MAÍRA PONTUAL BRANDÃO

**Análise do gene *MAMLD1(CXorf6)* em
pacientes com distúrbios do desenvolvimento
sexual 46, XY de origem indeterminada**

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

Programa de: Endocrinologia

Orientadora: Prof. Dr^a. Elaine Maria Frade Costa

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Brandão, Máira Pontual

Análise do gene *MAMLD1*(*CXorf6*) em pacientes com distúrbios do desenvolvimento sexual 46, XY de origem indeterminada / Máira Pontual Brandão. -- São Paulo, 2011.

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

Orientadora: Elaine Maria Frade Costa.

Descritores: 1.Distúrbios do desenvolvimento sexual 2.Diferenciação sexual 3.Mutação 4.Gene *MAMLD1* 5.Genética 6.DDS 46, XY de origem indeterminada

USP/FM/DBD-251/11

Apoio: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): bolsa de doutorado 143489/2008-9, Fundação Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e bolsa de auxílio para pesquisador estrangeiro pelo Departamento de Endocrinologia e Metabologia do *National Research Institute for Child Health and Development*, Tóquio, Japão.

Este trabalho foi realizado na Unidade Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42 da disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Endocrinologia do *National Research Institute for Child Health and Development*, Tóquio, Japão.

Dedicatória

Aos meus pais, Sérgio e Virgínia, por todo amor e por me ensinar que a dúvida abre espaço para descoberta, ao Vamberto por dividir comigo as escolhas, os prêmios e as lágrimas que trilhamos juntos e por todo amor e carinho, as minhas três filhas, Júlia, Clara e Alice, por me ensinarem a valorizar as pequenas conquistas e a ter paciência para esperar as grandes e a Deus por tornar palpável para mim aquilo que todos os poetas desejam descrever e jamais conseguem.

Agradecimentos

Todo o conhecimento científico é construído e aprendido ao longo de várias etapas e processos, assim como as fases da nossa vida. Na vida como na ciência, sorrimos, choramos, encontramos obstáculos, ganhamos e perdemos. Gostaria de dividir mais essa etapa da minha vida com todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o meu aprendizado científico e para a construção desta tese de doutorado. Agradeço a todos que participaram da minha vida científica e vou contar um pouco dela.

Nascimento: Preciso começar agradecendo as primeiras pessoas que incentivaram o meu interesse pela descoberta e investigação. Desde muito pequena e durante toda minha vida, meus pais, Sérgio e Virgínia, incitaram minha sede de descoberta. Não faltaram incentivos ao conhecimento, investigação e experimentação. Sempre incentivando a dúvida, a crítica e a idéia de processo. Fazíamos ciência juntos e também cada um construía seu conhecimento de forma separada. Sempre estiveram ao meu lado, mesmo quando o “experimento” parecia não estar tão bem desenhado. Ajudaram-me a redesenhá-lo quando era necessário e aplaudiram todas as minhas descobertas. Mainha e painho, amo vocês, muito obrigada. Quero agradecer também a meu companheiro de experimentação, meu querido irmão, Hermano, sem ele tudo teria sido muito menos divertido e proveitoso. Mano, obrigada pela parceria de sempre.

Infância: Na Universidade Estadual de Pernambuco (UPE) onde me graduei, comecei a amadurecer o meu jeito de fazer ciência. Ainda no primeiro ano de faculdade fui aluna de iniciação científica com a professora de bioquímica, Maria do Socorro Cavalcanti. Trabalhei com extração,

purificação e imobilização de lectinas. Aprendi muito mesmo. Foi meu primeiro contato com o laboratório. Muito obrigada Socorro. Durante a faculdade não faltaram professores que incentivaram meu aprendizado e crescimento – Dr. Fernando Salazar, Dr. Vicente Vaz, Dr. Rui Maciel, Dr. Ney e outros grandes mestres, muito obrigada.

Adolescência: As minhas residências de Clínica Médica (Hospital Barão de Lucena - HBL) e Endocrinologia (Hospital Brigadeiro) foram a etapa da “bancada”, de colocar em prática anos de estudo e de desenho do projeto. Para me auxiliar nos ensaios tive muito ajuda – Dr. Fernando Raposo, Dr. Alcides, Dr. Alfredo, Dr. Moacir, Dra. Lúcia, Dr. Marcos, Dr. Zaida, Dr. Vitorino – muito obrigada. Aos meus colegas de residência, Samuel, Marluce, Daniela, José Fernando, Emmanuella, Anne Elizabeth e Tomaz pela parceria. Já em São Paulo, na residência de Endocrinologia, tenho que agradecer em especial a Dr. Bernardo Liberman, que me ensinou que ciência se faz pelos detalhes e com muita organização. Agradeço também a Dra Kátia, Dr. Ronaldo, Dr. Jaime, Dr. Getúlio, Dr. Mauro, Dra Marta, Dr. Arthur e aos integrantes do centro de estudos. Agradeço aos meus colegas de residência, em especial a Juliana Cunha e a Paula Andréia. E sem dúvida tenho que fazer o maior agradecimento aos pacientes que contribuíram de forma direta para aprimorar e concretizar todas as minhas descobertas científicas.

Adulto: Chego ao LIM - 42. Revivo todas as etapas do processo científico de forma mais madura e aprendo a fazer ciência de forma séria. Primeiramente, agradeço a minha colega de pós-graduação, Ana Paula

Abreu, por ter me apresentado a Dra Elaine e ao LIM-42. Por ter me levado pela primeira vez a bancada do LIM – 42 e me ajudado a fazer o meu primeiro PCR.

Agradeço muito à minha orientadora, Dra. Elaine Maria Frade Costa, que sempre acreditou no meu potencial, confiou em minhas decisões e ensinou-me o melhor caminho quando eu estava numa encruzilhada. Obrigada pela sua paciência em aceitar meus erros, pelo carinho ao me corrigir e pelo excelente exemplo de pesquisadora, mãe e mulher.

Agradeço a todos os assistentes do ambulatório de Endocrinologia do Desenvolvimento, Dra. Ana Cláudia, Dra. Cândida, Dra. Tânia, que me ensinaram o sentido da pesquisa científica, acolher e atender o paciente, seja ele de qual classe social, credo ou raça, com dedicação, amor e humildade. Em especial ao, Dr. Alexander Jorge, que sempre estava disponível para minhas dúvidas de bancada e de bioinformática, ao Dr. Ivo, pelas maravilhosas e pertinentes sugestões em todas as minhas apresentações e submissões e a Dra Sorahia pelo auxílio na minha pesquisa e no ambulatório.

Às psicólogas Marlene Inácio e Elisa Verduguez, e à Dra. Maria Helena, cirurgiã amiga e também pós graduanda, que me fizeram ver a importância do atendimento global do paciente, em especial nossos pacientes com distúrbios do desenvolvimento sexual.

Minha imensa gratidão às biólogas funcionárias e pós-graduandas do LIM-42, Mariana, Cris Rossi, Cidinha, Helena, Beatriz, Tamaya, que são competentes no que fazem, e estão sempre prontas para tirar uma dúvida ou

para nos ensinar algo de novo. Em especial agradeço a Erika, por ter me ajudado a desenhar os oligonucleotídeos para amplificar o gene do *MAMLD1*, a Emília por ter sugerido o artigo sobre o *MAMLD1*, a Aline Zamboni e a Mariza por terem me ajudado nos ensaios de Mini e Maxiprep e a amiga Mirian, o anjo que sempre me ajudou nas culturas, dúvidas de bancada, extração de DNA plasmidial.....

Agradeço aos meus amigos pós graduandos: Rocio, Camila, Rosana, Carolina, Antônio, Frederico, Luciana Brito, Maria Estela, Milena, Madson, Priscila, Larissa, Letícia, Everlayny, Débora, Alexsandra, Aline Otto, Fernanda, Andrea, Marcela, Adriana e orientadores Luciani, por ter discutido inúmeras vezes comigo meu estudo funcional e a Regina por ter me emprestado os oligos para amplificação do gene da 5 α -redutase e ao Vinícius, sempre todos se ajudando uns aos outros, com um grande espírito de equipe e caminhando em uma só direção – que é o que faz o LIM-42 ser tão bem-sucedido. Obrigada às secretárias, Nilda, meu anjo da guarda, Cris e Ana, à Neide e à Fran, que estão sempre nos ajudando no que precisamos no laboratório.

Agradeço em especial a Dra. Berenice, que com sua experiência e sabedoria é capaz de comandar o laboratório, o ambulatório e a disciplina de Endocrinologia com pulso firme, porém sem perder a ternura, ela como ninguém consegue extrair o que há de melhor em nós e tornar possível o incerto. Sempre prezando pela excelência na pesquisa e principalmente no atendimento ao paciente, sem perder o lado humano e carinhoso que acolhe e que trata a todos, alunos e pacientes como filhos.

Agradeço também ao LIM- na pessoa do Prof. Dr. Krieger e da Maria de Lourdes Junqueira, que disponibilizaram equipamento para que eu pudesse concretizar o estudo funcional.

Agradecimento especial aos colaboradores estrangeiros, Dr. Tsutomo Ogata e Dra. Maki Fukami e toda equipe do laboratório de endocrinologia do *National Research Institute for Child Health and Development* Tóquio, Japão, que me acolheram como um membro do laboratório e me ajudaram a iniciar os estudos funcionais.

Agradeço a meu marido, meu companheiro há 16 anos. Desenhemos juntos nosso “projeto”, executamos a metodologia, erramos, mudamos de método, buscamos as melhores técnicas, por vezes festejamos os resultados e também choramos por eles. Defendemos juntos nossa “Tese”. E sempre, em qualquer circunstância ele me apoiou, foi meu guia quando necessário e se deixou guiar quando preciso. Foi conjunta a decisão de vir a São Paulo e de fazer o doutorado, que estamos concluindo como sempre juntos, Vamberto, muito obrigada, amo você.

No final do ano passado recebemos, eu e meu marido um presente, três filhas lindas, Clara, Júlia e Alice que já chegaram ensinando que ciência se faz com muita paciência e perseverança. Obrigada meus amores por todas as alegrias e lições diárias que recebo.

Agradeço a minha sogra e meu sogro, Josane e Vamberto, por sempre nos apoiarem e por todo carinho que recebo deles como filha-afim. A minha cunhada, Alessandra, por todo carinho e incentivo científico. Agradeço também a todos os meus familiares, avós, primos, tios, que

sempre tiveram orgulho de minha vida acadêmica e sempre me trataram com muito amor.

Obrigada aos meus amigos por me apoiarem e entenderem minhas ausências.

Agradeço a Deus por me dar tanto, saúde, amor, carinho, paz, paciência, por me guiar durante toda vida e sempre olhar por mim e por minha família. Espero que eu possa dar conforto aos que atendo e amor a todos para retribuir todas as bênçãos recebidas. Obrigada Senhor!

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. 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*

Sumário

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Anexos

Resumo

Summary

1	Introdução	1
1.1	Embriologia do desenvolvimento sexual	3
1.1.1	A determinação gonadal	3
1.1.2	A diferenciação sexual	5
1.2	Distúrbios do desenvolvimento sexual	7
1.2.1	Distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY	10
1.2.1.1	Distúrbios do desenvolvimento gonadal 46,XY	10
	- Agenesia testicular	10
	- Síndrome da regressão testicular embrionária	11
	- Disgenesia gonadal 46,XY - forma completa e parcial	11
1.2.1.2	Defeitos na síntese de testosterona	12
1.2.1.3	Defeitos na ação de testosterona	13
1.2.1.4	Defeito na metabolização da testosterona	14
1.2.1.5	Distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY indeterminado	15
1.3	Genes e organogênese testicular	15
1.4	Genes e diferenciação das genitálias interna e externa	17
1.4.1	Gene <i>Mastermind-like domain-containing 1 (MAMLD1)</i>	18
2	Objetivos	29
3	Material e métodos	31
3.1	Considerações éticas	32
3.2	Casuística	32
3.2.1	Crítérios para classificação dos pacientes com DDS 46,XY de causa indeterminada	33
3.2.2	Características clínicas e hormonais dos pacientes	34
3.2.3	Grupo controle	36
3.3	Avaliação hormonal	37
3.4	Avaliação molecular	38
3.4.1	Preparação das amostras	38
	- Extração do DNA genômico de leucócitos de sangue periférico	38
	- Protocolo para extração de DNA – <i>salting out</i>	38
3.4.2	Reação de polimerase em cadeia (PCR) e Sequenciamento direto	41
	- Gene <i>MAMLD1</i>	41
	- Protocolo de amplificação	41
	- Sequenciamento direto	43
	- Rastreamento da variante alélica por PCR e sequenciamento no grupo controle	43

3.4.3	Estudo de microsatélite para avaliar o efeito de gene fundador através de técnica de <i>Gene Scan</i>	44
3.4.4	Reação de polimerase em cadeia (PCR) e Sequenciamento direto do Gene da 5 α redutase tipo II	45
3.5	Avaliação Funcional <i>in vitro</i> da nova variante alélica do <i>MAMLD1</i>	46
3.5.1	Ensaio de luciferase	46
	- Plasmídios utilizados para avaliar funcionalmente a proteína do <i>MAMLD1</i>	48
	- Cultura celular	49
	- Ensaio de transativação das proteínas selvagem e mutante do <i>MAMLD1</i>	49
4	Resultados	51
4.1	Resultados moleculares	52
4.1.1	Análise da Sequência do <i>MAMLD1</i> nos pacientes com DDS 46,XY de causa indeterminada	52
4.2	Aspectos Clínicos dos pacientes portadores da nova variante alélica do <i>MAMLD1</i>	55
4.3	Aspectos hormonais dos pacientes portadores da nova variante alélica do <i>MAMLD1</i>	57
4.4	Análise de segregação da nova variante alélica nas famílias dos pacientes 2 e 4	59
4.5	Avaliação de efeito fundador	60
4.6	Análise do gene da 5 α redutase tipo II	60
4.7	Análise do gene <i>SF-1</i>	61
4.8	Análise Funcional <i>in vitro</i>	62
4.8.1.	Avaliação da função de transativação da nova variante protéica (p.H347Q) do <i>MAMLD1</i>	62
5	Discussão	64
5.1	Aspectos clínicos e laboratoriais dos pacientes portadores da nova variante alélica do <i>MAMLD1</i>	65
5.2	Análise da segregação da nova variante alélica do <i>MAMLD1</i>	67
5.3	Análise molecular	68
5.4	Análise dos estudos funcionais <i>in vitro</i>	69
6	Conclusões	72
7	Anexos	74
8	Referências	86

Listas

Lista de Abreviaturas

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
HAM	Hormônio Anti-Mulleriano
AR	<i>Androgen receptor gene</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
CAIS	<i>Complete androgen insensibility</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
PAIS	<i>Parcial androgen insensibility</i>
<i>DAX1</i>	<i>Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1</i>
<i>DBD</i>	<i>DNA binding domain</i>
DDG	Distúrbios do desenvolvimento gonadal
DDS	Distúrbios do desenvolvimento sexual
DG	Disgenesia gonadal
DHEA	Diidroepiandrosterona
DHH	<i>Desert hedgehog</i>
DHT	Dihidrotestosterona
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DP	Desvio padrão
Dpc	Dias pós coito
17OHP	17 hidroxiprogesterona
E2	Estradiol
EDTA	Ácido etileno diamonitetracético
<i>FGF9</i>	<i>Fibroblast growth factor 9</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
<i>GATA4</i>	<i>GATA binding protein 4</i>
HES	<i>Hairy and enhancer of split</i>
HESX1	<i>HESX homeobox 1</i>
hCG	Hormônio coriogonadotrófico
HMG-box	<i>High mobility group box</i>
IFME	Método imunofluorométrico
InsI3	Hormônio insulino símile 3
LH	Hormônio luteinizante
Luc	Luciferase
Mb	Megabase
MAMLD1	<i>Mastermind-like domain-containing 1</i>
<i>MAML2</i>	<i>Mastermind-like 2</i>
<i>MTM1</i>	<i>Myotubularin 1</i>

NT	Região não traduzida
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Men</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
p.	Proteína
P450scc	<i>P450 side chain cleavage</i>
Pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PG	Progesterona
<i>PROP1</i>	<i>Prophet of Pit1</i>
<i>RBP-J</i>	<i>Recombining binding protein suppressor of hairless</i>
RIE	Método radioimunoensaio
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNA _m	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
RT	<i>Reverse transcription</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase PCR</i>
SDHEA	Sulfato de Diidroepiandrosterona
SDS	dodecilsulfato de sódio
SHOX	<i>Short stature homeobox containing gene</i>
SiRNA	<i>Small interfering RNA</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus polymerase</i>
T/DHT	Relação testosterona/Diidrotestosterona
TE	Solução de Tris ácido clorídrico + EDTA

Lista de Símbolos

=	Igual
%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
≤	Maior ou igual a
≥	Menor ou igual a
μg	Microgramas
μg/mL	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
G	Unidade de medida da força centrífuga relativa (1g=aceleração de gravidade na superfície da Terra)
Kg	Quilograma
M	Molar
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
ng/dL	Nanograma por decilitro
Nm	Nanomol
°C	Graus Celsius
pg/mL	Picograma por mililitro
pmol	Picomol
RPM	Rotações por minuto
UI	Unidades Internacionais
UI/L	Unidades internacionais por litro

