C.; DANG, X.; WANG, X.; XU, W. *et al.* Molecular Mechanism of MicroRNA-200c Regulating Transforming Growth Factor- β (TGF- β)/SMAD Family Member 3 (SMAD3) Pathway by Targeting Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 (ZEB1) in Hypospadias in Rats. **Med Sci Monit**, 22, p. 4073-4081, Oct 2016.

99. QIAO, L.; TASIAN, G. E.; ZHANG, H.; CAO, M. *et al.* Androgen receptor is overexpressed in boys with severe hypospadias, and ZEB1 regulates androgen receptor expression in human foreskin cells. **Pediatr Res**, 71, n. 4 Pt 1, p. 393-398, Apr 2012.
100. QIAO, L.; TASIAN, G. E.; ZHANG, H.; CUNHA, G. R. *et al.* ZEB1 is estrogen responsive in vitro in human foreskin cells and is over expressed in penile skin in patients with severe hypospadias. **J Urol**, 185, n. 5, p. 1888-1893, May 2011.
101. QU, F.; CUI, X.; HONG, Y.; WANG, J. *et al.* MicroRNA-185 suppresses proliferation, invasion, migration, and tumorigenicity of human prostate cancer cells through targeting androgen receptor. **Mol Cell Biochem**, 377, n. 1-2, p. 121-130, May 2013.
102. REINHART, B. J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A. E. *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, 403, n. 6772, p. 901-906, Feb 2000.
103. REKKER, K.; SAARE, M.; ROOST, A. M.; SALUMETS, A. *et al.* Circulating microRNA Profile throughout the menstrual cycle. **PLoS One**, 8, n. 11, p. e81166, 2013.
104. ROBEVSKA, G.; VAN DEN BERGEN, J. A.; OHNESORG, T.; EGGERS, S. *et al.* Functional characterization of novel NR5A1 variants reveals multiple complex roles in disorders of sex development. **Hum Mutat**, 39, n. 1, p. 124-139, 01 2018.
105. SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metab Rev**, 32, n. 3-4, p. 307-326, 2000 Aug-Nov 2000.
106. SIKAND, K.; SLAIBI, J. E.; SINGH, R.; SLANE, S. D. *et al.* miR 488* inhibits androgen receptor expression in prostate carcinoma cells. **Int J Cancer**, 129, n. 4, p. 810-819, Aug 2011.
107. SIMON, P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. **Bioinformatics**, 19, n. 11, p. 1439-1440, Jul 2003.
108. SOURVINOU, I. S.; MARKOU, A.; LIANIDOU, E. S. Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability. **J Mol Diagn**, 15, n. 6, p. 827-834, Nov 2013.
109. SOUZA, M. F.; KUASNE, H.; BARROS-FILHO, M. C.; CILIÃO, H. L. *et al.* Circulating mRNAs and miRNAs as candidate markers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. **PLoS One**, 12, n. 9, p. e0184094, 2017.
110. TAN, M. H.; LI, J.; XU, H. E.; MELCHER, K. *et al.* Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. **Acta Pharmacol Sin**, 36, n. 1, p. 3-23, Jan 2015.
111. TANAKA, S. S.; NISHINAKAMURA, R. Regulation of male sex determination: genital ridge formation and Sry activation in mice. **Cell Mol Life Sci**, 71, n. 24, p. 4781-4802, Dec 2014.
112. TAYLOR, S.; WAKEM, M.; DIJKMAN, G.; ALSARRAJ, M. *et al.* A practical approach to RT-qPCR- Publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, 50, n. 4, p. S1-5, Apr 2010.
113. TORRES, A.; TORRES, K.; PESCI, A.; CECCARONI, M. *et al.* Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients. **Int J Cancer**, 132, n. 7, p. 1633-1645, Apr 2013.
114. VALENCIA-SANCHEZ, M. A.; LIU, J.; HANNON, G. J.; PARKER, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. **Genes Dev**, 20, n. 5, p. 515-524, Mar 2006.
115. VICKERS, K. C.; PALMISANO, B. T.; SHOUCRI, B. M.; SHAMBUREK, R. D. *et al.* MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. **Nat Cell Biol**, 13, n. 4, p. 423-433, Apr 2011.
116. WANG, Y.; WU, Z.; HU, L. The regulatory effects of metformin on the [SNAIL/miR-34]:[ZEB/miR-200] system in the epithelial-mesenchymal transition(EMT) for colorectal cancer(CRC). **Eur J Pharmacol**, 834, p. 45-53, Sep 2018.
117. WEBER, J. A.; BAXTER, D. H.; ZHANG, S.; HUANG, D. Y. *et al.* The microRNA spectrum in 12 body fluids. **Clin Chem**, 56, n. 11, p. 1733-1741, Nov 2010.
118. WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, 75, n. 5, p. 855-862, Dec 1993.
119. WONG, C. H.; SONG, C.; HENG, K. S.; KEE, I. H. *et al.* Plasma free hemoglobin: a novel diagnostic test for assessment of the depth of burn injury. **Plast Reconstr Surg**, 117, n. 4, p. 1206-1213, Apr 2006.
120. WU, Q.; YE, X.; XIONG, Y.; ZHU, H. *et al.* The Protective Role of microRNA-200c in Alzheimer's Disease Pathologies Is Induced by Beta Amyloid-Trigged Endoplasmic Reticulum Stress. **Front Mol Neurosci**, 9, p. 140, 2016.
121. YANG, S.; TOLEDO, E. M.; ROSMANINHO, P.; PENG, C. *et al.* A Zeb2-miR-200c loop controls midbrain dopaminergic neuron neurogenesis and migration. **Commun Biol**, 1, p. 75, 2018.
122. YOSHIMATSU, G.; TAKITA, M.; KANAK, M. A.; HAQUE, W. Z. *et al.* MiR-375 and miR-200c as predictive biomarkers of islet isolation and transplantation in total pancreatectomy with islet autotransplantation. **J Hepatobiliary Pancreat Sci**, 23, n. 9, p. 585-594, Sep 2016.

