Dulce Rondina Guedes

**Estudo investigativo clínico, laboratorial,
patológico, morfométrico, molecular de 10
pacientes com pseudohermafroditismo
masculino disgenético (ADS 46, XY)**

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

Área de concentração: Pediatria

Orientador: Dr. Durval Damiani

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Guedes, Dulce Rondina

Estudo investigativo clínico, laboratorial, patológico, morfométrico, molecular de
10 pacientes com pseudohermafroditismo masculino disgenético (ADS 46, XY) /
Dulce Rondina Guedes. -- São Paulo, 2009.

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

Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientador: Durval Damiani.

Descritores: 1.Pseudo-hermafroditismo 2.Disgenesia gonadal 3.Células
germinativas 4.Túbulos seminíferos 5.Fator esteroidogênico 1

USP/FM/SBD-451/09

Dedicatória

A minha querida filha **Vivian** que agradeço constantemente a Deus por tê-la colocado em minha vida e pela felicidade de poder contar com seu amor, constante incentivo e compreensão.

A minha querida **mãe** que apesar de não estar mais conosco, com certeza, vem iluminando meu caminho. Ao meu **pai** que sempre me apoiou e aos meus irmãos, que Deus permita que continuemos sempre muito unidos.

Ao **José Rubens** pelo constante carinho, companheirismo, incentivo e apoio.

Agradecimentos

Ao Orientador: **Dr. Durval Damiani** que novamente me orienta nesse trabalho com a mesma dedicação e atenção de sempre. Você é um grande exemplo para todos nós.

À **Dra Nuvarte** pelo constante incentivo e dedicação a todos nós.

Ao **Dr Vaê** pela amizade e apoio em todos esses anos.

Thaís, Hilton e todo o **grupo de Endocrinologia Pediátrica** pelo incentivo durante a realização desse trabalho.

Ao **Dr Carlos Alberto Moreira Filho** e **Dra Patrícia Pieri** que tornaram possível grande parte desse estudo.

À **Dra Rennee Zoon Filipe** pela realização da morfometria testicular.

À **Mariza K Umatsu**: Bibliotecária do Instituto da Criança, pela correção das referências bibliográficas.

Aos **pacientes** com ADS 46,XY do ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança. A confiança que vocês nos depositam e a maneira como vocês se doam para essas pesquisas nos dá a certeza que devemos prosseguir nessa procura pela etiologia e melhor forma de tratamento das anomalias da diferenciação sexual.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Determinação Gonadal	4
1.2	Diferenciação sexual a partir da determinação testicular	16
1.3	Aspectos morfológicos do testículo – As disgenesias gonadais	24
2	OBJETIVO	31
3	MÉTODOS	33
3.1	Casuística	34
3.2	Avaliação Clínica	35
3.3	Avaliação por Imagem	35
3.4	Avaliação citogenética	36
3.5	Avaliação Hormonal	36
3.6	Avaliação Anatomopatológica	38
3.7	Avaliação Molecular	39
3.7.1	Protocolo para extração do DNA	39
3.7.2	Análise das mutações em <i>NR5A1/SF1</i>	40
3.7.3	Estudos funcionais da atividade de <i>NR5A1/SF1</i>	42
3.7.4	Pesquisa de Microdeleção nas regiões AZF	43
3.7.4.1	PCR - Reação em cadeia da polimerase	43
3.7.4.2	Análise para investigação de número de cópias no locus DAZ pela técnica de amplificação e digestão por restrição	47
3.7.5	Sequenciamento automatizado do gene SRY	49

4	RESULTADOS	50
4.1	Resultados Moleculares	53
4.1.1	Resultados das mutações no gene NR5A1/SF1.....	53
4.1.2	Resultados da Pesquisa da Microdeleção do Cromossomo Y ...	54
4.1.3	Seqüenciamento do SRY	55
5	DISCUSSÃO	56
5.1	Pacientes WS e MMF.....	60
5.2	Pacientes ALS e LSOS	65
5.3	Paciente DSFJ	66
5.4	Paciente BLS	67
5.5	Pacientes LSSB, MAMS, IZ e OAMJr	68
6	CONCLUSÕES.....	70
7	REFERÊNCIAS	73

Lista de Abreviaturas

ACTH: Homônio Adrenocorticotrófico

AF-2: Ativation fuction 2

Ad4BP:Proteína ligadora adrenal 4

ADS: Anomalias da diferenciação sexual.

ATRX: helicase 2 X-linked

AZF: Azospermia factor

Alul: enzima de restrição

CDK1: ciclina dependente de quinase

CXCR4: Receptor chemokine

CYP26B1: cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1

CHARGE: Coloboma, cardiopatia congênita, atresia de coanas, retardo de crescimento e desenvolvimento, anomalias genitais, anomalias de pavilhão auricular e/ ou surdez.