Lista de Figuras

Figura 1 -	Representação esquemática do gene <i>MAMLD1</i>	19
Figura 2 -	Análise da estrutura da proteína do <i>MAMLD1</i>	21
Figura 3 -	Representação esquemática da via canônica de sinalização intracelular <i>Notch</i>	23
Figura 4 -	Representação esquemática da via não-canônica de sinalização intracelular <i>Notch</i>	24
Figura 5 -	Hibridização <i>in situ</i> do gene homólogo ao <i>MAMLD1</i> no camundongo	25
Figura 6 -	Efeito dos siRNAs na produção de testosterona nas células de tumor de células de Leydig	27
Figura 7 -	Representação esquemática da diferenciação sexual masculina normal e a ação do gene <i>MAMLD1</i> sobre as células de Leydig e a produção de testosterona.....	28
Figura 8 -	Mapa físico da região Xq 28 onde se localiza o <i>MAMLD1</i>	44
Figura 9 -	Localização da variante alélica identificada no <i>MAMLD1</i> e os eletroferogramas da sequência do tipo selvagem e a substituição 1107 C → A em hemizigose.....	52
Figura 10 -	Alinhamento dos aminoácidos do gene <i>MAMLD1</i> do <i>Homo sapiens</i> (SP) (em lilás) com outras espécies (em preto) para avaliar grau de conservação do aminoácido histidina na posição 347	53
Figura 11 -	Localização esquemática e eletroferogramas dos polimorfismos encontrados no gene <i>MAMLD1</i>	54

Figura 12 - Eletroferogramas e <i>pedigrees</i> das famílias dos pacientes 2 e 4	59
Figura 13 - Função de transativação da proteína do MAMLD1 selvagem (MAMLD1 S) e mutante (MAMLD1 H347Q).....	63

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Classificação dos Distúrbios do Desenvolvimento Sexual (DDS)	8
Tabela 2 -	Protocolo de extração de DNA.....	39
Tabela 3 -	Protocolo de extração de DNA – adição de NaCl	40
Tabela 4 -	Oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região codificadora do gene MAMLD1	42
Tabela 5 -	Oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região codificadora do gene SRD5A2	45
Tabela 6 -	Características clínicas dos pacientes portadores da variante alélica p.H347Q no gene MAMLD1	56
Tabela 7 -	Características hormonais dos pacientes portadores da variante alélica p.H347Q no gene MAMLD1	58
Tabela 8 -	Haplótipos obtidos pelo Gene Scan	60
Tabela 9 -	Mutações e variantes alélicas encontradas no gene <i>SF-1</i> de pacientes com DDS 46,XY de origem indeterminada	61

Lista de Anexos

Anexo A -	Tabela com aspectos clínicos dos pacientes com DDS 46,XY indeterminado.....	75
Anexo B-	Tabela com protocolo das condições de PCR para amplificação do gene MAMLD1	84

Resumo

Brandão MP. *Análise do gene MAMLD1(CXorf6) em pacientes com distúrbios do desenvolvimento sexual 46, XY de origem indeterminada* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 97 p.

Introdução: O gene *MAMLD1* tem sido relacionado à etiologia da hipospádia penoescrotal por ser fundamental para produção adequada de testosterona durante o período crítico do desenvolvimento sexual masculino. Até o momento, 3 mutações *nonssense* com perda de função foram identificadas em pacientes japoneses com hipospadia. **Objetivo:** Pesquisar a presença de mutações no gene *MAMLD1*, em uma grande casuística de pacientes brasileiros portadores de DDS 46,XY de origem indeterminada e realizar estudo funcional de possíveis alterações encontradas. **Pacientes e Métodos:** Avaliamos 50 pacientes com DDS 46.XY de causa indeterminada nos quais havia se excluído, previamente, os defeitos de síntese da testosterona, deficiência da 5 alfa-redutase 2 e insensibilidade parcial a andrógenos, por critérios laboratoriais e sequenciamento gênico. Toda região codificadora do *MAMLD1* e os sítios de *splice* que flanqueiam essas regiões foram amplificados e sequenciados a partir do DNA genômico. Seis marcadores de microssatélites que flanqueiam o gene foram utilizados para analisar o efeito fundador da nova variante alélica identificada. A função de transativação do *MAMLD1* foi analisada através de ensaio de luciferase. Células COS-1 foram distribuídas em placas de 12 poços e transitoriamente transfectadas com o vetor repórter de luciferase (p-Hes1, p-Hes3 e p-Hes5), vetor de expressão para *MAMLD1* (selvagem e contendo a variante alélica) e o vetor PRL-CMV como um controle interno. **Resultados:** Identificamos uma variante alélica, a p.H347Q, no exon 3 em 4 pacientes brasileiros não relacionados (3 casos esporádicos e 1 caso familiar). Dois pacientes foram submetidos à gonadectomia na infância e foram criados no sexo social feminino. A ultrassonografia pélvica demonstrou a presença de útero em uma delas. Os outros dois pacientes do sexo masculino apresentavam micropênis, criptorquidia e hipospádia perineal. Esta variante alélica foi encontrada em apenas 1 de 250 controles brasileiros estudados –frequência 0,4%. A atividade de transativação da variante protéica do *MAMLD1* foi 2,0 vezes maior do que a proteína selvagem para ativar a transcrição do p-Hes3. Nenhum efeito fundador foi demonstrado nestas famílias. **Discussão:** A variante alélica está localizada em uma região altamente conservada do *MAMDL1* que é essencial para o desenvolvimento da genitália masculina. Os genes *Hes* constituem uma família genes de repressor transcricional de sinalização intracelular *Notch*. Os genes *Hes* exibem um padrão de expressão oscilatório e controlam o momento exato de diversos eventos biológicos. O padrão de expressão dos genes *Hes* nas gônadas não é bem estabelecido. Hirata e col. demonstraram que tanto a ausência quanto a persistência da expressão dos genes *Hes* resultam nos mesmos defeitos na somitogênese. Nossa hipótese é que a superexpressão do gene *Hes3* poderia prejudicar a diferenciação sexual masculina normal pela continua supressão de genes essenciais envolvidos posteriormente na cascata do desenvolvimento sexual masculino. **Conclusão:** Essa é a primeira descrição

de uma variante alélica do gene *MAMLD1* com ganho de função em pacientes com 46, XY DDS de causa indeterminada. O papel desta variante protéica do *MAMDL1* na etiologia DDS 46,XY deve ser melhor determinada através de estudos *in vivo*.

Descritores: 1.Distúrbios do desenvolvimento sexual 2.Diferenciação sexual 3.Mutação 4.Gene *MAMLD1* 5.Genética 6.DDS 46,XY de origem indeterminada.

Summary

Brandão MP. *Analysis of the MAMLD1 (CXorf6) gene in patients with undetermined 46,XY disorders of sexual development* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2011. 97p.

Introduction: *MAMLD1* has been shown to be implicated in the etiology of penoscrotal hypospadias. To date, 3 loss-of-function nonsense mutations have been identified in Japanese patients with hypospadias. **Objective:** To screen *MAMLD1* for mutations in a large cohort of Brazilian patients with undetermined 46,XY DSD. **Patients and Methods:** We evaluated 50 patients in which defects of testosterone synthesis, 5 α -reductase 2 deficiency and partial androgen insensitivity were previously excluded. The entire coding region and the flanking splicing sites of *MAMLD1* were amplified and sequenced from genomic DNA. Six microsatellite markers flanking the gene were used to analyze founder effect of new allelic variant. Transactivation function of *MAMLD1* was analyzed by a luciferase assays. COS-1 cells seeded in 12-well dishes were transiently transfected with luciferase reporter vector (p-Hes1, p-Hes3 and p-Hes5), expression vector for *MAMLD1* (WT and allelic variant) and pRL-CMV vector as an internal control. All experiments were performed in triplicates and repeated 3 times. **Results:** We identified an allelic variant, the p.H347Q on exon 3 in 4 unrelated patients (3 sporadic and 1 familial cases). Two patients underwent gonadectomy in infancy and were raised as girls. Pelvic ultrasound showed a uterus in one of them. The other two male patients had micropenis, cryptorchidism and perineal hypospadias. This allelic variant was found in 1 out of 250 Brazilian controls – frequency 0,4%. The transactivation activities of the variant protein were 2.0 folds higher than the WT with p-Hes3. No founder effect was demonstrated in these families. **Discussion:** The allelic variant is located in a highly conserved region of *MAMDL1* which is essential for male genitalia development. HES is a family of transcriptional repressors of *Notch* signaling. *Hes* gene expression pattern is tissue and cell specific and control the timing of biological events. In gonads, their expression pattern remained to be elucidated. In somitogenesis, Hirata showed that both loss of expression or persistent expression of *Hes* genes result in the same defects. Therefore, overexpression of *Hes* genes should impair the normal male differentiation by continuous suppression of downstream genes involved in male sex development. **Conclusion:** This is the first report of an allelic variant of *MAMLD1* determining a gain of function in its protein in patients with 46,XY DSD. The role of this variant protein of *MAMDL1* in the etiology of 46, XY DDS should be better determined by in vivo studies.

Descriptors: 1.Disorders of sexual development 2.Sexual differentiation 3.Mutation 4. *MAMLD1* gene 5.Genetics 6. Undetermined 46,XY DDS.

1 Introdução

O desenvolvimento sexual em mamíferos é um complexo processo que se inicia com o estabelecimento do sexo cromossômico (XX ou XY) por ocasião da fecundação e depende da interação e integridade de genes, fatores transcricionais, hormônios e receptores hormonais para que se complete normalmente.

O processo de desenvolvimento sexual é dividido didaticamente em duas etapas distintas, porém sequenciais e complementares. O evento inicial é a determinação do sexo gonadal que ocorre nas primeiras semanas de vida embrionária e se refere aos eventos que participam da transformação da crista urogenital embrionária em gônada bipotencial e posteriormente em testículo ou ovário. A etapa que se segue, denominada diferenciação sexual, compreende todos os eventos subsequentes a organogênese gonadal, a diferenciação da genitália interna e externa, que ocorre secundariamente à ação ou ausência de ação dos hormônios secretados pela gônada fetal masculina¹.

No feto humano masculino, a diferenciação gonadal inicia-se entre a 6ª e 7ª semanas de gestação e no feminino ocorre mais tardiamente entre a 10ª e 11ª semanas de gestação².

Os genes envolvidos nesses processos desempenham seus papéis em vários estágios do desenvolvimento sexual, alguns agem de forma combinada com outros genes e um pequeno número deles tem um papel crítico num momento específico e transitório.

1.1 Embriologia do desenvolvimento sexual

1.1.1 A determinação gonadal

A formação e o desenvolvimento das gônadas nos mamíferos são caracterizados pelo surgimento da gônada bipotente nos mesonefros, os quais fazem parte da crista urogenital (que irá contribuir com linhagens celulares para o córtex adrenal, gônadas e rins)³. Aproximadamente no 10º dia pós-coito (dpc), em camundongos, ocorre à proliferação do mesotélio (epitélio celômico) em uma área restrita da face médio-lateral dos mesonefros, dando origem a uma pequena gônada⁴. Ao mesmo tempo, células germinativas estão completando sua migração da base do alantóide ao longo do tubo digestivo, e através dos mesonefros chegam até o local onde a gônada está se formando. A partir daí, com todas as linhagens celulares constituintes da gônada presentes, inicia-se o processo de determinação, que irá definir se a gônada será um testículo ou um ovário.

O primeiro evento que estabelece o início do desenvolvimento testicular é o aparecimento das células precursoras das células de Sertoli, a partir da diferenciação das células somáticas do epitélio celômico da gônada indiferenciada. As células pré Sertoli proliferam e agregam-se ao redor das células germinativas primitivas, alinhando-se em estruturas semelhantes a cordões, que posteriormente darão origem aos túbulos seminíferos. As células germinativas dentro dos túbulos seminíferos entram em processo de

meiose, iniciando-se o desenvolvimento espermatogênico. Todo esse processo organizacional é regulado pelas células de Sertoli².

Cerca de uma semana após o aparecimento das células de Sertoli, as células esteroídicas de Leydig diferenciam-se a partir das células intersticiais primitivas originárias do mesonefro. Este processo também é regulado por influências parácrinas das células de Sertoli, provavelmente via hormônio anti-mülleriano (HAM)^{1, 5}.

Entre as células somáticas na gônada primitiva, as células de sustentação são as primeiras a se diferenciarem em células foliculares (da granulosa) nas gônadas XX ou em células de Sertoli nas gônadas XY⁶. O destino dos outros tipos celulares como as células esteroideogênicas (células da teca em XX e células de Leydig em XY) depende dessa diferenciação das células de sustentação.

A diferenciação das células germinativas também parece depender desse ambiente criado pelas células de sustentação específicas do ovário ou do testículo, e não do seu sexo genético³. As células germinativas demonstram seu destino quando entram em meiose entre 12,5 e 13,5 dpc na gônada XX ou quando param na mitose na gônada XY. A entrada na meiose parece depender da atividade do ácido retinóico. Nos testículos, o ácido retinóico é degradado pela enzima CYP26B1, expressa especificamente em machos³.

O desenvolvimento dos testículos e a diferenciação de suas células de sustentação não dependem das células germinativas⁷. Evidências morfológicas sugerem que a diferenciação inicial das células das gônadas

XX também não depende da presença das células germinativas⁸. No entanto, estas são necessárias para a formação e manutenção dos folículos ovarianos na vida pós-natal, e a perda das células germinativas no ovário resulta na degeneração da estrutura ovariana³.

O processo de determinação gonadal ocorre precocemente no embrião estando definido até a 11^a semana de gestação em humanos. A etapa que se segue é denominada diferenciação sexual.

1.1.2 A diferenciação sexual

Em ambos os sexos, os ductos genitais internos originam-se de estruturas pareadas que até a 7^a semana de gestação são indistinguíveis nos embriões XX e XY: os ductos Müllerianos (paramesonéfricos) e os ductos Wolffianos (mesonéfricos)⁹. A partir da 8^a semana de gestação os testículos produzem dois diferentes hormônios que são essenciais para o desenvolvimento da genitália interna masculina. O HAM, que é produzido pelas células de Sertoli, e causa a regressão dos ductos Müllerianos e a testosterona produzida células de Leydig, que induz a diferenciação dos ductos de Wolff em vesículas seminais, epidídimos e ductos deferentes. Na ausência desses dois hormônios, os ductos Müllerianos se desenvolvem originando as estruturas da genitália interna feminina (trompas, útero e terço superior da vagina) e os ductos de Wolff regridem.

A genitália externa também se desenvolve a partir de estruturas inicialmente comuns aos dois sexos. Na 4^a semana de gestação estas

estruturas em comum são representadas pelo tubérculo genital, duas pregas medianas, as pregas uretrais, que flanqueiam o seio urogenital e duas pregas maiores, as pregas lábioescrotais, que se dispõem mais lateralmente.

Na dependência da ação e produção de quantidades adequadas de dihidrotestosterona (DHT), que age sobre os tecidos precursores da genitália externa, ocorre a virilização desta e, conseqüentemente, o desenvolvimento da genitália externa masculina¹⁰. O tubérculo genital, as pregas urogenitais e as pregas lábio escrotais dão origem à glândula peniana, ao corpo do pênis e à bolsa escrotal, respectivamente. O seio urogenital dá origem à uretra peniana e à próstata. O processo de formação da genitália externa masculina se completa por volta da 12ª semana de gestação.

Já a genitália externa feminina se desenvolve na ausência da ação ou produção androgênica. O tubérculo genital alonga-se levemente formando o clitóris. O seio urogenital permanece aberto e um septo vesicovaginal é formado entre as porções genital e uretral do seio, separando a abertura da vagina posterior e a da uretra anteriormente. As pregas uretrais desenvolvem-se constituindo os lábios menores enquanto as pregas labioescrotais aumentam sem se fundirem dando origem aos grandes lábios. Estes eventos ocorrem entre a 7ª e a 12ª semana de gestação^{1, 2}.

1.2 Distúrbios do desenvolvimento sexual

Para que ocorra o desenvolvimento sexual de maneira adequada é preciso que uma complexa cascata de eventos moleculares, celulares e endócrinos seja executada de forma tempo e órgão específica. Assim uma falha em qualquer uma destas etapas pode prejudicar o desenvolvimento gonadal e sexual normal e determinar o surgimento de anomalias no desenvolvimento sexual.

Por conta da complexidade dessas doenças, várias classificações foram propostas. A classificação tradicionalmente usada era a de Klebs, baseada no sexo gonadal ¹¹. Os avanços na identificação das causas moleculares das anomalias do desenvolvimento sexual em concomitância com a sensibilização para as questões éticas e o potencial pejorativo dos termos anteriormente usados determinaram a necessidade de uma revisão dos conceitos e da nomenclatura utilizada na caracterização dos estados intersexuais.

Neste sentido, em 2006, um consenso foi publicado propondo uma nova nomenclatura que está sendo atualmente atribuída aos estados intersexuais¹².