123. ZAMPETAKI, A.; KIECHL, S.; DROZDOV, I.; WILLEIT, P. *et al.* Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. **Circ Res**, 107, n. 6, p. 810-817, Sep 2010.
124. ZHANG, J.; ZHANG, H.; QIN, Y.; CHEN, C. *et al.* MicroRNA-200c-3p/ZEB2 loop plays a crucial role in the tumor progression of prostate carcinoma. **Ann Transl Med**, 7, n. 7, p. 141, Apr 2019.
125. ZHANG, T.; WAN, J. G.; LIU, J. B.; DENG, M. MiR-200c inhibits metastasis of breast tumor via the downregulation of Foxf2. **Genet Mol Res**, 16, n. 3, Aug 2017.
126. ZHANG, X.; GE, Y. W.; WANG, Z. X.; XU, Q. L. *et al.* MiR-200c regulates apoptosis of placental trophoblasts in preeclampsia rats through Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 23, n. 17, p. 7209-7216, Sep 2019.
127. ZHOU, X.; MEN, X.; ZHAO, R.; HAN, J. *et al.* miR-200c inhibits TGF- β -induced-EMT to restore trastuzumab sensitivity by targeting ZEB1 and ZEB2 in gastric cancer. **Cancer Gene Ther**, 25, n. 3-4, p. 68-76, 05 2018.
128. ZHOU, Y.; LIU, X.; HUANG, F.; LIU, Y. *et al.* Epithelial-mesenchymal transformation and apoptosis in rat urethra development. **Pediatr Res**, 82, n. 6, p. 1073-1079, Dec 2017.
129. ZUBERI, M.; MIR, R.; DAS, J.; AHMAD, I. *et al.* Expression of serum miR-200a, miR-200b, and miR-200c as candidate biomarkers in epithelial ovarian cancer and their association with clinicopathological features. **Clin Transl Oncol**, 17, n. 10, p. 779-787, Oct 2015.
130. ÖSTLING, P.; LEIVONEN, S. K.; AAKULA, A.; KOHONEN, P. *et al.* Systematic analysis of microRNAs targeting the androgen receptor in prostate cancer cells. **Cancer Res**, 71, n. 5, p. 1956-1967, Mar 2011.

10. ANEXOS

Anexo A: Concentração de RNA e cDNA obtidas por diferentes métodos de quantificação

Figura 10: A. Concentração de RNA ou cDNA obtidos após extração de RNA do plasma e reação de pré-amplificação do cDNA, respectivamente. B. Concentração de cDNA após a reação de pré-amplificação do cDNA de diferentes extrações. C. Concentração de cDNA obtida a partir do uso de um fluorômetro com kit específico de quantificação de cDNA (Qubit 2.0 e Qubit HS dsDNA) e um nanofotômetro, os valores médios estão descritos pelos números acima dos traços (média). Barras retangulares representam média, as barras das extremidades representam desvio padrão. As comparações foram feitas com o uso do teste t de Student, ns - não significativo, *** $p < 0.0001$.