CHD7: Chromodomain Helicase DNA- Binding Protein 7

CXorf6: Chromosome X open reading frame 6

Cyp11a1: P450scc

Cyp 19a1: aromatase

Cm: centímetros

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DAX1: Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region on chromosome X, gene 1

Dpc: dias pós coito

D: distal

DHH: Desert Hedgehog

DMRT1: Doublesex and Mab-3 related transcription factor 1

DP: desvio padrão

DHT: diidrotestosterona

DTM: Diâmetro tubular médio

DAZ: Deleted in azoospermic gene

dNTP: desorribonucleotídeo trifosfatado

DraI: enzima de restrição

Dye terminator: terminação de cadeia

EMX2: Empty Spiracles homolog 2

EDTA: Etilenodiamino tetra-acético

FOG2: Feminization of germline

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

FGF9: Fator de crescimento fibroblasto 9

FspI: enzima de restrição

GATA 4: Membro da família GATA, fator de transcrição zinc-finger

G: grama

hCG: gonadotrofina coriônica humana

HMG: High mobility group

Hormônio Anti-Mülleriano: HAM

INSL-3: Fator 3 insulina-like

Ir: receptor de insulina

Igfr1: insulin growth factor receptor

IGF1: fator de crescimento insulina-like

IFT: índice de fertilidade tubular

IOT: Instituto de Ortopedia e Traumatologia

KTS: Lisina, treonina, serina

KHCO₃: bicarbonato de potássio

LHX1: Lim homeobox gene 1

LH: hormônio luteinizante

LSC: ligamento suspensório craniano.

M33: chromobox homolog gene 2

MAMLD1: mastermind-like domain containing 1

MgCl₂: cloreto de magnésio.

MboI: enzima de restrição

mM: milimol

ml: mililitro

M: mol

NR5A1: Nuclear Receptor Sub family 5 group A, member 1

Ng: nanograma

NH₄CL: cloreto de amônio

NaCl: Cloreto de sódio

Ng/ml: nanograma por mililitro

P450_{scc}: Enzima que cliva a cadeia lateral do colesterol.

PAX2: Paired Box gene 2

Pod1: basic helix-loop-helix transcription factor Pod 1

PCR: Reação em cadeia de polimerase.

P: proximal

Pb: pares de base

pH: potencial hidrogeniônico

RNA: Ácido ribonucleico

RLF: Relaxin-like Factor

RA: receptor androgênico

Rpm: rotações por minuto

SCF: Stem cell factor

SDF1: stromal cell-derived factor 1

STRA-8: Stimulated by Retinoic acid gene 8 protein homolog

SRY: Sex-determining region on the Y chromosome

Sip1: Interacting-protein 1

SF1: Fator esteroidogênico 1

SOX9: SRY-related high-mobility group (HMG) box 9

StAR: Steroidogenic Acute Regulatory Protein

SC: Síndrome de CHARGE

SNV: variante de um único nucleotídeo

SDS: detergente sulfato dodecyl de sódio

SSCP: single strand conformational polymorphism

sY: pares de *primers*

TA: túnica albugínea

TSPY: testis-specific protein Y

TAE: tampão de corrida em gel de agarose

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

Tris-HCl: tampão de ácido clorídrico

TE: Tris-HCl + EDTA

US: ultrassonografia

UV: ultra violeta

WT1: Wilms Tumor supressor locus-gene 1

WAGR: Tumor de **W**ilms, **A**niridia, malformação Genitourinária e Retardo mental

Wnt4: Wingless-related MMTV integration

μ: micra

μl: microlitro

μM: micromol

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Seqüência de bases e temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados na PCR para amplificação das regiões exônicas do gene <i>NR5A1/SF1</i>	41
Tabela 2:	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para investigação da integridade do cromossomo Y	46
Tabela 3:	Antecedentes pessoais dos pacientes estudados	51
Tabela 4:	Avaliação Clínica dos Pacientes Estudados	51
Tabela 5:	Avaliação Hormonal dos Pacientes Estudados.....	52
Tabela 6:	Avaliação Anatomopatológica e Estudo Morfométrico dos pacientes estudados	52

Lista de Figuras

Figura 1:	Desenho ilustrando o cromossomo Y	44
Figura 2:	Mutação do SF1: (paciente WS)	54
Figura 3:	Mutação do SF1: (paciente MMF)	54
Figura 4:	Análise por restrição para <i>DAZ 2</i>	55

Resumo

Guedes DR. *Estudo investigativo clínico, laboratorial, patológico, morfométrico, molecular de 10 pacientes com pseudohermafroditismo masculino disgenético (ADS 46, XY)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 88p.

O Pseudohermafroditismo masculino disgenético (Anomalia da diferenciação sexual 46,XY – ADS 46,XY) é definido como ambigüidade genital num paciente com testículos e/ou cariótipo 46,XY com uma das seguintes características: alteração histológica testicular, ausência ou hipoplasia das células de Leydig em tecido previamente estimulado com gonadotrofina coriônica humana(hCG), falta de resposta de testosterona ao estímulo com hCG sem acúmulo de precursores, ausência de células germinativas, presença de derivados müllerianos indicando inadequada produção do hormônio antiMülleriano (HAM) ou resistência de seus receptores. Esse estudo apresenta uma avaliação clínica, laboratorial, anátomo-patológica, morfométrica e molecular de 10 pacientes com ADS 46,XY; dois pacientes apresentaram mutação no SF1 (fator esteroideogênico 1), duas mutações no domínio “hinge” e uma terceira produziu um stop códon na posição 404; três pacientes com deleção da cópia do DAZ2. A morfometria testicular mostrou todos os diâmetros tubulares médios (DTM) moderado a gravemente diminuídos e os índices de fertilidade tubular leve a moderadamente diminuídos. Devido à dificuldade do diagnóstico diferencial e etiológico, o estudo morfométrico e molecular deve sempre acompanhar esses casos de ADS 46,XY.