Na presente tese utilizaremos a nova classificação reformulada por Mendonça e colaboradores¹³ (tabela 1).

Tabela 1 - Classificação dos Distúrbios do Desenvolvimento Sexual (DDS)**Distúrbios do desenvolvimento sexual associado a anormalidades do sexo cromossômico**

- 45,X - Disgenesia gonadal 45,X e suas variantes (síndrome de Turner)
- 45,X/46,XY - Disgenesia gonadal mista
- 47,XXY - Disgenesia dos túbulos seminíferos (síndrome de Klinefelter) e variáveis
- 46,XX/46,XY - DDS ovário-testicular

Distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY (DDS 46,XY)**Distúrbios do desenvolvimento gonadal**

- Agenesia testicular
- Regressão testicular embrionária
- Disgenesia gonadal 46,XY- Forma completa e parcial associada ou não a mutação/deleção do *SRY*
- Disgenesia gonadal 46,XY associada a quadros sindrômicos
 - Duplicação gênica: *Locus DSS* e *WnT4*;
 - Haploinsuficiência dos genes: *WT1*, *SOX9*, *DMRT*, *ATRX*, *DHH*, *SF1*
- DDS ovário-testicular 46,XY

Distúrbios da produção, ação ou metabolização dos hormônios testiculares**Defeitos na produção de testosterona**

- Defeito no receptor de LH (*LHCGR*) (Hipoplasia das células de Leydig)

Defeitos na síntese de testosterona

- Defeitos afetando a esteroidogênese adrenal e 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 e 17-20 liase (*CYP17*)
- Defeitos afetando a esteroidogênese testicular
 - Deficiência da 17-20 liase (*CYP17*)
 - Deficiência da 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase III (*17 β -HSD3*)
- Defeitos em proteínas doadoras de elétrons
 - Deficiência da P450 oxidoreductase (*POR*)
 - Defeito no citocromo b5 (*CYPB5*)

Defeito na ação da testosterona

- Defeito no receptor androgênico (*AR*) (síndrome de insensibilidade aos andrógenos)
 - Forma completa e parcial

Defeito na metabolização da testosterona

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

DDS 46,XY por defeito na síntese ou ação do hormônio inibidor dos ductos de Müller (*HAM* e *RHAM*) (Síndrome da persistência dos ductos müllerianos)**DDS 46,XY associado ao baixo peso ao nascer****DDS 46,XY decorrente da exposição materna a estrogênios e progestogênios****DDS 46,XY indeterminado**

continua

Tabela 1 - Classificação dos Distúrbios do Desenvolvimento Sexual (DDS) (conclusão)

Distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XX (DDS 46,XX)

Distúrbios do desenvolvimento gonadal

- *Disgenesia gonadal 46,XX*
 - Forma completa e parcial*
- *DDS ovário-testicular 46,XX*
- *DDS testicular* (associado à presença do *SRY* ou duplicação do *SOX9*)

Induzido por excesso de andrógenos

- *Origem Fetal*
 - Hiperplasia adrenal congênita virilizante
 - Deficiência da 21 hidroxilase (*CYP21A2*)
 - Deficiência da 11 β hidroxilase (*CYP11B1*)
 - Deficiência da 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo II (*HSD3B2*)
 - Resistência aos glicocorticóides (*GR*)
- *Origem Feto-placentária*
 - Deficiência da P450 oxidoredutase (*POR*)
 - Deficiência da aromatase (*CYP19*)
- *Origem Materna*
 - Andrógenos de origem materna
 - (luteoma, tumores virilizantes, exógeno)

DDS 46,XX indeterminado

Formas não classificadas

No sexo masculino

- Micropênis de origem indeterminada
- Hipospádia de origem indeterminada

No sexo feminino

- Ausência congênita da vagina – síndrome de Rokitansky-Küster-Hauser
(Inativação do *Wnt4*)

Em ambos os sexos

- Ambiguidade genital associada a malformações intestinais e urinárias
- Disforia de gênero

Devido à alta complexidade dos distúrbios do desenvolvimento sexual, faremos somente uma breve descrição dos diferentes tipos de DDS 46,XY que são o propósito de nosso estudo.

1.2.1 Distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY

O termo distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) 46,XY substitui o antigo termo pseudohermafroditismo masculino e se refere ao indivíduo portador de cariótipo 46,XY, gônadas masculinas e genitália interna e/ou externa ambígua. A apresentação fenotípica é de hipovirilização da genitália interna e/ou externa devido à deficiência na produção ou ação dos andrógenos, principalmente da testosterona e seu metabolito ativo, a dihidrotestosterona. As causas podem ser um defeito na formação gonadal (agenesia, regressão ou disgenesia testicular), na produção, ação ou metabolização da testosterona, ou ainda decorrente de exposição materna a progestágenos e estrogênios.

1.2.1.1 Distúrbios do desenvolvimento gonadal 46,XY

O DDS 46,XY por distúrbios do desenvolvimento gonadal inclui as doenças relacionadas à anormalidades da determinação testicular e aos genes que atuam nesta fase do desenvolvimento sexual masculino. Na literatura, esses distúrbios são classificados em:

Agenesia testicular

Caracteriza-se pela ausência total de tecido gonadal confirmada pela laparoscopia em indivíduos 46,XY com genitálias externa e interna feminina¹⁴.

Síndrome de regressão testicular embrionária

A regressão testicular embrionária faz parte de um espectro de anomalias genitais que resultam da interrupção da função testicular entre a oitava e a décima quarta semana de gestação também denominada síndrome dos testículos rudimentares ¹⁵. As gônadas não são evidenciadas ou são gônadas em fita ¹⁶ associadas a vários graus de diferenciação dos ductos genitais, seio urogenital e da genitália externa, sem persistência de ductos Müllermanos. Esses pacientes não apresentam virilização na puberdade e desenvolvem hipogonadismo hipergonadotrófico com proporções eunucóides.

Disgenesia gonadal 46,XY- forma completa e parcial

A *disgenesia gonadal completa* é definida pela ausência de testículos com presença de ambas as gônadas em fita, estruturas müllermanas bilaterais e um fenótipo feminino normal. Os pacientes se apresentam com infantilismo sexual e hábito eunucóide, porém com ausência de estigmas corpóreos.

A *disgenesia gonadal parcial* é caracterizada por diferenciação testicular parcial com presença de gônadas disgenéticas, um misto de derivados müllermanos e wolffianos e genitália externa ambígua.

Apesar desses distúrbios serem classificados separadamente eles parecem fazer parte de um espectro de gravidade de uma mesma doença que interfere na formação das gônadas. Assim, em nosso serviço, a

tendência atual é de unificar esses distúrbios em dois grandes grupos: disgenesia gonadal completa e parcial.

1.2.1.2 Defeitos na síntese de testosterona

Na esteroidogênese testicular, a síntese normal de testosterona pode ser bloqueada pela presença de defeitos nas enzimas que participam de cinco etapas deste processo. Quatro destes defeitos enzimáticos estão associados à hiperplasia adrenal congênita: Deficiência da StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*), da P450_{scc} (*CYP 11A*), da 3 beta hidroxisteróide desidrogenase tipo II e da 17 alfa-hidroxilase / 17,20 liase (*CYP 17*). Na hiperplasia adrenal a síntese de cortisol ou de cortisol e aldosterona estão bloqueadas por alterações na função das enzimas que participam da esteroidogênese adrenal. Nestes casos as manifestações clínicas são decorrentes da deficiência de cortisol, em alguns casos associada à deficiência de aldosterona, além do acúmulo dos hormônios precursores.

Dois defeitos da esteroidogênese testicular, não associados à deficiência da produção hormonal adrenal, foram descritos: Deficiência da 17,20 liase e deficiência da 17 beta-hidroxisteróide desidrogenase tipo III.

O diagnóstico dos pacientes portadores de defeitos de síntese de testosterona na idade pós-puberal é feito pela dosagem basal dos esteróides gonadais. Nesta idade, o nível de testosterona basal é baixo acompanhado

por valores aumentados dos precursores hormonais acima do bloqueio enzimático. Este padrão pode ser confirmado pelo teste de estímulo com hCG, que exacerba o acúmulo dos precursores frente a um discreto aumento dos valores de testosterona. Nos pacientes pré-púberes o teste de estímulo com hCG é fundamental para o diagnóstico.

Os pacientes portadores de DDS 46,XY por defeito na síntese da testosterona, apresentam variados graus de ambiguidade genital, associada ou não a ginecomastia.

1.2.1.3 Defeito na ação de testosterona

O DDS 46,XY devido à síndrome de insensibilidade androgênica se caracteriza por pacientes portadores de cariótipo 46,XY que apresentam testículos com desenvolvimento normal e com capacidade de secreção androgênica normal. No entanto, estes pacientes possuem ausência da virilização genital normal intra-útero, durante e após a puberdade consequente a um bloqueio da ação androgênica, devido a alterações no receptor androgênico.

A síndrome de insensibilidade androgênica é a forma mais comum de DDS 46,XY e é classificada em forma completa (CAIS), quando existe ausência total de ação androgênica e forma parcial (PAIS), quando ocorrem graus variáveis de bloqueio da ação hormonal. A forma completa representa um exemplo clássico de resistência total à ação hormonal. Os pacientes apresentam fenótipo feminino, desenvolvimento normal de mamas, pelos

axilares e pubianos esparsos ou ausentes, genitália externa feminina com vagina em fundo cego, ductos de Wolff ausentes ou hipodesenvolvidos e gônadas intra-abdominais ou inguinais. Já na forma parcial, a apresentação clínica é bastante heterogênea com o paciente apresentando vários graus de ambiguidade genital. Os testículos estão presentes no canal inguinal ou nas pregas lábio-escrotais, menos frequentemente são intra-abdominais. O desenvolvimento de mamas ocorre na puberdade. Formas leves desta síndrome, com a presença de genitália masculina e micropênis ou apenas infertilidade e/ou ginecomastia, também foram descritas^{17, 18, 19}.

1.2.1.4 Defeito na metabolização da testosterona

Esta forma rara de DDS 46,XY descrita em 1974 por Imperato-McGinley²⁰ é causada por uma deficiência na enzima que determina a conversão de testosterona em seu metabólito ativo, o DHT²¹. Duas enzimas 5 α -redutase catalisam esta reação, a tipo I e a tipo II. A doença, de caráter autossômico recessivo, é secundária a alterações no gene que codifica a enzima 5 α -redutase 2 (*SRD5A2*).

Os pacientes apresentam genitália externa ambígua e micropênis. A genitália interna masculina é normal, porém a próstata é hipoplásica. Os testículos estão geralmente localizados na região inguinal. Durante a puberdade, ocorre virilização da genitália externa em graus variáveis. A ausência de desenvolvimento de ginecomastia é característica do quadro clínico.

1.2.1.5 Distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY indeterminado

Como vimos anteriormente, em alguns casos, a etiologia dos DDS 46,XY pode ser explicada, por mutações identificadas nos genes que atuam especificamente no desenvolvimento testicular ou na síntese, ação ou metabolização da testosterona.

Entretanto, a observação da presença de genitália ambígua em crianças do sexo masculino sem alterações hormonais ou cromossômicas e para as quais não se estabelece a causa da anormalidade genital é uma ocorrência relativamente frequente na prática clínica (50%)¹², indicando que outros genes, ainda não identificados, estão envolvidos no desenvolvimento sexual masculino em humanos.

1.3 Genes e organogênese testicular

A identificação do gene *SRY* no braço curto do cromossomo Y, no início da década de 90, permitiu o esclarecimento de uma importante etapa no processo de determinação da gônada embrionária masculina²². Esse gene age como um indutor na determinação sexual masculina, iniciando uma cascata de interações gênicas que leva à formação dos testículos a partir da gônada fetal indiferenciada. Apesar do *SRY* ser o principal gene da determinação sexual masculina, algumas lacunas persistem em como ele controla estes eventos cruciais do desenvolvimento²³.

A análise do padrão temporal e topográfico da expressão dos genes *WT1* e *SF1* sugere um papel importante desses genes na preparação da gônada para a determinação sexual^{24, 25}. O *WT1* parece estar envolvido na expressão do *SRY* na gônada e na descida testicular²⁶ e age a montante dos genes *SF1* e *DAX1*²⁷. A expressão do *SF1* precede a expressão do *SRY* e age também aumentando a expressão do *HAM* (gene que codifica o hormônio anti-mülleriano), que é o primeiro marcador da diferenciação testicular. O *SRY*, por sua vez, atua ativando o gene *SOX9* que codifica um fator de transcrição que participa da transformação da gônada bipotencial em testículo e regula a expressão do *HAM*. Posteriormente, na diferenciação sexual, o gene *SF1* regula a produção de esteróides pela célula de Leydig, cujo desenvolvimento adequado depende do estabelecimento prévio da linhagem de células de Sertoli^{28, 29}. O gene *FGF9* é importante para a proliferação testicular e migração de células germinativas.

Atualmente sabe-se que a diferenciação das células de Leydig fetais depende da secreção parácrina da proteína extracelular *Desert Hedgehog*, que é secretada pelas células de Sertoli³⁰. Mutações no *DHH*, gene que codifica esta proteína, foram encontradas em pacientes com disgenesia gonadal XY^{31, 32}. Foi demonstrado em ratos que a diferenciação dos miócitos peritubulares e consequente formação do cordão testicular também é regulada pelo *DHH*³³.

Outros genes também fazem parte da cascata de desenvolvimento testicular, e há uma grande interação dos fatores de transcrição envolvidos nesta via.

1.4 Genes e diferenciação das genitálias interna e externa

Diversos genes estão envolvidos na diferenciação da genitália interna masculina. Para que ocorra a diferenciação dos ductos de Wolff é necessária uma produção normal de testosterona pelos testículos fetais e uma ligação adequada desse hormônio ao receptor androgênico. Neste processo estão envolvidos os genes que participam desde a síntese da testosterona (*StAR*, *CPY11A*, *3 β HSD* tipo II, *CPY17*, *17 β HSD* tipo III, *P450-OR*) até a sua ação nos tecidos periféricos (gene *AR*).

No período compreendido entre a 8^a e 10^a semanas ocorre a regressão dos ductos de Müller² através da ação local do HAM secretado pelas células de Sertoli. O gene *HAM* codifica a produção desse hormônio e sua transcrição parece ser regulada, na vida intra-uterina, por outros fatores implicados na diferenciação sexual incluindo o *SF1*, *SOX9*, *GATA4* e *WT1*³⁴.

No homem, a testosterona secretada pelos testículos é transformada periféricamente em DHT através da enzima 5 α -redutase 2. O gene *SRD5A2* é o responsável pela codificação dessa enzima, fundamental para que ocorra a conversão de quantidades apropriada de testosterona em DTH e, conseqüentemente, a adequada diferenciação dos genitais externos masculinos.

Quaisquer alterações nos genes que codificam a complexa cascata de enzimas envolvidas na síntese da testosterona ou da DHT, bem como nos genes dos receptores hormonais determinam uma incompleta virilização dos genitais externos masculinos².

1.4.1 Gene *Mastermind-like Domain-containing 1 (MAMLD1)*

Durante estudos moleculares em pacientes que apresentavam ambiguidade genital associada à miopatia miotubular, Laporte e col. identificaram um novo gene, o *MAMLD1*, o qual se localiza na região Xq28 proximal³⁵, contíguo ao *MTM1* (o gene responsável pela miopatia miotubular ligada ao X), distando deste, cerca de 80 Kb. Estudos posteriores confirmaram a existência dessa nova síndrome de genes contíguos e apoiaram a hipótese de que a deleção do gene *MAMLD1* pode ser causa de ambiguidade genital ou hipospádia grave^{36 - 38}.

O gene *MAMLD1* foi primeiramente clonado e caracterizado em 1996 e é composto por 7 exons (figura 1). Na descrição original, a região codificadora era composta pelos exons 3-6 e a proteína codificada tinha 701 aminoácidos. Recentemente, a região codificadora do gene sofreu um aumento passando a ser composta pelos exons 1-6 e consequentemente a proteína por ele transcrita também aumentou de tamanho passando a ter 774 aminoácidos (*ensembl* ENSG0000013619/ENST00000262858). A clonagem do cDNA mostrou uma forma com clivagem alternativa que exclui completamente o exon 4. Ambas as isoformas tem função protéica idêntica.

O gene foi primeiramente denominado de *CXorf6* por apresentar duas regiões putativas sobrepostas de *open reading frames* (ORF), que são regiões usadas para identificar sequências de aminoácidos que podem fazer parte de um gene, já que contem códons de iniciação e de parada. O primeiro ORF começava no exon 3 com códon de parada no exon 6 e

codificava 701 aminoácidos. A primeira metionina do segundo ORF localizava-se no exon 5 e códon de parada no exon 7. O primeiro ORF contem um domínio rico em prolina e dois trechos que codificam tratos de poliglutamina³⁵. Além disso, mais recentemente, um domínio rico em serinas foi identificado no *MAMLD1*, além dos domínios ricos em glutamina e prolina³⁹.