Anexo B: Comparação dos valores de Ct obtidos à partir de diferentes diluições do cDNA

Figura 11: Análise de Ct de acordo com a diluição 1:2 (barras brancas) ou concentração de 1ng (barras pontilhadas) do cDNA após a reação de miR-Amp em três amostras controles. A. miR-23a. B. miR-200c. C. miR-210. Barras retangulares representam valores de mediana. Barras superior e inferior representam intervalo interquartil (Quartil Q3 e Q1, respectivamente). Valores foram analisados pelo teste de Mann-Whitney nos pares 1:2 Vs 1ng. ns - não significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$.

Anexo C: Média de idade de pacientes e controles**Tabela 13:** Idade média dos pacientes e controles

	Pacientes		
	Púberes+Pré-Púberes (P+PP)	Púberes (P)	Pré-Púberes (PP)
n	10	6	4
Média	12,16	18,87	2,08
Desvio padrão	10,53	8,01	0,453

	Controles				
	miR-23a	miR-451a	miR-200c	miR-210	Total
n	29	33	15	24	33
Média	30,66	30,28	29,00	31,46	30,28
Desvio padrão	11,38	10,72	10,16	11,86	10,72

Legenda: A distribuição de idade foi avaliada pelo teste de Pearson, todos os grupos apresentam distribuições gaussianas. n = tamanho da amostra.

Anexo D: Grafico da média de idades de Pacientes DDS 46,XY e Controles

Figura 12: Média e distribuição dos dados de idade nos grupos de pacientes (P+PP, subgrupos púberes P, e pré-púberes, PP) e controles (separados por subgrupos de acordo com os dados de qPCR de amplificação dos miRNAs). A. Distribuição média da idade dos pacientes em anos. B. Distribuição média da idade dos controles em anos. Os círculos representam dados individuais dos pacientes e losangos representam dados individuais dos controles. As barras representam média (barra do meio) e desvio padrão (barras das extremidades). Os dados foram avaliados quanto a distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk.

Anexo E: Tabela com genes estudados no painel genômico para pacientes Portadores de DDS 46,XY

Tabela 14: Genes estudados no painel customizado de genes- alvos associados às DDS. Este painel foi elaborado a partir da ferramenta AgilentSure Design 2.0 (Agilent Technologies) e realizado pela plataforma Illumina.

Genes									
ACBD7	ACVR1B	ACVRL1	AKR1C2	AKR1C3	AKR1C4	AMH	AMHR2	AR	ARL6
ARX	ATRX	BBS1	BBS10	BBS12	BBS2	BBS4	BBS5	BBS7	BBS9
BMP15	BMP8B	BMPR1B	CAMK1D	CBLN1	CHD7	CITED2	CITED4	CTNNB1	CUL7
CYP11A1	CYP17A1	CYP19A1	CYP26B1	DHCR7	DHH	DHX37	DMRT1	DMRT2	DNAJC15
DND1	ESR1	FAM189A2	FBLN2	FGD1	FGF9	FGFR2	FOXL2	FRAT1	FSHR
FST	GADD45G	GATA4	GATA6	GDF9	GDNF	GPR56	GPR83	GTF2F1	HHAT
HNF1B	HPGDS	HSD11B1	HSD17B3	HSD3B2	IGF1R	IHH	INHBB	IRX3	KATNAL1
KATNBL1	LEF1	LGR5	LHCGR	LHX1	MAMLD1	MAP3K1	MKKS	MSX1	NANOS2
NANOS3	NCOA1	NCOA2	NCOA3	NR0B1	NR3C1	NR5A1	PAPPA	PDGFA	PDGFRB
POR	PRKACG	PTGDS	PUM2	RSPO1	RSPO2	SIX1	SIX4	SMAD4	SMARCE1
SOX10	SOX13	SOX7	SOX9	SRA1	SRD5A2	SRY	STAG3	STAR	STIM1
SUPT3H	TCF21	TRIM32	TRIM37	UBE3A	USP34	WT1	WWOX	ZFPM2	

Anexo F: Estatística descritiva dos grupos para análise por $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Tabela 15: Estatística descritiva por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (miR-200c)