Figura 1 - Representação esquemática do gene *MAMLD1* e as respectivas proteínas traduzida por ele com e sem o exon 4

Em 2005, Tsai e col. identificaram no *MAMLD1*, uma região de 90 Kb que vai do exon 1 ao 4 como sendo a mais importante para a função da proteína codificada. Essa região foi definida a partir da comparação entre as deleções encontradas em pacientes portadores de miopatiamiotubular com e sem ambiguidade genital. Dentro desta região, o exon 3 do *MAMLD1* é o maior exon do gene e codifica 81% dos aminoácidos de toda a proteína⁴⁰. Além de ser altamente conservado em humanos, cavalos e camundongos, enquanto os outros exons não mostraram homologia significativa com outras espécies⁴⁰. Desta forma, a presença do exon 3 do *MAMLD1* parece ser essencial para o desenvolvimento normal da genitália masculina³⁸.

O gene *MAMLD1* contém a sequência consenso de ligação ao DNA para o *SRY* (AACAAATG)⁴¹, localizada no exon 1 não traduzido, implicando que este possa ser um dos alvos do *SRY*³⁸. Outro gene importante no desenvolvimento testicular, o *SF1*, é co-expresso, na vida fetal, com o gene homólogo no camundongo ao *MAMLD1* em células de Sertoli e Leydig. Além disso, a proteína do *SF1* se liga a uma sequência específica (CCAAGGTCA) presente nos introns 1 e 2 a montante da região codificadora do *MAMLD1* e exerce atividade de transativação sobre este. Esses achados sugerem que o *MAMLD1* é regulado pelo *SF1*⁴².

Em 2008, Fukami e col. identificaram que a proteína codificada pelo *MAMLD1* tem alto grau de homologia com a proteína mastermind-like 2 (*MAML2*) pela identificação dos *motifs* MAML bem conservados entre *MAMLD1* de sapos, pássaros e mamíferos (figura. 2). Desta forma, as duas moléculas parecem ser derivadas de ancestrais comuns e por conta desta semelhança é que foi proposta a troca de nomenclatura do gene, que passou a ser chamado de *mastermind-like domain-containing 1* (*MAMLD1*).

Figura 2 - Análise da estrutura da proteína do MAMLD1. A: Estrutura da proteína do MAMLD1 e proteínas MAML2 humanas. Os domínios identificados são representados em verde, amarelo e azul claro para Serina, Prolina e Glutamina, respectivamente. B: Quadro de sequência de aminoácidos dos *motifs* da mastermind-like e árvore filogenética. Os aminoácidos conservados estão sombreados. Hs: Homo sapiens (homem); Pt: Pan troglodytes (Chimpanzé), Ec: Equus caballus (cavalo), Cf: Canis familiaris (cão); Mm: Mus musculus (rato); laevis Gg: Gallus gallus (galinha), XI: Xenopus (sapo com garras). Na árvore filogenética, a distância horizontal indica o grau de divergência das sequências de aminoácidos entre as espécies, e a escala representa o número de troca de aminoácidos (na escala 10 representa 100 aminoácidos)³⁹.

Entretanto, apesar da semelhança estrutural entre suas proteínas, esses dois genes têm papéis diferentes na via de sinalização intracelular *Notch*. A via *Notch* é fundamental para o processo de diferenciação de várias linhagens celulares, podendo exercer efeito repressor ou estimulatório de acordo com o contexto celular. O *MAML2* é um co-ativador transcricional da via canônica de sinalização intracelular *Notch*, que não se liga ao DNA. Já o *MAMLD1*, participa da via não-canônica *Notch*.

A passagem de sinal na via Notch ocorre através de interação célula a célula. Após se acoplar ao ligante, o receptor de membrana *Notch* sofre clivagem do seu domínio intracelular. Este migra para o núcleo e se liga a proteína MAML2 e ao fator de transcrição RBP-J, o qual é capaz de acoplar este complexo trimérico ao DNA. Essa ação promove a ativação da transcrição de genes alvos da via canônica de sinalização *Notch*, preferencialmente, os membros *Hairy/enhancer of split 1 e 5 (Hes1 e Hes5)* da família Hes de genes repressores (figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática da via canônica de sinalização intracelular *Notch*

Já a análise funcional da proteína codificada pelo *MAMLD1*, feita através de ensaio de luciferase, demonstrou que esta foi capaz de aumentar a atividade do promotor do gene *Hes3*, também membro da família Hes, alvo da via não-canônica de sinalização intracelular *Notch*⁴² (figura. 4).

Figura 4 - Representação esquemática da via não-canônica de sinalização intracelular Notch

A análise de expressão do gene foi feita pela técnica de *hibridização in situ* do gene homólogo (G630014p10Rik) em testículos de camundongo por esses mesmos autores. A expressão foi avaliada na gônada fetal e pós-natal. Na fase pré-natal, em testículos, o gene homólogo se expressava claramente nas células de Sertoli e num pequeno número de células de Leydig no dia embrionário 12.5, com posterior aumento da expressão nas

últimas, no dia embrionário 14.5. Já nos ovários a expressão ocorreu em pequeno número de células somáticas nos limites do mesonefro. (figura 5a)

Figura 5 - Hibridização *in situ* do gene homólogo ao *MAMLD1* no camundongo. (a) padrões de expressão nas gônadas fetais. Os sinais em azul são derivados de hibridização *in situ*, utilizando uma sonda marcada com dióxigenin para o gene homólogo no camundongo, e os sinais em castanho de imuno-histoquímica para SF1, que serve como um marcador de células de Sertoli e de Leydig. As setas indicam os limites entre o ovário e o mesonefron, e uma flecha indica o ductos Mülleriano. m: mesonephros; G: células germinativas; S: células de Sertoli, e L: células de Leydig. As barras de escala na baixa e os campos de maior aumento representam 200 mm e 20 mm, respectivamente. (b) padrões de expressão nas gônadas pós-natal. O: oócito; T: camada tecal; B: membrana basal. Os círculos pontilhados indicam alguns dos cordões testiculares e um folículo em desenvolvimento. barras de escala: 100 mm ⁴³.

Já na fase pós-natal, no testículo, o gene homólogo ainda se expressa, de forma fraca, nos cordões sexuais até a primeira semana de vida e diminui posteriormente. Nos ovários, parece ocorrer o inverso, a expressão é fracamente detectada até a segunda semana de vida e se torna claramente identificada nas células da granulosa nas regiões perifoliculares da maioria dos folículos de Graff a partir da terceira a oitava semanas de vida (figura. 5b). Em humanos, o gene *MAMLD1* é amplamente expresso nos tecidos gonadais fetais, testículo e ovário, e extra-gonadais, como a porção posterior do cérebro, somitos, tubo neural e pâncreas⁴³.

O gene *MAMLD1* parece ser fundamental para produção de níveis adequados de testosterona pelas células de Leydig. Ensaio utilizando RNA de interferência (siRNA) para promover o *knockdown* do gene homólogo ao *MAMLD1* no camundongo, demonstraram que, após 48h de incubação com dois siRNAs, os níveis de RNAm de *MAMLD1* estavam severamente reduzidos e que os níveis de testosterona tinham diminuído drasticamente (20-40%). Este resultado persistiu mesmo após estímulo por 1 hora com hCG³⁹ (figura 6).

Figura 6 - Efeito dos siRNA na produção de testosterona nas células de tumor de células de Leydig (MLT). A) Níveis de RNAm do gene homólogo ao *MAMLD1* no camundongo após 48hs de incubação com dois siRNAs. B) Níveis de testosterona no meio após 48hs de incubação com os siRNAs. C) Níveis de testosterona no meio após uma hora de incubação com hCG, usando a cultura de células MLT incubada por 48hs com os siRNAs. N.C. controle negativo transfetado com RNA sem capacidade de interferência³⁹.

Até 2007, data do início deste estudo, três mutações nonsense que levavam a perda de função do *MAMLD1* (E124X, Q197X e R653X) haviam sido identificadas em quatro indivíduos japoneses com hipospádia penoescrotal, micropênis, escroto bífido e níveis de testosterona normais⁴³. Em 2008, Kalfa e col. descreveram três novas variantes alélicas (V432A, 325delG, p.531ins3Q) em quatro pacientes não relacionados com vários graus de hipospadia, mas nenhum estudo funcional foi realizado⁴⁴. Mais recentemente, em 2010, Chen e col. identificaram 3 novas variantes

(p.Q529K, p.D686D e 2065+8 a > t) em 3 diferentes pacientes não relacionados com hipospádia, que não foram encontradas em 95 controles normais⁴⁵. Estudos funcionais não foram realizados.

Esses achados sugerem que o fenótipo genital dos pacientes com mutação no *MAMLD1* é primariamente relacionado à disfunção transitória das células de Leydig comprometendo a produção de testosterona apenas durante o período crítico do desenvolvimento sexual. Assim, o *MAMLD1* parece ser um gene implicado na fase precoce de diferenciação sexual masculina e, portanto, importante no desenvolvimento das genitálias interna e externa (figura 7). Este fato justifica o estudo deste gene em nossos pacientes com DDS 46,XY sem causa estabelecida.

Figura 7 - Representação esquemática da diferenciação sexual masculina normal e a ação do gene *MAMLD1* sobre as células de Leydig e a produção de testosterona

2 Objetivos

- 1) Pesquisar mutações no gene *MAMLD1* em pacientes portadores de distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY de causa indeterminada acompanhados no Ambulatório de Distúrbios do Desenvolvimento Sexual da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo .
 - 2) Realizar o estudo funcional das mutações eventualmente identificadas.
-

3 Material e Métodos

3.1 Considerações Éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos, seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki. O consentimento pós-informação foi obtido por escrito de todos os pacientes, pais ou tutores antes que os procedimentos de pesquisas fossem iniciados. O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de projetos de Pesquisa - CAPPesq do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC- FMUSP).

Aconselhamento genético foi oferecido para os pacientes e seus familiares, nos quais foram encontradas variantes alélicas do *MAMLD1*. Aconselhamento foi realizado no ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do HCFMUSP.

3.2 Casuística

Todos os 50 pacientes incluídos no estudo estavam em seguimento no Ambulatório de Distúrbios do Desenvolvimento Sexual da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no período de 1975 a 2010. Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico geral, sendo detalhada a avaliação da genitália externa. Foram investigados os

antecedentes familiares em busca de relatos de consanguinidade, assim como de outros indivíduos afetados na família. Os pacientes e familiares foram avaliados pelas psicólogas Marlene Inácio e Elisa Verduquez para investigação da identidade sexual; os pacientes tiveram a definição de sua identidade sexual antes do tratamento cirúrgico e posteriormente seguimento da adequação do sexo social.

Os pacientes submeteram-se a tratamento cirúrgico para correção da genitália externa e interna, com adequação ao sexo social. As cirurgias foram realizadas pelas equipes do Dr. Frederico A. Q. Silva e Dr. Francisco Tibor Denes, da Unidade de Urologia Pediátrica, do serviço de Urologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

3.2.1 Critérios para classificação dos pacientes como DDS 46,XY de causa indeterminada

Os pacientes foram classificados como DDS 46,XY quando apresentavam cariótipo 46,XY, gônadas masculinas e ambiguidade genital definida como graus variados de hipovirilização da genitália externa e/ou interna e clinicamente se apresentavam com: hipospádia, micropênis, criptorquidia bilateral, bifidez escrotal (presente ou não) ou persistência de seio urogenital.

Foram considerados pacientes com causa indeterminada aqueles em que foram afastados os defeitos na síntese da testosterona e a deficiência da 5 alfa-redutase, através da dosagem de andrógenos adrenais, seus precursores e da dosagem de DHT e a insensibilidade aos andrógenos

forma parcial foi excluída através do sequenciamento de toda região codificadora do receptor androgênico. Nos pacientes que foram gonadectomizados anteriormente à avaliação hormonal em nosso ambulatório e apresentavam alguma alteração no *MAMLD1*, foi realizado o sequenciamento do gene que codifica a enzima 5 α -redutase tipo II. Além disso, foram excluídas mutações nos genes *SRY* e *SF-1* que são fundamentais para o desenvolvimento sexual masculino, através do sequenciamento dos mesmos. O sequenciamento dos genes *SRY* e do *SF-1* foram realizados no Laboratório de Hormônio e Genética Molecular, LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia pela bióloga Mirian Yumie Nishi e pela pós-graduanda Aline Zambone, respectivamente. O estudo citogenético foi realizado a partir de cultura de linfócitos de sangue periférico e análise de 50 células através de técnica de coloração convencional e bandamento G⁴⁶, realizado no Laboratório de Hormônio e Genética Molecular, LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia pelas biólogas Maria Aparecida Medeiros e Mirian Yumie Nishi. Não foi identificada nenhuma anomalia cromossômica nos 50 pacientes estudados.

3.2.2 Características clínicas e hormonais dos pacientes

Os dados clínicos, laboratoriais e radiológicos (obtidos por ultrassom ou uretrocistografia retrógrada) estão resumidos, respectivamente na tabela 1 e 2 do anexo A.

O estudo incluiu 50 pacientes com DDS 46,XY de causa não estabelecida com idades entre 1 mês e 54 anos, trinta e três dos quais foram criados no sexo social masculino e dezessete no sexo feminino. A maior parte dos pacientes procurou o serviço nas primeiras duas décadas de vida. Vinte e cinco pacientes procuraram a avaliação médica na 1ª década (em média aos 3 anos de idade) e 11 na 2ª década (em média aos 13 anos e meio). Os demais se distribuíram aleatoriamente nas outras faixas etárias. Na primeira avaliação clínica e laboratorial 29 pacientes estavam em idade pré-puberal e 17 em idade puberal. Em quatro pacientes os dados clínicos não estavam disponíveis. Dos 50 casos avaliados, 05 eram familiares (casos 6, 17, 40, 44, 48) e 04 tinham histórico de consanguinidade (casos 17, 29, 32 e 44). Nove pacientes foram orquiectomizados antes da primeira avaliação. Entre os indivíduos registrados no sexo masculino, a hipospádia foi o sinal clínico mais comum (27 casos), sendo que 02 casos já haviam se submetido à neourethroplastia e apresentavam uretra tópica na primeira avaliação. Vinte e dois pacientes apresentavam criptorquidia, sendo que a maioria era bilateral. Micropênis estava presente em 17 casos, porém em outros 6 casos o tamanho peniano não foi avaliado. Os casos 6, 14, 34 e 41 apresentaram ginecomastia espontânea na puberdade, no entanto o caso 14 tinha história de mastectomia bilateral prévia. Apenas no caso 3 foi observada, ao ultrassom, a persistência de derivados Müllarianos, representada pela presença de útero de 2 cm³, que após estímulo com reposição de estradiol respondeu com aumento de volume (4 cm³).

Os níveis de testosterona basal variaram de 10 a 704 ng/dl e pós estímulo com hCG de 92 a 1207 ng/dl. Vinte e oito pacientes tinham resposta normal (testosterona pós-hCG > 130 ng/dl), três tinham resposta subnormal (< 130ng/dl) e três não tinham resposta de Testosterona (< 30 ng/dl)⁴⁷. Sete pacientes não dispunham dos níveis de testosterona em prontuário e nove haviam sido submetidos previamente a gonadectomia. Nenhum dos pacientes avaliados apresentava acúmulo de precursores de testosterona ou adrenais (dados não mostrados). A relação testosterona/dihidrotestosterona (T/DHT) foi normal em todos os pacientes ($8,3 \pm 5,75$). Nos indivíduos pré-puberes, após estímulo crônico com hCG (4 doses de 50-100U/Kg em intervalos de 4 dias), foram considerados como valores normais da T/DHT 14 ± 5 . Em pós-puberes, a T/DHT basal normal foi de 14 ± 5 e após estímulo agudo com hCG (6000U dose única) de $21 \pm 9,7$ ²¹. As dosagens hormonais de Testosterona e DHT pré e pós-estímulo estão apresentados na tabela 2 do anexo A.

3.2.3 Grupo Controle

Os indivíduos do grupo controle foram obtidos a partir de um banco de DNA de funcionários do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular do LIM-42, professores, alunos e ex-alunos da residência de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da USP. Todos doaram seu DNA voluntariamente e autorizaram o uso do mesmo para estudo de controles normais. Clinicamente, todos são adultos, apresentaram puberdade espontânea e no tempo normal. Nenhum indivíduo foi submetido a cirurgia corretora de

genitália. Todas as mulheres apresentaram menarca na faixa etária considerada normal.

3.3 Avaliação hormonal

A avaliação constituiu-se de dosagens basais de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), testosterona (T), estradiol (E₂), progesterona (PG), androstenediona, dehidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), 17 hidroxiprogesterona (17OHP) e DHT em pacientes púberes. Nos pacientes pré-púberes, as dosagens hormonais foram realizadas pré e pós teste de estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG). Utilizamos 50 a 100 UI/Kg de peso em 4 doses e as dosagens hormonais foram realizadas pré e 72 horas após a última injeção intramuscular de hCG conforme teste padronizado no nosso serviço⁴⁷. No período de estudo foram utilizados dois métodos de dosagem para as gonadotrofinas séricas, estradiol e testosterona, a saber, radioimunoensaio com duplo anticorpo (*Wallac, Turku, Finlândia*) para LH, FSH, E₂ e ensaio imunofluorométrico em “kits” AutoDelfia (*Delfia, Wallac, Turku, Finland*) para LH, FSH, E₂ e T.

Os resultados dos pacientes foram comparados aos valores de indivíduos normais estudados no mesmo laboratório.

3.4 Avaliação Molecular

3.4.1 Preparação das amostras

Extração do DNA genômico de leucócitos periféricos

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos pacientes, de seus familiares, quando disponíveis, e de controles normais masculinos e femininos. Quinze mL de sangue venoso foi colhido em ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM). O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando-se 2 volumes de sangue de solução de lise (NH_4Cl 114 mM, NH_4HCO_3 1 mM) com incubação a 4°C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 3000 rpm (Sorvall, RT7, Germany), sendo desprezado o sobrenadante. O procedimento de lise de glóbulos vermelhos foi repetido por mais uma vez. A extração do DNA foi realizada pela técnica Cristina Rossi.

Protocolo para extração de DNA – Procedimento com sal (*salting out*)

Esse procedimento segue o protocolo de Millers AS, Dykes DD e Plesky NF com algumas pequenas modificações⁴⁸.

Após a lise das hemácias, o pellet congelado de células brancas foi suspenso em 9 ml de solução de lise de glóbulos brancos (TEN) (NaCl

150mM, Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) com 180 µL de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, St Louis, MO, USA) e 150 µL de proteinase K (10 mg/ml) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), sendo o material homogenizado com pipeta Pasteur descartável incubado a 37°C por 18 horas, conforme tabela 2.

Tabela 2 - Protocolo de extração de DNA

Sangue periférico colhido no gelo	Tubo falcon	Tampão de lise de hemácia	TEN	SDS 10%	Proteinase K	NaCl saturado
3 tubos	50ml	Até 45 ml	9 ml	180 µl	150 µl	3,6 ml
2 tubos	50ml	Até 45 ml	6 ml	120 µl	80 µl	2,4 ml
1 tubo	15ml	Até 13 ml	3ml	60 µl	40 µl	1,2 ml
½ tubo	15ml	Até 13 ml	1,5 ml	30 µl	20 µl	0,6 ml

A obtenção de soluções claras e viscosas indica uma completa digestão com a proteinase.

Após este período, 3,6 mL de solução saturada de cloreto de sódio (6M) foi adicionada agitando-se o conjunto vigorosamente durante 15 segundos. O material foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm (5000xg) em temperatura ambiente. Acrescentar NaCl de acordo como a tabela 3.

Tabela 3 - Protocolo de extração de DNA - adição de NaCl

Sangue periférico colhido no gelo	NaCl saturado
3 tubos	3,6 ml
2 tubos	2,4 ml
1 tubo	1,2 ml
½ tubo	0,6 ml

Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo Falcon e o DNA foi precipitado acrescentando-se 2 volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se cuidadosamente por inversão. Para tirar o NaCl, o DNA precipitado foi retirado do tubo com uma espátula de plástico, ou bastão de vidro ou anzol de vidro e em seguida lavado em etanol a 70% durante 5 minutos repetindo-se a operação por mais 4 vezes. Por último, o DNA foi lavado em etanol absoluto, sendo seco por centrifugação à vácuo (Eppendorf, Concentrator 5301, Germany). Após tal procedimento, o DNA foi ressuspendido em tampão TE10:0,1 (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 0,1, pH 8,0)⁴⁸.

A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em um espectrofotômetro (Pharmacia LKB, ultrospec III, England) no comprimento de onda de 260 nm (1,0 unidade DO 260 = 50 µg/mL). Foi estabelecido que a relação acima de 1,75 entre as leituras em 260 e 280 nm seria a ideal para a caracterização da pureza do material⁴⁹. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 1% em TAE (Tris 0,004M; ácido acético glacial; EDTA 0,001M, pH 8,0) contendo brometo de etídio (Sigma, st. Louis, MO, USA) na concentração de

0,5 µg/mL de gel e observadas em um transiluminador com luz ultravioleta a fim de verificar sua integridade.

3.4.2 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) e Sequenciamento Direto

Gene *MAMLD1*

O DNA genômico foi amplificado através da reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando-se oligonucleotídeos intrônicos (*primers*) específicos para o gene *MAMLD1*.

O gene *MAMLD1* (número de acesso no *GenBank* NM_005491/*ensembl* ENSG0000013619/ENST00000262858) está localizado no cromossomo Xq28, possui 7 exons, com 4.608 pares de base. Os exons 1, 2, 3, 4, 5, e 6 codificam uma proteína de 774 aminoácidos conforme *website Ensembl Genome Browser* 59 (www.ensembl.org).

Foram utilizados em cada reação de PCR: 100 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 0,5 mM (20 pmol) de cada oligonucleotídeo, além do tampão e 2,5 UI de enzima *Taq* polimerase em um volume final de 25 µL.

Protocolo de amplificação

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região codificadora no presente estudo foram desenhados através do programa Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu>) e estão especificados na tabela 4.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região codificadora do gene MAMLD1

Oligos	Posição	Sensi	Posição	Anti-sensi	PB	TA
Exon 1	Intron	CACCTAATTGAGCCACCATGT	Intron	CCACCAAGTTTGCACAGAAA	684	59°
Exon 3A	Intron 2	TTCTCCTCTCTTCTCTTCCA	Exon 3	GGGGATGATCTAAAACCAGTG	499	53°
Exon 3B	Exon 3	GAGCTCACCAAAATTCAAGAC	Exon 3	CTGCGGCTGTTGAGTGAG	721	56°
Exon 3C	Exon 3	CTGTCAAGCATGACGTCCAG	Intron 3	CCCTCCAGAGCCAGATATTG	841	55°
Exon 4	Intron 3	TAGGACACGGCAGGCCACC	Intron 4	AGCCAGCTGATCCAGCTCTGG	242	58°
Exon 5	Intron 4	CACTCAGGGCAGTGACAAGA	Intron 5	AGGCTGAGCAGGGGACTGT	389	56°
Exon 6	Intron 5	CTAGGTCCCCACGCAGCGATC	Intron 6	ACCCCTTGCCCACCCCTTG	169	57°

PB: tamanho do produto de PCR; TA: temperatura de annealing.

As amostras de DNA foram submetidas ao protocolo de amplificação específico para cada par de oligonucleotídeos em termociclador automático (Perkin Elmer 9700) (tabela 1 do anexo B). Todas as amplificações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes exceto o DNA) e um controle positivo (DNA genômico de um homem normal) para confirmação da eficiência e especificidade da reação. As amostras amplificadas foram verificadas em gel de agarose preparado com TAE 1X e corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL de gel) e observadas em transiluminador ultravioleta.

Sequenciamento Direto

Os produtos de PCR de fita dupla foram purificados com a enzima ExoSAP-IT® (2 µL para 5 µL de produto de PCR) a 37°C durante 15 minutos. Ambas as enzimas são inativadas a 80 °C por 15 minutos. Todos os produtos de PCR foram sequenciados usando o kit ABI Prism™ BigDye Terminator (Perkin Elmer) seguido por purificação em colunas Centri-Sep (Princeton Separations, Adelphia, NJ, USA). Foram utilizados os mesmos *primers* descritos para as PCRs. Utilizamos o sequenciador automático ABI-Prism Genetic Analyser 3100 (Perkin Elmer Cetus) para análise das amostras. Nas amostras de DNA, em cujos produtos de PCR foram identificadas variantes alélicas do MAMLD1, as reações foram repetidas para confirmação dos resultados.

Rastreamento da variante alélica por PCR e sequenciamento no grupo controle

A variante alélica encontrada no gene *MAMLD1* nas pacientes com DDS 46,XY foi pesquisada por sequenciamento direto em 225 indivíduos controle com desenvolvimento sexual normal, 200 indivíduos do sexo masculino e 25 feminino num total de 250 alelos, utilizando a mesma metodologia anteriormente descrita. Para essa variante alélica não havia enzimas de restrição disponíveis, de forma que foram realizados PCR e sequenciamento dos DNAs de controles.

3.4.3 Estudo de microsatélite para avaliar o efeito de gene fundador através de técnica de Gene Scan

Para esta análise foram escolhidos seis marcadores de microsatélites que flanqueiam o gene *MAMLD1* com distância de até 2,0 Mb deste, visto que com essa distância gênica a possibilidade de recombinação se torna pouco provável.

Os marcadores de microsatélites foram utilizados para analisar um possível efeito fundador. A ordem dos marcadores no mapa físico foi: Xq 28 tel– DXS1073, DXS8103, DXS 8091, DXS8086, DXS1193, DXS1215 -cen. (figura 8).

Figura 8 - Mapa físico da região Xq28 onde se localiza o *MAMLD1*. A posição relativa dos *loci* dos marcadores de microsatélites é indicada na parte superior da figura. Abaixo a localização de cada marcador em Mb. A posição do *MAMLD1* está indicada em cinza

A análise do sinal e a determinação do genótipo foram realizadas com os softwares *GENESCAN* 3.0 (PE Applied Biosystems) e *GENOTYPER* 2.5 (PE Applied Biosystems).

3.4.4 Reação de polimerase em cadeia (PCR) e Sequenciamento direto do Gene da enzima 5-alfa redutase tipo II

O DNA genômico foi amplificado através de PCR utilizando-se oligonucleotídeos intrônicos específicos para o gene da enzima 5 α redutase tipo II desenvolvidos pela pesquisadora Regina Matsunaga Martin.

Foram utilizados em cada reação de PCR: 100 ng de DNA genômico, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 0,5 mM (20 pmol) de cada “primer”, além do tampão e 2,5 UI de enzima *Taq* polimerase em um volume final de 25 μ L. Os oligonucleotídeos e o programa de PCR estão disponíveis na tabela abaixo.

Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região codificadora do gene SRD5A2

Oligos	Posição	Sensi	Posição	Anti-sensi	PB
Exon 1	Intron	GTGGCGTCTGGCGCTCCATAAA	Intron	CAGGAGCGCAGCGTGGAGCGCG	444
Exon2	Intron 1	AACAGTGAATCCTAACCTTTCCTCCC	Intron 2	TTGTTAGCTGGGAAGTAGGTGAGAA	245
Exon 3	Intron 2	TGTGAAAAAGCACCACAATCTGGA	Intron 3	GCTCCAGGGAAGAGTGAGAGTCTGG	212
Exon 4	Intron 3	TGCAATGATTGACCTTCGATTCTT	Intron 4	GTTTGGAGAAGAAGAAAGCTACGT	240
Exon 5	Intron 4	TCAGCCACTGCTCCATTATATTTA	Intron 5	TTGACAGTTTTTCATCAGCATTGTGG	170
Programa de PCR					
Desnaturação		Anelamento (35x)			
97° (5:00)		94° (1:00)	65° (00:30)	72° (00:30)	72° (10:00)

O protocolo de amplificação e sequenciamento seguiu os mesmos princípios para a amplificação do gene *MAMLD1*.

3.5 Avaliação Funcional *in vitro* da nova variante alélica do *MAMLD1*

3.5.1 Ensaio de Luciferase

Um método amplamente empregado para se estudar a expressão de genes eucarióticos é o sistema de gene "repórter". Essa abordagem permite avaliar o efeito que uma sequência regulatória de um determinado gene - artificialmente inserido à montante de um outro gene, chamado de "repórter" - exerce sobre o nível de transcrição deste último. Em razão desta característica, este é o método de escolha para se delimitar preliminarmente os elementos regulatórios, avaliar os efeitos de agentes hormonais sobre a transcrição gênica e estudar o impacto de mutações.

Primeiramente, constrói-se um plasmídeo quimérico, contendo a sequência regulatória do gene em estudo ligada a um gene "repórter". O plasmídeo recombinante é então introduzido em um tipo de célula apropriado e, após um período de 24-72h, o produto do gene "repórter" expresso é quantificado ou avaliado. A quantidade de proteína "repórter" sintetizada sob várias condições deve refletir a habilidade da sequência regulatória inserida em promover a transcrição^{50, 51}.

Nos ensaios *in vitro*, a proteína "repórter" é quantificada a partir de lisados de células ou tecidos.

Um dos genes "repórter" mais amplamente utilizados no estudo da expressão gênica de mamíferos é o gene que codifica a enzima luciferase do vagalume (*luc*). A enzima luciferase, codificada pelo gene *luc*, clonado do

vagalume (*Photinus pyralis*)⁵², catalisa uma reação de bioluminescência que requer a luciferina como substrato, ATP, Mg^{2+} e O_2 . Na presença desses reagentes e mediante a ação da luciferase presente no lisado de células, ocorrerá uma reação de oxidação da luciferina com emissão de um *flash* de luz que decai rapidamente. O sinal luminoso é detectado por um luminômetro. A emissão total de luz é proporcional à atividade da luciferase na amostra que, por sua vez, reflete indiretamente a taxa de transcrição do gene "repórter" sob ação do promotor em estudo. A quantificação da Luciferase, realizada por medida da luminescência, fornece uma estimativa indireta da atividade transcricional do vetor "repórter".

Como o *MAMLD1* é um co-ativador de um gene repressor transcricional, o *Hes3*, realizamos um ensaio de co-transfecção onde utilizamos um vetor de expressão, que é responsável por transcrever o RNAm do *MAMLD1*, e um vetor "repórter" que contem a região promotora do gene *Hes3* e o gene da Luciferase. Assim, co-transfectamos ambos em células COS-1 que vão produzir o RNAm do *MAMLD1*, pela presença do vetor de expressão, e este RNAm vai agir na região promotora do gene *Hes3* (vetor repórter) e esta interação vai ser quantificada por maior ou menor produção de luciferase.

Os estudos funcionais foram feitos no Laboratório de Endocrinologia do *National Research Institute for Child Health and Development*, Tóquio, Japão sob a orientação da Dra. Maki Fukami e Dr. Tsutomu Ogata e repetidos no LIM-42.

Plasmídios utilizados para avaliar funcionalmente a proteína do MAMLD1

O cDNA completo do *MAMLD1* (aminoácidos 1-701) foi amplificado a partir de DNA de testículo fetal humano (Invitrogen) e subclonado no vetor pCMV-Myc (Clontech) para construir o vetor de expressão do *MAMLD1* e assim analisar a função de transativação da sua proteína³⁹. O vetor de expressão da variante missense do *MAMLD1* (H347Q) foi gerado por mutagênese sítio-dirigida. A mutagênese consistiu em introduzir a mudança da base citosina por adenina na posição 1107 no cDNA do gene do *MAMLD1* que havia sido subclonado no vetor de expressão como citado anteriormente. Isto foi feito através da construção de oligonucleotídeos específicos contendo a troca de bases e procedida à reação de PCR usando o Primestar® HS DNA polimerase (Takara Bio Inc.). Em seguida, o plasmídio contendo o cDNA mutado foi transformado em bactérias *E.coli*, nas quais foi clonado e multiplicado exponencialmente. Posteriormente, foi realizada a extração do plasmídio através de Miniprep, que consiste na lise das bactérias, extração e purificação do plasmídio. Ao final, foi feito sequenciamento do plasmídio para conferir a correta inserção da troca de bases.

Os seguintes vetores reporterres também foram utilizados: pHes1-Luc com a sequência promotora do gene *Hes1* do camundongo (- 46 ~ 467 pb), pHes3-Luc com a sequência promotora do gene *Hes3* do camundongo (- 2.715 ~ 261 pb) e pHes5-luc com a sequência promotora de gene *Hes5* do camundongo (- 800 ~ 73 bp)⁵³. pHes1-luc, pHes3-luc e pHes5-luc foram

construídas usando um vetor pGL2-básico (Promega). O vetor de PRL-CMV (Promega) foi utilizado como controle interno.

Cultura celular

Células COS-1 fibroblasto-simile de rim de macaco (ATCC, CRL-1650TM) foram usadas para os estudos de transativação³⁹. Essas células foram mantidas em meio Dulbecco modificado Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Ensaio de transativação das proteínas selvagem e mutante do *MAMLD1*

Células COS-1 foram distribuídas em placas de 12 poços (1,0-1,5 x 10⁵ células/poço) e transfectadas transitoriamente utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) com 0,6 mg do vetor repórter de luciferase (pGL2 - pHes1-luc, pHes3-luc ou pHes5-luc), 0,6 mg do vetor de expressão (pCMV-Myc – vazio), que está representado na figura 13 como MAMLD1 (-), ou o pCMV-Myc contendo o cDNA do MAMLD1 selvagem ou da variante alélica H347Q, que estão representados na figura 13 como MAMLD1 S ou MAMLD1 H347Q, respectivamente e 20 ng do vetor PRL-CMV, um plasmídio que expressa Renilla, foi usado como um controle interno da reação. Os ensaios de Luciferase foram lidos em um transiluminador LB9507, 48h após a transfecção (Berthold) e foram feitos em triplicata, repetidos ao menos três vezes. A atividade de luciferase foi normalizada de acordo com a relação

das atividades de Luciferase e Renilla e está expressa em relação à atividade dos extratos preparados a partir de células transfectadas com o vetor vazio pCMV-Myc, MAMLD1 (-), que é arbitrariamente definida como um valor de 1.