Grupo	Tipo de distribuição	Transformação	Estatística
Controles Pós-púberes	Não Gaussiana	LogNormal ($y=\log(y)$)	Média $\pm$ SD
Controles Pré-púberes	Não Gaussiana	LogNormal ($y=\log(y)$)	Média $\pm$ SD
DDS 46,XY Pós-púberes	Não Gaussiana	LogNormal ($y=\log(y)$)	Média $\pm$ SD
PVG	***	LogNormal ($y=\log(y)$)	Média $\pm$ SD
MVG	***	LogNormal ($y=\log(y)$)	Média $\pm$ SD
DDS 46,XY Pré-púberes	Não Gaussiana	LogNormal ($y=\log(y)$)	Média $\pm$ SD

Legenda: PVG, pacientes DDS 46,XY pós-púberes, classificados de acordo com EMS em pouco virilizados; MVG, pacientes DDS 46,XY pós-púberes, classificados de acordo com EMS em moderadamente virilizados. *** n pequeno para teste; logNormal = transformação de valores com base no uso logarítmico dos valores; SD = desvio padrão.

Tabela 16: Estatística descritiva por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (miR-210)

Grupo	Tipo de distribuição	Transformação	Estatística
Controles Pós-púberes	Incerta	Sem transformação	Mediana + intervalo interquartil
Controles Pré-púberes	Incerta	Sem transformação	Mediana + intervalo interquartil
DDS 46,XY Pós-púberes	Incerta	Sem transformação	Mediana + intervalo interquartil
PVG	***	Sem transformação	Mediana + intervalo interquartil
MVG	***	Sem transformação	Mediana + intervalo interquartil
DDS 46,XY Pré-púberes	Incerta	Sem transformação	Mediana + intervalo interquartil

Legenda: PVG, pacientes DDS 46,XY pós-púberes, classificados de acordo com EMS em pouco virilizados; MVG, pacientes DDS 46,XY pós-púberes, classificados de acordo com EMS em moderadamente virilizados. Foram utilizados 4 testes estatísticos para avaliação de distribuição de dados, que foram considerados para distribuição Gaussiana ou não Gaussiana quando 3 testes eram concordantes; Incerta = metade dos testes de distribuição aponta para distribuição não Gaussiana, portanto os dados foram tratados como tal; *** n pequeno para teste.

Anexo G: Estatística descritiva da análise de expressão absoluta dos miRNAs miR-200c e miR-210

Tabela 17: Estatística descritiva da análise de expressão absoluta por $2^{-\Delta Ct}$ do miR-200c e do miR-210

miRNAs	Distribuição	Transformação	Estatística
miR-200c	Não Gaussiana	LogNormal ($y=\log(y)$)	Média $\pm$ SD
miR-210	Não Gaussiana	LogNormal ($y=\log(y)$)	Média $\pm$ SD

Legenda: O ΔCt foi calculado com o miR-23a como referência. Foram utilizados 4 testes estatísticos para avaliação de distribuição de dados, que foram considerados para distribuição Gaussiana ou não Gaussiana quando 3 testes eram concordantes. SD = desvio padrão.

11. APÊNDICES

Apêndice 1: Extração de RNA do plasma: Kit MagMAX mirVana Total RNA Isolation(Thermofisher)

1.1 Digestão com proteinase K:

1- Pré aquecer o tampão de eluição a 65°C

2- Preparar o mix de DNase:

Tampão MagMAX Turbo DNase: 48ul por amostra

Turbo DNase: 2ul por amostra

3- Preparar o mix de digestão PK:

Tampão de digestão PK: 45ul por amostra

Proteinase K: 5ul por amostra

4- Adicionar 50ul do mix de digestão em 100ul de plasma (1 amostra)

5- Agitar a 800RPM por 5min em temperatura ambiente (TA)

6- Incubar a 65°C por 30min

1.2. Lise das amostras e ligação do RNA as beads:

7- Preparar o mix de ligação e lise:

Tampão de lise: 99ul por amostra

2-Mercaptoetanol: 1 ul por amostra

8- Adicionar 100ul do mix de ligação e lise por amostra

9- Adicionar 20ul de RNA Binding Beads (beads) por amostra

10- Agitar a 500RPM por 7min

11- Adicionar 270ul de Isopropanol por amostra

12- Agitar a 500RPM por 15min

1.3. Lavagem do RNA:

13- Colocar a placa sobre a estante magnético por 5min

14- Descartar o sobrenadante

Apêndice 1 (fim)

- 15- Retirar a placa da estante magnética e adicionar 150ul da solução de lavagem 1
- 16- Agitar a 800RPM por 1min
- 17- Descartar o sobrenadante
- 18- Repetir os passos de 13 a 17, usando a solução de lavagem 2