A análise estatística dos resultados foi realizada através do teste T student e os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Resultados Moleculares

4.1.1 Análise da Sequência do *MAMLD1* nos pacientes com DDS 46,XY de causa indeterminada

Uma nova variante alélica (1107C → A, p.H347Q) foi identificada no gene *MAMLD1* em hemizigose, em quatro pacientes não relacionados (três casos esporádicos e um familiar) dos 50 pacientes investigados (figura 9). A nova variante alélica está localizada no exon 3 numa região altamente conservada dentro do domínio rico em prolinas (aminoácidos 332-362).

Figura 9 - Localização da variante alélica identificada no *MAMLD1* e os eletroferogramas da sequência do tipo selvagem e a substituição 1107 C → A em hemizigose

Para avaliar a importância dessa alteração nos pacientes, a mesma foi rastreada em 225 indivíduos controle (200 do sexo masculino / 25 do sexo feminino), num total de 250 alelos, e foi encontrada em apenas 1 indivíduo controle do sexo masculino. Esse indivíduo é pai de uma paciente com baixa estatura com mutação no gene *SHOX* e não relata nenhuma alteração dos genitais.

A avaliação do grau de conservação do aminoácido revelou que o mesmo apresenta-se relativamente bem conservado entre as espécies (figura 10).

<i>T. belangeri</i> (mamífero)	TKQ-PTPAPN	WSGLPPPGLS	PPYRLVPSPH	PPPPPP----	--PFSPPSLM
<i>M. mulata</i> (macaco)	TKQ-QGPTPS	WSGLPPPGLS	PPYRLVPSPH	PPPPPLPPPP	P-PFSPQSLM
<i>X. tropicalis</i> (sapo)	AKQ-QVQTSS	WPTISPTGLS	PTYRPGSSPQ	QP-----	---FSPQNVM
<i>M. lucifugus</i> (morcego)	TKQ-QGPTSN	WSSLTSPGLS	PPYRPVPSPH	PPP-----	--PFSPQSLM
<i>F. catus</i> (gato)	TRQ-PGPNPS	WSGLPPPGLS	PSYRPVPSPH	PPPP-----	--PFSPQSLM
<i>O. anatinus</i> (ornitorrinco)	AKQ-PVAAGS	WSTMSPPGLS	PPYRQGSSPH	HQP-----	---FSPQNVL
<i>M. murinus</i> (Sapo)	TKQ-QGATPS	WSGLPPPGLS	PPYRPVPSPH	PPPPPPPPPP	--PFSPQSLM
<i>H. sapiens</i>	TKQ-QGPTPS	WSGLPPPGLS	PPYRPVPSPH	PPPLPLPPPP	P-PFSPQSLM
<i>O. garnettii</i> (mamífero)	TKQ-RGPSPS	WSGLPPPGLS	PPYRPVPSPH	PPPPPPPPPPQ	PQPFSTQSLM
<i>E. telfofoiri</i>	TKQ-PVPPPS	WSGLPPPGLS	PPYHPVPSPH	PPP-----	--PFTPNLM
<i>E. europalus</i> (ouriço)	SKQ--VATSG	WSGLASSGLT	P--RPVAAPS	PPL-----	---FSTQNL
<i>M. domestica</i> (gambá)	TKQ-QMPTSS	WSTMASPGLS	PPYPPGSSPH	QQP-----	---YSPQNIM
<i>G. gallus</i> (galinha)	TKQ-QVQAPS	WPSMSPPGLS	PPYRAGSSPH	HQP-----	---FSPQNVM
<i>S. araneus</i> (mamífero)	TKQQQTPAPT	WSGLPAPGVS	PPYRPVPSPH	PPPA-----	---FSSQSLL
<i>C. familiares</i> (cão)	ARQ-PGTTPS	WSSLPPPGLS	PSYRPVPSPH	Q-----	---FSPQSLM
<i>L. africana</i> (elefante)	AKQ-QGPAPS	WSGLPPPGLS	PTYHPVPSPH	PPP-----	--PFSPQSLM
<i>C. porcellus</i> (Preá)	TKQ-QGPSPT	WSGLPPPGLS	PPYRPVPSPH	PPPPPPPPPP	--PFSPQSF
<i>M. musculus</i> (rato)	TKQ--GSNRN	WSSLPPPGLS	PPYLPVPSPH	PPPPQPPPP	--PFSPQNFT
<i>P. troglodytes</i> (chimpanzé)	TKQ-QGPTPS	WSGLPPPGLS	PPYRPVPSPH	PPPLPLPPPP	P-PFSPQSLM
<i>B. taurus</i> (vacca)	KKQ-LDPTTS	WSGLPSPGLS	PPYQPVVVS	PQPLP----	--PFSPQGLM
<i>S. tridecemlineatus</i> (esquilo)	TKH-PRPCIA	WSGLPPTGIS	PPYRPVPSPH	PPPPPPPPPP	--PFGSQSFM

Figura 10 - Alinhamento dos aminoácidos do gene *MAMLD1* do *Homo sapiens* (SP) (em negrito) para avaliar grau de conservação do aminoácido histidina na posição 347 (em vermelho)

Os polimorfismos previamente relatados na literatura, p.N662S (anteriormente p.N598S) (1605A → G) (rs2073043) e p.P359S (anteriormente p.P286S) (1141C → T) (rs41313406)⁴³, foram identificados em 5 (15, 17, 33, 42, e 44) e 4 (15, 17, 33 e 52) pacientes, respectivamente. Sendo que os pacientes 15, 17 e 33 apresentavam concomitantemente os dois polimorfismos.

Figura 11 - Localização esquemática e eletroferogramas dos polimorfismos encontrados no gene *MAMLD1*

4.2 Aspectos clínicos dos pacientes portadores da nova variante alélica do *MAMLD1*

Dois dos pacientes portadores da variante alélica, p.H347Q, foram criados no sexo masculino e apresentavam como fenótipo principal: micropênis, hipospádia perineal e criptorquidia (paciente 1 e 2). Os derivados dos Ductos de Wolff dos pacientes 1 e 2 foram visualizados através da ultrassonografia pélvica. O exame físico realizado antes da cirurgia de feminização da genitália externa da paciente 3 foi feito no ambulatório de pediatria da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e constava em prontuário que a paciente apresentava clitoremegalia (4,0 x 1,8 cm), dois orifícios perineais e gônada esquerda palpável no canal inguinal e direita não palpável. Neste serviço a paciente 3 foi submetida à cirurgia de feminização da genitália externa e gonadectomia bilateral ainda na infância. Já o exame físico realizado em nosso serviço posteriormente revelou uma genitália feminina com gônadas impalpáveis. A ultra-sonografia pélvica e uretrocistografia retrógrada detectaram a presença de útero e após a reintrodução da terapia de reposição estrogênica ocorreu aumento do volume uterino. A paciente 4 apresentava genitália externa feminina ao primeiro exame realizado em nosso ambulatório e foi submetida à genitoplastia (abertura de seio urogenital) e gonadectomia bilateral aos 2 anos de idade. Ambas foram criadas no sexo feminino.

Os dados clínicos dos pacientes com a variante alélica do *MAMLD1* estão resumidos na tabelas 6.

Tabela 6 - Características clínicas dos pacientes portadores da variante alélica p.H347Q no gene MAMLD1

Pacientes	1	2*	3	4
Idade	12 a	9 m	17 a	10 a
Ginecomastia	Não	Não	Tanner IV (pós E2)	Não
Gênero atribuído	Masculino	Masculino	Feminino	Feminino
Genitália Externa	Micropênis	Micropênis	Feminino	Feminino
	Hipospádia Perineal	Hipospádia Perineal	(após clitoroplastia)	Clitóris normal
	Testículos pequenos	Testículo Direito: tópico	Vagina normal	Orifício perineal único
	Criptorquidismo	Criptorquidismo	Gônadas impalpáveis	Gônadas impalpáveis
	(Testículo Esq. – região inguinal)	(Testículo Esq : Impalpável)	(após gonadectomia)	(após gonadectomia - 2a)
Ductos de Wolff	+	+	-	ND
Ductos de Müller	-	-	Útero: (2 cm ³)	–

ND: não disponível, * Casos Familiares

4.3 Aspectos hormonais dos pacientes portadores da nova variante alélica do *MAMLD1*

Os níveis séricos dos hormônios hipofisários eram normais nos pacientes 1 e 2. Os gonadais, tanto pré quanto pós-estímulo com hCG, eram normais nos pacientes 1 e 2, com exceção da testosterona deste último paciente que apresentava níveis subnormais. Nos pacientes gonadectomizados a dosagens de gonadotrofinas, LH e FSH, apresentaram níveis elevados com predomínio do FSH, e níveis de testosterona baixos compatíveis com o diagnóstico de hipogonadismo hipergonadotrófico (tabela 7).

Tabela 7 - Características hormonais, basais e pós estímulo com hCG, dos pacientes portadores da variante alélica p.H347Q no gene *MAMLD1*

	Testosterona (ng/dl)		DHT (ng/dl)		Relação T/DHT		17OHP (ng/ml)		Progesterona (ng/ml)		Androstenediona (ng/ml)		DHEA (ng/ml)		FSH	LH
Pacientes	<u>Basal</u>	<u>Pós</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós</u>	<u>Basal</u>	<u>Basal</u>
1	29	215	< 4	9,9	-	21,7	0,4	1,0	0,4	0,8	0,2	0,4	4,0	5,3	10,5	7,3
2	< 14	46	-	26	-	1,76	1,0	0,4	< 0,3	0,3	0,5	<0,13	0,9	0,4	<0,6	2,2
3	147	277	-	-	-	-	0,2	-	-	-	0,3	-	2,3	-	50	22,1
4	24	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	54	24
Níveis prepuberais normais			<u>Basal</u>		<u>Pós hCG</u>		Níveis prepuberais normais			<u>Basal</u>		<u>Pós hCG</u>				
Testosterona (ng/dl)			< 30,0		≥ 130		17OHP (ng/ml)			< 0,1- 1,5		5.0 – 16.				
DHT(ng/dl)			3,0 – 9,0		29 ± 8		Progesterona (ng/ml)			<0,53		-				
Relação T/DHT			-		14 ± 5		Androstenediona (ng/ml)			0,8 – 2,8		1.8 – 9.5				
DHEA (ng/ml)			1.4 – 12.5		-											

ND: não disponível

4.4 Análise de segregação da nova variante alélica nas famílias dos pacientes 2 e 4

A genitora do paciente 2 é portadora da variante alélica em heterozigose e o avô materno normal carrega a alteração em hemizigose (figura 12). Nesta família, o pai do paciente afetado é portador de hipospádia isolada, assim como seu primo, nenhum deles carregava a variante alélica. O DNA dos parentes das famílias 1 e 3 não estavam disponíveis para análise de segregação da variante alélica. Na família 4, o irmão e mãe da paciente têm fenótipos e genótipos normais. Nenhum dos pacientes tinha histórico familiar de consanguinidade.

Figura 12 - Eletroferogramas e pedigrees das famílias dos pacientes 2 e 4. Os símbolos preenchidos de preto e os de branco indicam, respectivamente, indivíduos com DSD 46, XY e com fenótipo normal. Os símbolos hachurados indicam indivíduos com hipospádia isolada. Abaixo de cada símbolo estão os respectivos genótipos: S: MAMLD1 selvagem, H347Q: variante alélica do MAMLD1 e N.D.: DNA não disponível.

4.5 Avaliação de efeito fundador

Não identificamos efeito fundador entre as famílias que carregavam a variante alélica p.H347Q do MAMLD1.

Tabela 8 - Haplótipos obtidos pelo Gene Scan

Paciente	DXS1073	DXS8091	DXS1193	DXS1215	DXS8086	DXS8103
1	69	-	129	87	239	238
2	69	304	127	87	239	230
3	81	310	123	99	237	234
4	87	306	137	105	235	238

4.6 Análise do gene da 5 α redutase tipo II

O gene da 5 α redutase tipo II foi sequenciado em todos os pacientes que apresentavam a variante alélica e haviam sido gonadectomizados antes da primeira consulta em nosso ambulatório (pacientes 3 e 4), pois estes não dispunham de avaliação hormonal prévia.

O sequenciamento deste gene nos pacientes citados não apresentou mutações ou polimorfismos. Assim, foi excluída a possibilidade de deficiência desta enzima como causa da ambiguidade genital destes pacientes.

4.7 Análise do gene *SF-1*

O gene *SF-1* foi sequenciado em todos os pacientes da casuística, após o início desta tese. As mutações encontradas e o polimorfismo funcional, G146A, já descrito na literatura ⁵⁴, estão resumidos na tabela 9. Todas as variantes alélicas foram encontradas em heterozigose. A paciente 3 que apresenta a variante alélica H347Q no *MAMLD1* também apresenta uma das novas variantes alélicas, a p.G26E, no *SF-1*. Essa variante alélica foi estudada numa população de 100 controles normais e não foi encontrada.

Tabela 9 - Mutações e variantes alélicas encontradas no gene *SF-1* de pacientes com DDS 46,XY de origem indeterminada

Pacientes	Codon (cDNA)	Proteína	Exon	Domínio
3	c.78 G → A	p.G26E	2	1 zinc finger p-box motif (DBD)
3, 20	c. 225 G → C	p.T75T	3	2 zinc finger (DBD)
8, 17	c. 375 G → A	p.P125P	4	Hinge region
17, 20, 28, 29, 30, 31, 32, 36, 38, 39, 41, 42	c.438 G → C	p.G146A	4	Hinge region
17	c. 594 G → A	p.P198P	4	Hinge region
44	c.741 C→A	p.C247X	4	Hinge region
36	c.906 G→C	p.W302C	5	Ligand-binding domain
48	c.1212 C→G	p.Y404X	7	Ligand-binding domain
12	c.1185delGAG	p.del395E	7	Ligand-binding domain
23	c.1236 C→A	p.C412X	7	Ligand-binding domain
39, 41	CTG1353CTA	p.L451L	7	AF-2

4.8 Análise Funcional *in vitro*

4.8.1 Avaliação da função de transativação da nova variante protéica (p.H347Q) do *MAMLD1*

Na primeira parte do experimento, à esquerda da figura 13, utilizamos o vetor repórter vazio, contendo apenas o gene da Luciferase (pGL2 básico). O *MAMLD1* selvagem (pCMV-Myc *MAMLD1* S) foi capaz de aumentar discreta, porém significativamente, a atividade de luciferase, na ausência de promotor do *Hes3* em comparação ao vetor sem cDNA do *MAMLD1* (*MAMLD1*(-)). Este achado sugere uma ativação constitutiva, provavelmente através de uma sequência estrutural do vetor ³⁸. Essa sequência faz parte do vetor pCMV-Myc, mas não é cDNA do *MAMLD1* e é capaz de aumentar a atividade de Luciferase independente do promotor do *Hes3*. Apesar disso, foi possível utilizar este vetor para o ensaio, pois, não existem diferenças entre os níveis de atividade de Luciferase promovida pelos vetores pCMV-Myc contendo respectivamente os cDNA do *MAMLD1* selvagem ou mutante (figura 13).

Na segunda etapa do experimento, à direita da figura 13, utilizamos o vetor repórter (pGL2) contendo o promotor do *Hes3* (pHes 3-Luc). O *MAMLD1* selvagem (*MAMLD1* S) foi então capaz de aumentar a atividade de Luciferase cerca de 30 vezes em relação ao vetor de expressão vazio (pCMV-Myc – vazio – *MAMLD1*(-)), ou seja, que não contém o cDNA do *MAMLD1*.

No entanto, o vetor contendo a variante protéica do *MAMLD1* (H347Q), foi capaz de transativar o promotor do *Hes3* em níveis duas vezes maiores do que o *MAMLD1* selvagem ($p = 0,038$) (figura 12), enquanto que a transativação do *Hes1* e *Hes5* foram semelhantes entre o mutante e o selvagem (dados não mostrados).

Figura 13 - Função de transativação da proteína do *MAMLD1* selvagem (MAMLD1 S) e mutante (MAMLD1 H347Q): Os níveis basais do pGL2 básico mostram uma atividade constitutiva sem nenhuma diferença entre o *MAMLD1* selvagem e a variante H347Q. Os efeitos do MAMLD1 selvagem e do MAMLD1 H347Q sob a transcrição do vetor repórter de Luciferase contendo o promotor do gene *Hes3* mostraram um aumento de 2x nos níveis de Luciferase com o MAMLD1 H347Q quando comparado com o selvagem.

5 Discussão

5.1 Aspectos clínicos e laboratoriais dos pacientes portadores da nova variante alélica do *MAMLD1*

O gene *MAMLD1* vem sendo considerado importante no desenvolvimento sexual masculino normal durante o período crítico do desenvolvimento da genitália masculina na vida embrionária. Mutações neste gene parecem fazer parte das etiologias da hipospádia peno-escrotal.