1.4. Tratamento com DNase:

- 19- Adicionar 50 ul do mix de DNase para cada amostra
- 20- Agitar a 1000RPM por 15min
- 21- Adicionar 50ul do tampão de religação e 100ul de Isopropanol por amostra
- 22- Agitar a 800RPM por 5min
- 23- Colocar a placa sobre a estante magnética por 5min
- 24- Descartar o sobrenadante
- 25- Retirar a placa da estante magnética e adicionar 150ul da solução de lavagem 2 por amostra
- 26- Agitar em Vortex em velocidade média por 30s
- 27- Colocar a placa sobre a estante magnética por 1min
- 28- Descartar o sobrenadante
- 29- Repetir os passos de 19 a 28

1.5. Eluição do RNA:

- 30- Adicionar 50ul de tampão de eluição em cada amostra
- 31- Agitar a 1000RPM por 5min
- 32- Incubar a 65°C por 5min
- 33- Agitar a 1000RPM por 2min
- 34- Colocar a placa sobre a estante magnética por 5min
- 35- Coletar o sobrenadante

Apêndice 2: Quantificação de RNA e cDNA

2.1. Quantificação de RNA: kit Qubit HS RNA (Thermofisher)

1- Preparar o mix:

Tampão do kit 199ul para cada amostra

Fluoróforo 1ul para cada amostra

2- Adicionar 5ul do RNA extraído do plasma em 195ul do mix

3- Manter em temperatura ambiente por 15min

4- Ler no aparelho Qubit 2.0 (Thermofisher)

2.2. Quantificação de cDNA após a reação de miR-AMP: kit Qubit HS dsDNA (Thermofisher)

1- Preparar o mix:

Tampão do kit 199ul para cada amostra

Fluoróforo 1ul para cada amostra

2- Adicionar 5ul do cDNA pré-amplificado (miR-Amp) em 195ul do mix

3- Manter em temperatura ambiente por 15min

4- Ler no aparelho Qubit 2.0 (Thermofisher)

Apêndice 3: Adição de cauda poli(A), Adaptador, transcrição reversa (RT) e pré-amplificação: kit Taqman Advanced miRNA Assays (Thermofisher)

[A partir do RNA extraído do plasma]

3.1. Reação de Ligação de cauda Poli(A):

1- Prepara o mix de ligação 1:

10x tampão poli(A): 0.5ul por amostra

ATP: 0.5ul por amostra

Enzima poli(A): 0.3ul por amostra

ddH₂O: 1.7ul por amostra

2- Adicionar 3ul do mix de ligação para cada 2ul de RNA extraído do plasma

3- Agitar para misturar os reagentes

4- Centrifugar em velocidade mínima para assentar os reagentes

5- Iniciar a reação em termociclador:

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Poliadenilação	37	45
Inibição	65	10
Hold	4	∞

3.2. Reação de Ligação do adaptador:

1- Preparar o mix de ligação 2:

5x Tampão de de DNA ligase: 3ul por amostra

50% PEG 8000: 4.5ul por amostra

25X Adaptador: 0.6ul por amostra

RNA ligase: 1.5ul por amostra

ddH₂O: 0.4 ul por amostra

2- Adicionar 10ul do mix de ligação 2 em 5ul do produto da reação anterior

Apêndice 3 (continuação)

- 3- Agitar para misturar os reagentes
- 4- Centrifugar em velocidade mínima para assentar os reagentes
- 5- Iniciar a reação em termociclador:

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Ligação	16	60
Hold	4	∞

3.3. Reação de transcrição reversa (RT):

- 1- Preparar o mix de RT:
 - 5x Tampão de RT: 6ul por amostra
 - dNTP (25mM cada): 1.2ul por amostra
 - 20X primer universal: 1.5ul por amostra
 - 10X mix da Enzima de RT: 3ul por amostra
 - DdH₂O: 3.3ul por amostra
- 2- Adicionar 15ul do mix de RT em 15ul do produto da reação anterior
- 3- Agitar para misturar os reagentes
- 4- Centrifugar em velocidade mínima para assentar os reagentes
- 5- Iniciar a reação em termociclador:

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Transcrição Reversa	42	15
Inibição	85	5
Hold	4	∞

Apêndice 3 (fim)

3.4. Reação de pré-amplificação (miR-Amp):

1- Preparar o mix miR-Amp:

2x miR-Amp Master mix: 25ul por amostra

20x miR-Amp Primer mix: 2.5ul por amostra

ddH₂O: 17.5ul por amostra

2- Adicionar 5ul de cDNA em 45ul de mix miR-Amp

3- Agitar para misturar os reagentes

4- Centrifugar em velocidade mínima para assentar os reagentes

5- Iniciar a reação em termociclador:

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Ativação enzimática	95	5min	1
Denaturação	95	3s	14
Anelamento/Extensão	60	30s	
Inibição	99	10min	1
Hold	4	∞	

Apêndice 4: Reação quantitativa de Polimerase Reversa em tempo real (qPCR)

1- Diluir amostras de cDNA para [] final de 0.400ng/ul

2- Preparar o mix de qPCR:

TaqMan Fast Advanced Master Mix (2x): 5ul por amostra

TaqMan Advanced miRNA Assay* (20x): 0.5ul por amostra

ddH₂O: 2ul por amostra

*sondas individuais para cada miRNA estudado

3- Adicionar 2.5ul de cDNA (=1ng) e 7.5ul do mix de qPCR por poço na placa de 96 poços específica para qPCR.

4- Agitar em Vortex em velocidade baixa por 5min

5- Centrifugar em velocidade mínima para assentar os reagentes

6- Iniciar a reação em termociclador:

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Ativação enzimática	95	20s	1
Denaturação	95	3s	40
Anelamento/Extensão	60	30s	

Apêndice 5: TCLE ilustrado

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HCFMUSP TERMO ILUSTRADO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Informações ao participante da pesquisa Participantes de pesquisa de 6 a 10 anos completos

Olá, você está sendo convidado a participar de uma pesquisa realizada no Hospital das Clínicas. Os cientistas do nosso grupo de pesquisa querem descobrir como alguns órgãos do nosso corpo se desenvolvem.

O que acontecerá comigo se eu resolver participar desta pesquisa?

Durante a cirurgia, enquanto você estiver dormindo com a anestesia, seu médico irá tirar um pouco de sangue, mais ou menos o que cabe em 2 colheres de sopa, igual a um exame de sangue comum. Essa amostra de sangue será enviada para nosso laboratório para ser examinada.

Além disso, ainda na cirurgia quando você estiver dormindo com a anestesia, seu médico irá tirar um pedacinho bem pequeno de pele, mais ou menos do tamanho de um grão de arroz, que também será trazida para nosso laboratório para ser examinada.

Nada disso vai te machucar e você não vai sentir nenhuma dor, o seu médico vai realizar estes exames com todo cuidado e você estará dormindo com a anestesia.

Apêndice 5 (continuação)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HCFMUSP TERMO ILUSTRADO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O que acontecerá depois?

Essas amostras que seu médico colheu serão trazidas para nosso laboratório, para fazer pesquisas.

Você quer participar da nossa pesquisa?

Um grupo de pessoas chamado Comitê de Ética aprovou essa pesquisa e vai acompanhar e conferir tudo o que vamos fazer durante esta pesquisa, para garantir que tudo seja feito com muito cuidado e que seu médico tome conta de você. Se você tiver quiser fazer qualquer pergunta, seu médico está pronto para responder o que quiser saber. Você pode decidir ou não participar da nossa pesquisa e sua decisão será respeitada. Se decidir participar você irá contribuir para o avanço da nossa pesquisa. Se decidir não participar não tem problema algum, todo seu tratamento continuará como planejado.

Você gostaria de participar?

Se sim, escreva seu nome aqui: _____

Com quem falar em caso de dúvidas?

Existem algumas opções que você ou o seu responsável, que é a pessoal que cuida de você, podem usar para entrar em contato:

- 1- Você pode procurar seu médico ou a Dra. Sorahia Domenice que é a médica responsável por essa pesquisa no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42, no departamento de Endocrinologia, que fica no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) no endereço: Av. Dr. Enéas Carvalho Aguiar, 155, 2º andar do PAMB, bloco 6, São Paulo-SP, Brasil, CEP-05403-000. Os telefones são (11)2661-7512 e (11)2661-7330
- 2- Você pode procurar também as pessoas do Comitê de Ética, que são quem aprovam e acompanham estas pesquisas. O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) fica localizado na Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar, prédio da administração. O telefone é (11)2661-7585, e o e-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Assinatura do pesquisador

Data:/...../.....

Apêndice 6: TCLE para coleta de sangue

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA DE SANGUE

Dados da pesquisa

O projeto denominado "Avaliação da Influência de microRNAs na Subvirilização de Pacientes Portadores de DDS 46,XY com Diagnóstico Indeterminado" é conduzido sob a supervisão da Profa. Dra. Sorahia Domenice no departamento de Endocrinologia/LIM42 do HCFMUSP. A avaliação de risco é: Risco Mínimo.

Convite à participação

O Senhor está sendo convidado a participar de um estudo que irá investigar a influência de pequenas moléculas derivadas do DNA, denominadas microRNAs, no processo do desenvolvimento de estruturas e órgãos do corpo. Este estudo está sendo conduzido pela Profa. Dra. Sorahia Domenice no Hospital das Clínicas Da Faculdade de Medicina Da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. O Senhor pode se recusar a participar ou retirar-se do estudo a qualquer momento, sem que isso afete de forma alguma o tratamento que o Senhor está recebendo, caso esteja recebendo.

Justificativa e objetivos do estudo

Este estudo se faz necessário, pois aproximadamente 10% das crianças com doenças do desenvolvimento sexual que são atendidas no nosso departamento não têm diagnóstico causal. Nosso objetivo é estudar diferentes moléculas denominadas microRNAs, que estão presentes naturalmente nas células dos órgãos e no sangue, e investigar se existe uma alteração da quantidade destas moléculas entre um grupo controle e nosso grupo de pacientes.

Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados

Para este estudo será necessário a coleta de 6 mL de sangue (correspondente a 2 colheres de sopa), através de uma picada com agulha estéril e descartável. Esta coleta ocorrerá na sala de coleta de sangue, no ambulatório de Endocrinologia do HCFMUSP.

Explicitação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa

O desconforto da coleta de sangue é a dor da picada da agulha e eventualmente o aparecimento de um pequeno hematoma (mancha arroxeada em torno da picada) que desaparecerá em pouco menos de uma semana. É improvável que ocorram danos físicos a partir da coleta de sangue.

Benefícios esperados para o participante

Se decidir participar deste estudo o senhor poderá contribuir para a identificação de alterações que possam ser responsáveis pelo surgimento de malformações dos genitais durante a gestação em várias crianças.

Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência

Ao participar deste estudo é garantido o acesso a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir quaisquer dúvidas. Há também o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa.

Garantias

Ao participar deste estudo é garantido o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade da assistência. Seu tratamento, caso esteja realizando algum, não será afetado em nenhuma forma se o senhor decidir retirar seu consentimento e as suas amostras (o material obtido) serão destruídas.

Ressarcimento e indenização

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Está garantida a indenização diante de eventuais danos comprovadamente decorrentes desta pesquisa.

Uso de dados e resultados do estudo

As informações dos seus dados individuais e de saúde serão colocadas em um banco de dados de acesso controlado. Isso significa que somente os pesquisadores que se solicitarem e obtiverem permissão para usar as informações para um projeto de pesquisa específico poderão acessar as informações. Os dados e as informações de saúde não terão a identificação com o seu nome ou outra informação que possa ser usada para identificá-lo. Os pesquisadores que tiverem acesso as informações no banco de dados concordarão em não te identificar. Os dados deste estudo também poderão ser publicados em periódicos nacionais ou internacionais e não haverá identificação dos seus dados pessoais ou amostras, nem seu nome será citado.

Rubrica do participante/ Representante legal

Rubrica do(a) responsável pelo estudo

Apêndice 6 (continuação)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP
 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA DE SANGUE

Em qualquer etapa do estudo, o Senhor terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é a Profa. Dra. Sorahia Domenice, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Éneas de Carvalho Aguiar, 155, 2º andar, PAMB, bloco 6, São Paulo-SP, telefones (11) 2661-7512, (11) 2661-6330. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo "Avaliação da Influência de microRNAs na Subviralização de Pacientes Portadores de DDS 46,XY com Diagnóstico Indeterminado". Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Profa. Dra. Sorahia Domenice, ou pessoa(s) por ela delegada(s) (Felipe Martins Elias, pós-graduando) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

Nome do paciente e RGHC (Identificação HCFMUSP)

Assinatura do participante/ Representante legal
 Data/...../.....

Assinatura do(a) responsável pelo estudo
 Data/...../.....

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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

Apêndice 7: TCLE para casos (coleta de material cirúrgico e sangue)

Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CASOS

Dados da pesquisa

O projeto denominado "Avaliação da Influência de microRNAs na Subvirilização de Pacientes Portadores de DDS 46,XY com Diagnóstico Indeterminado" é conduzido sob a supervisão da Profa. Dra. Sorahia Domenice no departamento de Endocrinologia/LIM42 do HCFMUSP. A avaliação de risco é: Risco Mínimo.