Em nosso estudo, identificamos uma nova variante alélica no *MAMLD1*, a p.H347Q, em 4 pacientes brasileiros não relacionados portadores de DDS 46, XY de causa indeterminada (3 casos esporádicos e um familiar). Dois dos pacientes que tinham a variante alélica foram criados no sexo social masculino, e, semelhantes aos casos já descritos na literatura, eles apresentavam micropênis, criptorquidia e hipospádia perineal.

Em contraste com casos previamente relatados, dois desses pacientes foram criados no sexo social feminino, provavelmente por apresentarem importante subvirilização da genitália externa, o que levou a realização da gonadectomia ainda na infância. Curiosamente, uma dessas pacientes (paciente 03) apresentava útero à ultra-sonografia pélvica.

Estudos anteriores indicaram que *MAMLD1* é expresso em células de Leydig e Sertoli fetais durante o período crítico do desenvolvimento genital⁵⁵. A presença de útero numa das pacientes portadoras da nova variante alélica no *MAMLD1* pode indicar uma disfunção transitória das

células de Sertoli, resultando em produção insuficiente de hormônio anti-mülleriano e regressão inadequada dos ductos de Müller. Todavia, esta paciente também apresenta uma variante alélica inédita no gene *SF-1*. A p.G26E, localiza-se na região P-box motif (DBD), no primeiro dedo de zinco da proteína do *SF-1*⁵⁶. Essa região tem como função o reconhecimento das sequências de DNA alvo do *SF-1*, como a presente no *MAMLD1*. O *SF1* se liga a uma sequência específica (CCAAGGTCA) presente nos introns 1 e 2 a montante da região codificadora do *MAMLD1* e exerce atividade de transativação⁴². Assim, essa variante alélica do *SF-1* pode prejudicar a interação entre este gene e o *MAMLD1* e pode ter contribuído para o fenótipo de persistência uterina na paciente 03. Porém, seu papel na etiologia do DDS 46,XY da paciente 3 precisa ser ainda melhor elucidado através de estudos funcionais visando avaliar o papel desta mutação na função do gene *SF-1* assim como avaliar a importância desta sobre a capacidade do *SF-1* em transativar o *MAMLD1*.

Essa ampla variabilidade fenotípica observada em nossos pacientes portadores da variante alélica p.H347Q sugere que genes adicionais envolvidos na diferenciação sexual masculina, como o *SF-1* e o *SRY*, possam modular o efeito do *MAMLD1*.

A produção de testosterona após estímulo com hCG, era normal no paciente 01 e discretamente diminuída no paciente 02. Como o gene *MAMLD1* parece desempenhar um papel importante na diferenciação das células de Leydig⁵⁵, é possível que a presença de uma variante protéica do *MAMLD1* possa levar a uma disfunção transitória das células de Leydig

resultando em hipovirilização intra-utero com níveis normais de testosterona sérica pós-natal. Como as pacientes 03 e 04 haviam sido gonadectomizadas na infância não foi possível realizar avaliação hormonal.

5.2 Análise da segregação da nova variante alélica do *MAMLD1*

O padrão de herança do gene *MAMLD1* não é bem estabelecido. Alguns autores sugerem que a herança seja recessiva ligada ao X, onde as mães dos pacientes seriam apenas carreadoras sem manifestações clínicas e que os afetados seriam homens portadores do X com a variante alélica⁴³. Porém, Bartsch e col. descreveram uma família com dois filhos afetados por uma deleção que envolvia o *MAMLD1* e o *MTM1*, cuja mãe dos pacientes era uma carreadora com manifestações clínicas (ciclos menstruais marcadamente irregulares)³⁷.

No presente estudo, na família do paciente 02, a genitora carregava a variante alélica H374Q em heterozigose, porém a mesma recebeu este cromossomo X afetado de seu pai assintomático (figura 12), pois sua mãe era genotipicamente normal. Ainda nesta família, o pai do paciente afetado era portador de hipospádia isolada, assim como seu primo paterno e ambos não eram portadores da variante p.H347Q. Assim, podemos sugerir a hipótese de que exista uma penetrância incompleta desta variante alélica, resultando em genótipos e fenótipos discordantes entre membros de uma mesma família.

Já na família da paciente 04, parece ter ocorrido mutação *de novo*, já *que* sua mãe não é portadora da variante alélica p.H347Q.

O modo de herança da variante alélica não pode ser avaliado nas famílias dos pacientes 1 e 2 já que o DNA dos familiares não estava disponível.

5.3 Análise molecular

Recentemente, a variante alélica encontrada no presente estudo, vem sendo descrita na literatura como um polimorfismo raro. No banco de dados o *1000 genomes* a frequência do alelo A é de 0,012 contra 0,988 do alelo C e o genótipo C/C tem frequência de 0,987 contra apenas 0,002 do A/C. A frequência desta variante em nossos pacientes foi 8,0% e em normais 0,4%. Ainda se somarmos aos nossos normais os 585 indivíduos controles de diversas etnias (japoneses e caucasianos) sequenciados para o *MAMLD1* na literatura, o que dá um total de 810 controles, a frequência da variante H347Q passa a ser 0,12 %. Além disso, apesar de em ambos os banco de dados, o *NCBI* (www.ncbi.nlm.nih.gov) e o *Ensembl* (www.ensembl.org), essa variante ser descrita como polimorfismo, nenhum estudo funcional foi anteriormente realizado.

Como a frequência da variante alélica, p.H347Q, foi grande dentro da nossa casuística decidimos estudar a possibilidade da presença de um efeito fundador entre as famílias dos pacientes. Porém, nenhum efeito fundador foi identificado utilizando-se 6 marcadores de microssatélite que flanqueiam o gene.

Os dois polimorfismos presentes na nossa casuística, o p.N662S e o p.P359S foram detectados pela primeira vez por Fukami e col. em um paciente sueco (p.P359S) e num japonês (p.N662S) com hipospádia, assim como em indivíduos controle ⁴³. Estudos funcionais destas variantes mostraram que ambas tem função preservada in vitro e similar à proteína selvagem do *MAMLD1* ³⁹. Embora esses polimorfismos sejam não-patológicos, recentemente foi descrita uma fraca associação entre o alelo p.N662S e hipospádia. Além disso, a análise dos haplótipos mostrou que a frequência dos alelos mais comuns (p.359P e p.662N) era semelhante entre os grupos controle e de pacientes. No entanto, os alelos mais raros (p.359S e p.662S) tinham maior incidência (11%) no grupo de pacientes com hipospádia, porém sem significância estatística. Houve uma tendência para fenótipos mais severos de hipospádia no grupo de haplótipos mais raros (p.359S e p.662S) em relação ao total de pacientes. Ou seja, esses polimorfismos parecem estar em desequilíbrio de ligação e a presença deles parece conferir aos indivíduos um maior risco de desenvolver hipospádia ⁴⁵.

5.4 Análise do estudo funcional *in vitro*

A proteína do *MAMLD1* participa como um co-ativador transcricional da via não-canônica de sinalização intracelular *Notch*. A sua função é transativar a transcrição do gene *Hes3* ³⁹. Os sete membros da família HES (*HES1-7*) funcionam como repressores transcricionais e têm padrão de expressão tecidual cíclico e célula-específico. Eles atuam suprimindo a

expressão dos genes-alvo a jusante na via de sinalização *Notch* e controlam o momento exato de vários eventos biológicos⁵⁷. Nos sistemas dos vertebrados, a via de sinalização intracelular *Notch* media a especificação do tipo celular em diversos tecidos e desempenha um papel importante na diferenciação celular, por exercer efeito indutor ou inibitório de acordo com o contexto celular^{58 - 61}.

O padrão de expressão dos genes *Hes* nas gônadas não é bem estabelecido. Recentemente, Fukami e col. identificaram, através de técnica de PCR, variáveis graus de expressão do gene *HES3*, inclusive nos testículos fetais e em ovários adultos, utilizando um banco de cDNA de vários tecidos³⁹. Hirata e col. demonstraram que tanto a ausência quanto a persistência da expressão dos genes *Hes* resultam nos mesmos defeitos na somitogênese^{62, 63}.

Ensaio de Luciferasa realizados anteriormente com proteínas truncadas do *MAMLD1* mostraram uma redução na capacidade destas em ativar a transcrição do gene *Hes3*³⁹. Em contraste, a variante protéica descrita em nosso estudo, p.H347Q, mostrou uma maior capacidade de ativar a transcrição do promotor do gene *Hes3*.

Assim, considerando-se que o *MAMLD1* é um co-ativador de transcrição dos genes *Hes*, possivelmente tanto as variantes protéicas com função inativadora quanto aquelas com função ativadora podem resultar em perda do padrão de expressão destes genes, resultando no mesmo fenótipo.

Nossa hipótese é que a superexpressão do gene *Hes3* poderia prejudicar a diferenciação sexual masculina normal pela contínua supressão

de genes essenciais envolvidos a jusante na cascata do desenvolvimento sexual masculino. Esta é a primeira descrição de uma variante protéica do *MAMLD1* como possível causa etiológica de DDS 46, XY, resultando de um aumento de repressão transcricional. Mecanismos semelhantes têm sido propostos para outros genes repressores, como o *HESX1*. O desenvolvimento hipofisário dependente do *PROP1* ocorre durante a atenuação da expressão do gene *HESX1*⁶⁴. A mutação 175delG que leva a um *frameshift* do gene *HESX1* determina aumento da atividade funcional desse gene, levando ao bloqueio da expressão do gene *PROP-1* causando hipopituitarismo⁶⁵. Esses dados reforçam a noção de que o momento específico de expressão de genes repressores é fundamental para o desenvolvimento humano.

6 Conclusões

-
- 1- Identificamos uma nova variante alélica, a p.H347Q, no *MAMLD1* que parece tratar-se de uma variante alélica funcional em 4 pacientes brasileiros não-relacionados com DDS 46,XY de causa indeterminada. Essa é a primeira descrição de uma variante alélica com ganho de função no gene *MAMLD1*.

A real importância desta variante protéica do *MAMDL1* na etiologia DDS 46,XY deve ser melhor determinada através de estudos *in vivo*.

- 2- Não houve efeito fundador nas famílias portadoras da variante alélica.
 - 3- Os dois polimorfismos anteriormente descritos na literatura, o p.P359S e o p.N662S, que parecem estar em desequilíbrio de ligação e conferir aos indivíduos um maior risco de desenvolver hipospádia, foram encontrados em superposição em três pacientes da nossa casuísta. É necessário esclarecer o papel real destes polimorfismos na etiologia do DDS 46,XY destes pacientes.
-

7 Anexos

Anexo A

Tabela 1 - Aspectos clínicos pacientes com DDS 46XY, indeterminado

Caso	Idade	Ginecomastia	Consanguinidade	Casos Familiares	Gênero atribuído	Genitália Externa	Ductos de Wolff	Ductos de Muller
1	12 a	Não	Não	Não	M	Micropênis Hipospádia perineal Criptorquidia Esq.	+	–
2	9m	Não	Não	Sim	M	Micropênis Hipospádia perineal Criptorquidia Esq.	+	–
3	17 a	Tanner IV (pós E2)	Não	Não	F	Feminina (pós-clitoroplastia) Vagina normal Gonadectomia	-	Útero(2cm)
4	10 a	Não	Não	Não	F	Feminina Clitóris normal, Orifício perineal único Gonadectomia	ND	-
5	ND	ND	ND	ND	F	ND	ND	ND
6	13 a	Tanner II	Não	Tio materno	M	Uretra tópica (neourethroplastia) Pênis normal Testículos tópicos	ND	ND
7	2a 11m	Não	Não	Não	M	Hipospádia perineal micropênis Criptorquidia bilateral (inguinal) Corda ventral Seio urogenital	ND	-
8	1a 11m	Não	Não	Não	M	Hipospádia perineal Criptorquidia bilateral Micropênis	+	-
9	31 a	Sim (pós Pregnyl)	Não	Não	M	Hipospádia perineal Criptorquidia bilateral Micropênis Seio urogenital	+	-
10	3a 11m	ND	Não	Não	M	Hipospádia perineal Criptorquidia bilateral Micropênis Bolsa bífida	+	-

continua

Tabela 1 - Aspectos clínicos pacientes com DDS 46XY, indeterminado (continuação)

Caso	Idade	Ginecomastia	Consanguinidade	Casos Familiares	Gênero atribuído	Genitália Externa	Ductos de Wolff	Ductos de Muller
11	5a 4m	Não	Não	Não	M	Hipospádia perineal Micropênis Criptorquidia bilateral (inguinal) Corda ventral Bolsa bífida	+	-
12	1a 6m	Não	Não	Não	M	Hipospádia perineal Criptorquidia bilateral (inguinal) Micropênis	+	-
13	4 a	ND	ND	ND	M	Hipospádia perineal Criptorquidia Dir. Micropênis Bolsa Bífida	ND	+
14	27 a	Não (mastectomia bilateral)	Não	Não	M	Uretra tópica (Neouretroplastia) Pênis normal Testículos tópicos	+	-
15	ND	ND	ND	ND	F	ND	ND	ND
16	6a 4m	Não	ND	Não	M	Hipospádia perineal Criptorquidia Esq. retrátil Bolsa Bífida	+	-
17	15a 11m	Não	Pais primos	Irmã	M	Hipospádia perineal Micropênis Criptorquidia bilateral (inguinal) Bolsa bífida bilateral Vagina em fundo cego	+	-
18	31 a	Tanner IV (pós E2)	Não	ND	F	Feminina Hérnia inguinal bilateral Gonadectomia bilateral (6a)	ND	ND

continua

Tabela 1 - Aspectos clínicos pacientes com DDS 46XY, indeterminado (continuação)

Caso	Idade	Ginecomastia	Consanguinidade	Casos Familiares	Gênero atribuído	Genitália Externa	Ductos de Wolff	Ductos de Muller
19	5m	Tanner II (broto)	ND	ND	M	Hipospádia perineal Corda ventral Criptorquidia bilateral (retrátil Dir.) Bolsa bífida Hérnia inguinal Esq.	ND	ND
20	27 a	ND	Não	Não	F	Feminina Agenesia de pequenos lábios Clitóris normal Neovagina – Vagina em fundo cego Gonadectomia (13a)	+	-
21	ND	Não	Não	Não	M	Hipospádia peniana Criptorquidia Dir. (inguinal) Micropênis Bolsa bífida Hérnia inguinal D	ND	ND
22	2m	ND	Não	ND	F	Clitóris (3cm) Agenesia vaginal Gônadas em grandes lábios	+	-
23	54 a	Tanner II (pós E2)	Não	Não	F	Feminina Gonadectomia bilateral (14anos)	ND	ND
24	ND	ND	ND	ND	M	ND	ND	ND
25	4a 11m	ND	Não	Não	M	Hipospádia perineal Criptorquidia bilateral (gônadas inguinais) Bolsa bífida Hérnia inguinal Dir. Seio Urogenital	+	-
26	11 a	Não	ND	Não	M	Criptorquidia bilateral Micropênis Anus imperfurado	+	-
27	3a 1m	Não	Não	Não	M	Hipospádia Subapical Criptorquidia bilateral (inguinais) Transposição peno/escrotal	+	-

continua

Tabela 1 - Aspectos clínicos pacientes com DDS 46XY, indeterminado (continuação)

Caso	Idade	Ginecomastia	Consanguinidade	Casos Familiares	Gênero atribuído	Genitália Externa	Ductos de Wolff	Ductos de Muller
28	7a 4m	Não	Não	Não	M	Hipospádia Peniana Hérnia inguinal Dir. Criptorquidia Dir. Micropênis Transposição peno/escrotal	+	-
29	17 a	ND	Sim (avos primos 1ª)	Não	F	Clitóris (3,8cm) Criptorquidia bilateral (inguinal) Vagina em fundo cego	+	-
30	5a 11m	ND	Não	ND	M	Hipospádia perineal Bolsa bífida Criptorquidia Micropênis Corda ventral Testículos retráteis bilateralmente	+	-
31	2 a	Não	ND	ND	F	Clitoromegalia Vagina em fundo cego Gônadas em grandes lábios	+	-
32	25 a	ND	Pais primos 1º	Não	F	Clitóris normal Fusão posterior de pequenos lábios Agenesia vaginal Gonadectomia bilateral (3a)	ND	-
33	2a 4m	ND	Não	ND	M	Hipospádia perineal Testículos tópicos Micropênis Bolsa bífida	+	-
34	14a 11m	Tanner III	Não	Não	M	Hipospádia peniana Testículos tópicos, Pênis normal	+	-
35	20 d	Não	Não	Não	F	Fusão de grandes lábios Orifício perineal único Gônadas palpáveis em grandes lábios	-	-

continua

Tabela 1 - Aspectos clínicos pacientes com DDS 46XY, indeterminado (continuação)

Caso	Idade	Ginecomastia	Consanguinidade	Casos Familiares	Gênero atribuído	Genitália Externa	Ductos de Wolff	Ductos de Muller
36	4a 11m	Não	Não	Não	F	Clitóris normal Fusão posterior de grandes lábios Gônadas palpáveis em grandes lábios Orifício perineal único Seio urogenital	-	-
37	11 a	Não	ND	ND	M	Hipospádia perineal Pênis normal, Testículos tópicos	+	-
38	46a 7m	ND	ND	ND	M	Hipospádia perineal Micropênis Gonadectomia (11a)	ND	ND
39	5m	Não	Não	Não	F	Clitóris normal Gônadas palpáveis em grandes lábios Bolsa escrotal bífida Orifício perineal único	-	-
40	34 a	Não	Não	irmão	F	Gonadectomia bilateral (19a)	ND	ND
41	ND	Tanner III	ND	ND	M	Criptorquidia	ND	ND
42	22 d	Não	Não	Não	M	Hipospádia perineal Pênis normal Testículos tópicos Bolsa bífida Corda ventral	+	-
43	5a 4m	ND	ND	ND	M	Micropênis Criptorquidia Bolsa escrotal bífida Corda ventral	+	-
44	26a	Não	Avos primos	Irmão	M	Hipospádia Micropênis Criptorquidia bilateral Seio urogenital	ND	ND
45	4a 9m	ND	ND	ND	M	Hipospádia peniana	ND	ND
46	2m	Tanner (pós E2)	ND	Não	F	ND	ND	ND

continua

Tabela 1 - Aspectos clínicos pacientes com DDS 46XY, indeterminado (conclusão)

Caso	Idade	Ginecomastia	Consanguinidade	Casos Familiares	Gênero atribuído	Genitália Externa	Ductos de Wolff	Ductos de Muller
47	2a 6m	ND	Não	ND	M	Hipospádia perineal Criptorquidia	+	-
48	14 a	Tanner III (pós E2)	Não	Primo materno Hipospádia	F	Feminina Clitoromegalia Gonadectomia bilateral (9m) Vagina em fundo cego Hérnia inguinal bilateral	ND	-
49	6m	Não	Não	Não	M	Hipospádia perineal Pênis normal Criptorquidia Dir (inguinal) Bolsa bífida Seio urogenital vagina em fundo cego	+	-
50	12 a	Não	ND	Não	M	Hipospádia peniana Pênis normal Testículos tópicos	ND	ND

ND: Não disponível

Tabela 2 - Aspectos laboratoriais pacientes com DDS 46XY, indeterminado

Pacientes	1		2		3		4		5		6		7		8	
Teste de estímulo hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG							Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG
Testosterona (ng/dl)	29	290	< 14	46	Gonadectomia		Gonadectomia		ND		35		10		672	
DHT (ng/dl)	4	9,9	-	26							ND		-		10,6	
Pacientes	9		10		11		12		13		14		15		16	
Teste de estímulo hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG
Testosterona (ng/dl)	175	138	12	325	ND	ND	11	458	< 10	440	647	1084	ND	ND	< 10	168
DHT(ng/dl)	4,5	6,3	-	23	ND	ND	-	102	< 4	37,4	51,76	-	ND	ND	-	29
Pacientes	17		18		19		20		21		22		23		24	
Teste de estímulo hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG
Testosterona (ng/dl)	704	756	Gonadectomia		ND	ND	Gonadectomia		15	495	210	1207	Gonadectomia		ND	ND
DHT(ng/dl)	35,2	ND			ND	ND			14	64	16	203			ND	ND
Pacientes	25		26		27		28		29		30		31		32	
Teste de estímulo hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG	Basal	Pós hCG
Testosterona (ng/dl)	< 10	494	25	150	48	336	418	-	570	986	< 7	477	13	146	Gonadectomia	
DHT(ng/dl)	-	27	-	18	51	ND	187	-	Nd	68	-	155	5,7	8,5		

continua

Tabela 2 - Aspectos laboratoriais pacientes com DDS 46XY, indeterminado (conclusão)

Pacientes	33		34		35		36		37		38		39		40	
Teste de estímulo hCG	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>	<u>Basal</u>	<u>PóshCG</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>
Testosterona (ng/dl)	47	280	< 14	92	< 10	133	< 14	169	101	ND	Gonadectomia		18	247	Gonadectomia	
DHT (ng/dl)	< 4	61,7	-	13	< 4	29	-	15	ND	ND			ND	ND		
Pacientes	41		42		43		44		45		46		47		48	
Teste de estímulo hCG	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>	<u>Basal</u>	<u>PóshCG</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>
Testosterona (ng/dl)	ND	ND	< 14	366	ND	< 11	149	464	ND	722	ND	ND	ND	990	Gonectomia	
DHT(ng/dl)	ND	ND	-	176	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
Pacientes	49		50													
Teste de estímulo hCG	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>	<u>Basal</u>	<u>Pós hCG</u>												
Testosterona (ng/dl)	< 11	496	14	747												
DHT(ng/dl)	-	203	ND	ND												
Níveis prepuberais normais					<u>Basal</u>						<u>Pós hCG</u>					
Testosterona (ng/dl)					< 30,0						≥ 150					
DHT(ng/dl)					3,0 – 9,0						29 ± 8					

ND: Não disponível

Anexo B

Tabela 1 - Protocolo das condições de PCR para amplificação do gene *MAMLD1*

Temperatura		Tempo				Número de ciclos	
96°		5 min				1	
94°		30 seg				30	
Anelamento		30 seg				30	
72°		1 min				30	
72°		10 min				1	
15°		∞				∞	

Exon	1	3A	3B	3C	4	5	6
Temperatura de Anelamento	59°	53°	56°	55°	58°	56°	57°

8 Referências

-
1. Jost A. A new look at the mechanisms controlling sex differentiation in mammals. *Johns Hopkins Med J.* 1972; 130: 38-53.
 2. Moore KL. *The developing human: clinical oriented embryology.* Philadelphia: WB Saunders Co.; 1973.
 3. Kim Y, Capel B. Balancing the bipotential gonad between alternative organ fates: a new perspective on an old problem. *Dev Dyn.* 2006; 235: 2292-2300.
 4. Cummings AM, Kavlock RJ. Function of sexual glands and mechanism of sex differentiation. *J Toxicol Sci.* 2004; 29: 167-178.
 5. Grumbach M, Hughes IA, Conte FC. Disorders of sexual differentiation. In: Larsen, R, Kronenberg, HM, Melmed, S, Polansky, KS, Wilson, JD, editors. *Williams Textbook of endocrinology.* 10th ed. Philadelphia: Saunders; 2003. p. 842-1002.
 6. Jost A, Magre S, Agelopoulos R. Early stages of testicular differentiation in the rat. *Hum Genet.* 1981; 58: 59-63.
-

-
7. De Franca LR, Bartke A, Borg KE, Cecim M, Fadden CT, Yagi A, et al. Sertoli cells in testes containing or lacking germ cells: a comparative study of paracrine effects using the W (c-kit) gene mutant mouse model. *Anat Rec.* 1994; 240: 225-232.
 8. Merchant-Larios H, Centeno B. Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W^v mouse. *Prog Clin Biol Res.* 1981; 59B: 383-392.
 9. Parker KL, Schimmer BP. Genes essential for early events in gonadal development. *Ann Med.* 2002; 34: 171-178.
 10. Domenice S, Costa EMF, Mendonça BB. Distúrbios da determinação e diferenciação sexual In: Saad, MJA, Maciel, RMB, Mendonça, BB, editores. *Endocrinologia.* São Paulo: Atheneu; 2007. p. 131.
 11. Federman DD. Abnormal sexual development. A genetic and endocrine approach to differential diagnosis. Philadelphia: WB Saunders Co.; 1967.
 12. Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA. LWPES1/ESPE2 Consensus Group. Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child.* 2006; 91: 554-562.
 13. Mendonca BB, Domenice S, Arnhold IJ, Costa EM. 46,XY disorders of sex development (DSD). *Clin Endocrinol.* 2009; 70 (2): 173-87.
-

14. De Marchi M, Campagnoli C, Ghiringhello B, Ponzio G, Carbonara A. Gonadal agenesis in a phenotypically normal female with positive H-Y antigen. *Hum Genet.* 1981; 56: 417-9.
 15. Marcantonio SM, Fechner PY, Migeon CJ, Perlman EJ, Berkovitz GD. Embryonic testicular regression sequence: a part of the clinical spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis. *Am J Med Genet.* 1994; 49: 1-5.
 16. Cleary RE, Caras J, Rosenfield RL, Young PC. Endocrine and metabolic studies in a patient with male pseudohermaphroditism and true gonadism. *Am J Obstet Gynecol.* 1977; 128: 862-7.
 17. Mendonca BB, Domenice S, Costa EMF, Arnhold IJP. Male Pseudohermaphroditism. *Pediatrics* [serial on line] Endotext 2002 <http://www.endotext.com/Pediatrics/Pediatrics 11>
 18. Quigley CA DBA, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev.* 1995; 16: 271-321.
 19. Melo KF, Mendonca BB, Billerbeck AE, Costa EMF, Inacio M, Silva, FAQ, Leal AM, Latronico AC, Arnhold IJ. Clinical, hormonal, behavioral, and genetic characteristics of androgen insensitivity syndrome in a Brazilian cohort: five novel mutations in the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 3241-50.
-

-
20. Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. Steroid 5-alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science*. 1974; 186: 1213-1215.
 21. Mendonca BB, Inacio M, Costa EM, Arnhold IJ, Silva FA, Nicolau W, Bloise W, Russel DW, Wilson JD. Male pseudohermaphroditism due to steroid 5alpha-reductase 2 deficiency. Diagnosis, psychological evaluation, and management. *Medicine*. (Baltimore) 1996; 75: 64-76.
 22. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawikins, JR, Griffiths, BL, Smith, MJ et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 1990; 346: 240-4.
 23. Canning CA, Lovell-Badge R. Sry and sex determination: how lazy can it be? *Trends Genet*. 2002; 18: 111-3.
 24. Parker KL. The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function. *Mol Cell Endocrinol*. 1998; 140: 59-63.
 25. Parker KL, Schedl A, Schimmer BP. Gene interactions in gonadal development. *Annu Rev Physiol*. 1999; 61: 417-33.
 26. Park SY, Jameson JL. Minireview: transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology*. 2005; 146: 1035-42.
-

27. Wilhelm D, Englert C. The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev.* 2002; 16: 1839-51.
 28. Achermann JC, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet.* 1999; 22:125-6.
 29. Correa RV, Dominici S, Bigham NC, Billerbeck AE, Rainey WE, Packer KL et al. A microdeletion in the ligand binding domain of steroidogenic factor 1 causing XY sex reversal without adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(4): 1767-72.
 30. Yao HH, Whoriskey W, Capel B. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev.* 2002; 16: 1433-40.
 31. Canto P, Soderlund D, Reyes E, Mendez JP. Mutations in the desert hedgehog (DHH) gene in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:4480-3.
 32. Umehara F, Tate G, Itoh K, Yamaguchi N, Douchi T, Mitsuya T et al. A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46,XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy. *Am J Hum Genet.* 2000; 67: 1302-5.
-

33. Clark AM, Garland KK, Russell LD. Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod.* 2000; 63: 1825-38.
 34. Rey R, Lukas-Crosier C, Lasala C, Bedecarrás P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol.* 2003; 211: 21-31.
 35. Laporte J, Kioschis P, Hu LJ, Kretz C, Carlsson B, Poustka A, Mandel JL, et al. Cloning and Characterization of an Alternatively Spliced Gene in Proximal Xq28 Deleted in Two Patients with Intersexual Genitalia and Myotubular Myopathy. *Genomics.* 1997; 41: 458-462.
 36. Biancalana V, Caron O, Gallati S, Baas F, Kress W, Novelliet G al. Characterization of mutations in 77 patients with X-linked myotubular myopathy, including a family with a very mild phenotype. *Human Genetics.* 2003; 112: 135-142.
 37. Bartsch D, Kress W, Wagner A, Seemanova E. The novel contiguous gene syndrome of myotubular myopathy (MTM1), male hypogenitalism and deletion in Xq28: report of the first familial case. *Cytogenetic Cell Genetic.* 1999; 85: 310-314.
-

-
38. Tsai TC, Horinouchi H, Noguchi S, Minami N, Murayama K, Hayashi YK et al. Characterization of MTM1 mutations in 31 Japanese families with myotubular myopathy, including a patient carrying 240 kb deletion in Xq28 without male hypogenitalism. *Neuromuscular Disorders*. 2005; 15: 245-252.
 39. Fukami M, Wada Y, Okada M, Kato F , Katsumata N, Baba T et al. Mastermind-like domain-containing 1 (MAMLD1 or CXorf6) transactivates the Hes3 promoter, augments testosterone production, and contains the SF1 target sequence. *J Biol Chem*. 2008; 283: 5525-32.
 40. Tozaki T, Hirota K, Mashima S, Tomita M, Mukoyama H. Cloning and characterization of the equine F18 gene, which has a novel exon. *Anim Genet*. 1998; 29(5): 381-4.
 41. Vilain E, McCabe ER. Mammalian sex determination: from gonads to brain. *Mol Genet Metab*. 1998; 65(2): 74-84.
 42. Ogata T, Wada Y, Fukami M. MAMLD1(CXorf6): A new gene for hypospadias. In: Ogata T, editors. *Progress in analyzing disorders of sexual development 2o Vol*. Switzerland: S. Kager; 2008; 78-84.
 43. Fukami M, Wada Y, Miyabayashi K, Nishino I, Hasegawa T, Nordenskjöld A et al. CXorf6 is a causative gene for hypospadias. *Nature Genetics*. 2006; 38: 1369-1371.
-

-
44. Kalfa N, Liu B, Ophir K, Audran F, Wang M, Mei C et al. Mutations of CXorf6 are associated with a range of severities of hypospadias. *Eur J Endocrinol*. 2008; 159: 453-8.
 45. Chen Y, Thai HTT, Lundin J, Lagerstedt-Robinson K, Zhao S, Markljung E et al. Mutational study of the MAMLD1. *Eur J Med Genet*. 2010; 53(3): 122-6.
 46. Beilguelman, B. *Citogenética humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Publisher; 1986.
 47. Arnhold IJ, Mendonca BB, Diaz JA, Nogueira C, Batista MC, Batista MC et al. Prepubertal male pseudohermaphroditism due to 17-ketosteroid reductase deficiency: diagnostic value of a hCG test and lack of HLA association. *J Endocrinol Invest*. 1988; 11: 319-322.
 48. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res*. 1988; 16: 1215.
 49. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Analysis and Cloning of Eukaryotic Genomic DNA in Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd end. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor laboratory Publisher; 1989.
-

50. Alam J, Cook JL. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem.* 1990; 188(2): 245-54.
 51. Bronstein I, Fortin J, Stanley PE, Stewart GSAB, Kricka LJ. Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Anal Biochem.* 1994; 219(2): 169-81.
 52. Wood KV. Marker proteins for gene expression. *Curr Opin Biotechnol.* 1995; 6(1): 50-8.
 53. Nishimura M, Isaka F, Ishibashi M, Tomita K, Tsuda H, Nakanishi S et al. Structure, chromosomal locus, and promoter of mouse Hes2 gene, a homologue of *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genomics.* 1998; 49: 69-75.
 54. Wuqiang F, Yanase T, Wei L, Oba K, Nomura M, Okabe T et al. Functional characterization of a new human Ad4BP/SF-1 variation, G146A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 311(4): 987-994.
 55. Ogata T, Laporte J, Fukami M. *MAMLD1 (CXorf6)*: a new gene involved in hypospadias. *Horm Res.* 2009; 71: 245-52.
 56. Lin L, Achermann JC. Steroidogenic Factor-1 (*SF-1*, *Ad4BP*, *NR5A1*) and Disorders of Testis Development. In: Ogata T, editors. *Progress in analyzing disorders of sexual development.* 2o Vol. Switzerland: S. Kager; 2008. P. 34-43.
-

57. Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T. The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development*. 2007; 134: 1243-51.
 58. Wu L, Sun T, Kobayashi K, Gao P, Griffin JD. Identification of a family of mastermind-like transcriptional co-activators for mammalian notch receptors. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 7688-700.
 59. Iso T, Kedes L, Hamamori YJ. HES, HERP families: multiple effectors of the notch signaling pathway. *Cell Physiol*. 2003; 194: 237-55.
 60. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999; 284: 770-6.
 61. Lanford PJ, Lan Y, Jiang R, Lindsell C, Weinmaster G, Gridley T et al. Notch signaling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat Genet*. 1999; 21: 289-92.
 62. Bessho Y, Sakata R, Komatsu S, Shiota K, Yamada S, Kageyama R. Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes Dev*. 2001; 15: 2642-7.
 63. Hirata H, Bessho Y, Kokubu H, Masamizu Y, Yamada S, Lewis J et al. Instability of Hes7 protein is crucial for the somite segmentation clock. *Nat Genet*. 2004; 36: 750-4.
-

64. Dasen JS, Barbera JP, Herman TS, Connell SO, Olson L, Ju B et al. Temporal regulation of a paired-like homeodomain repressor/TLE co-repressor complex and a related activator is required for pituitary organogenesis. *Genes Dev.* 2001; 15: 3193-207.
 65. Cohen RN, Cohen LE, Botero D, Yu C, Sagar A, Jurkiewicz M et al. Enhanced repression by HESX1 as a cause of hypopituitarism and septooptic dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 4832-9.
-