Convite à participação

O Senhor está sendo convidado a participar de um estudo que irá investigar a influência de pequenas moléculas derivadas do DNA, denominadas microRNAs, no processo do desenvolvimento de estruturas e órgãos do corpo. Este estudo está sendo conduzido pela Profa. Dra. Sorahia Domenice no Hospital das Clínicas Da Faculdade de Medicina Da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Sua participação neste estudo é voluntária. O Senhor pode se recusar a participar ou retirar-se do estudo a qualquer momento, sem que isso afete de forma alguma o tratamento que o Senhor está recebendo.

Justificativa e objetivos do estudo

Este estudo se faz necessário, pois aproximadamente 10% das crianças com doenças do desenvolvimento sexual que são atendidas no nosso departamento não têm diagnóstico causal. Nosso objetivo é estudar diferentes moléculas denominadas microRNAs, que estão presentes naturalmente nas células dos órgãos e no sangue, e investigar se existe uma alteração da quantidade destas moléculas entre um grupo controle e nosso grupo de pacientes.

Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados

Será coletado cerca de 6 ml de sangue (correspondente a 2 colheres de sopa), através de uma picada com agulha estéril e descartável durante a cirurgia. Também durante a cirurgia que será realizada para o seu tratamento, alguns pequenos fragmentos da pele genital (correspondente a um grão de arroz) serão coletados. Estes fragmentos são geralmente retirados no processo cirúrgico e posteriormente descartados. No procedimento que propomos, iremos utilizar estes fragmentos para analisar os níveis de microRNAs presentes. Se nenhum fragmento for retirado durante a cirurgia, iremos manter apenas a amostra de sangue.

Explicitação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa

A coleta do pequeno fragmento de pele genital será realizada durante a cirurgia e o senhor estará sob efeito de anestesia, não se espera desconforto decorrente desta coleta, pode ocorrer leve dor no local após a cirurgia, que deverá diminuir e desaparecer em cerca de uma semana. O desconforto da coleta de sangue é a dor da picada da agulha e eventualmente o aparecimento de um pequeno hematoma (mancha arroxada em torno da picada) que desaparecerá em pouco menos de uma semana. É improvável que ocorram danos físicos a partir da coleta de sangue.

Benefícios esperados para o participante

Se decidir participar deste estudo o senhor poderá contribuir para a identificação de alterações que possam ser responsáveis pelo surgimento de malformações dos genitais durante a gestação em várias crianças.

Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência

Ao participar deste estudo é garantido o acesso a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir quaisquer dúvidas. Há também o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa.

Garantias

Ao participar deste estudo é garantido o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade da assistência. Seu tratamento não será afetado em nenhuma forma se o senhor decidir retirar seu consentimento e as suas amostras serão destruídas.

Ressarcimento e indenização

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, portanto não há compensação financeira relacionada à sua participação. Está garantida a indenização diante de eventuais danos comprovadamente decorrentes desta pesquisa.

Uso de dados e resultados do estudo

As informações dos seus dados individuais e de saúde serão colocadas em um banco de dados de acesso controlado. Isso significa que somente os pesquisadores que se solicitarem e obtiverem permissão para usar as informações para um projeto de pesquisa específico poderão acessar as informações. Os dados e as informações de saúde não terão a identificação com o seu nome ou outra informação que possa ser usada para identificá-lo. Os pesquisadores que tiverem acesso as informações no banco de dados concordarão em não te identificar. Os dados deste estudo também poderão ser publicados em periódicos nacionais ou internacionais e não haverá identificação dos seus dados pessoais ou amostras, nem seu nome será citado.

Rubrica do participante/Representante legal

Rubrica do(a) responsável pelo estudo

Apêndice 7 (continuação)

Hospital das Clínicas
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP
 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CASOS

Em qualquer etapa do estudo, o Senhor terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é a Profa. Dra. Sorahia Domenice, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Éneas de Carvalho Aguiar, 155, 2º andar, PAMB, bloco 6, São Paulo-SP, telefones (11) 2661-7512, (11) 2661-6330. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo "Avaliação da Influência de microRNAs na Subviralização de Pacientes Portadores de DDS 46,XY com Diagnóstico Indeterminado". Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Profa. Dra. Sorahia Domenice, ou pessoa(s) por ela delegada(s) (Felipe Martins Elias, pós-graduando) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante/ Representante legal
 Data/...../.....

Assinatura do responsável pelo estudo
 Data/...../.....

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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