Descritores: 1.Pseudo-hermafroditismo 2.Disgenesia gonadal 3.Células germinativas 4.Túbulos seminíferos 5.Fator esteroideogênico 1

Summary

Guedes DR. *Clinical, Pathological and Morphometric Study of ten Male Dysgenetic Pseudohermaphroditism (DSD 46,XY)* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 88p.

The dysgenetic male pseudohermaphroditism 46,XY ; disorders of sex development (DSD 46,XY) is defined as sexual ambiguity in patients with testis and/or 46,XY karyotype and one of the characteristics: histologic alteration of the testis; absence or hypoplasia of Leydig cells; a decreased testosterone response to human chorionic gonadotropin stimulation without accumulation of testosterone precursors; absent germ cells; presence of müllerian duct derivatives showing inappropriate production of antimüllerian hormone (AMH) or resistance to its receptors. This study shows the clinic, laboratory, histologic, morphometric and molecular evaluation of 10 patients with DSD 46,XY; two patients showed mutations in the SF1 gene (steroidogenic factor-1); two in the hinge domain and one stop codon at the position 404 of the protein; three patients exhibited deletion of DAZ2. The testis morphometry showed reduction: marked to severe of all mean tubular diameter (MTD) while the reduction of the tubular fertility index (TFI) were slight to marked. Due to difficulties establishing the differential diagnosis and the etiology, the morphometric and molecular evaluation must be always done in the patients with DSD 46,XY.

Descriptors: 1.Pseudohermaphroditism 2.Gonadal dysgenesis 3.Germ cells 4.Seminiferous tubules 5.Steroidogenic factor-1

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um testículo ou ovário envolve a diferenciação de uma gônada bipotencial em tecidos metabólica e fisiologicamente distintos.

Os Pseudohermafroditas Masculinos Disgenéticos são definidos como uma ambigüidade genital devido`a incompleta masculinização da genitália externa em pacientes 46,XY com pelo menos uma das características:

- Alterações histológicas dos testículos: presença de hialinização e fibrose intersticial; diminuição da quantidade e do diâmetro dos túbulos seminíferos; ausência ou diminuição de células germinativas; hiperplasia de células de Sertoli.
- Ausência ou hipoplasia das células de Leydig em tecido previamente estimulado com gonadotrofina coriônica (hCG), assim como falta de resposta de testosterona nesses tecidos estimulados, sem acúmulo de precursores.
- Presença de derivados müllerianos indicando inadequada produção do hormônio anti Mülleriano (HAM) ou resistência de seus receptores.

Os processos de determinação e diferenciação sexuais estão associados à presença ou ausência do cromossomo Y (1,2). São classicamente divididos em quatro etapas: determinação do sexo cromossômico que é estabelecido na fertilização; diferenciação das gônadas

em testículos ou ovários; diferenciação dos genitais internos e externos masculinos ou femininos a partir de estruturas indiferenciadas presentes no embrião, que são dependentes da presença ou ausência de testículos; diferenciação sexual secundária que é a resposta dos vários tecidos aos hormônios produzidos pelas gônadas para completar o fenótipo sexual.

A importância desses processos é o desenvolvimento dos genitais internos e externos e a maturação sexual durante a puberdade.

O desenvolvimento e proliferação das células germinativas primordiais começam por volta da terceira semana de gestação quando têm início a migração ativa dessas células da parede do saco vitelínico, próximo à base do alantóide, seguindo o mesentério dorsal do intestino posterior até alcançarem as pregas genitais por volta da sexta semana de vida intra-útero. A partir daí tem início a proliferação do epitélio celômico que penetra na mesênquima subjacente formando os cordões sexuais primitivos envolvendo as células germinativas. Durante a migração essas células apresentam intensa proliferação, porém não se diferenciam (3). Sua proliferação e sobrevivência são sinalizadas pelos fatores: células tronco (SCF= stem cell factor) e seu receptor cKit, presente nas células germinativas (4). A migração e a colonização das pregas genitais estão também sob responsabilidade do fator 1 derivado de células do estroma (SDF1) e seu receptor CXCR4 (5).

Ao chegarem à prega genital indiferenciada no final da quinta semana, as células germinativas mantêm sua proliferação e bipotencialidade, sendo “enclausuradas” nos cordões seminíferos diferenciando-se em espermatogônia, porém, refratárias à ação do ácido retinóico produzido pelo

mesonefro e adrenal fetal e que tem sido apontado como indutor da meiose, sendo regulado pelo STRA-8. As células germinativas masculinas são protegidas dessa ação pela expressão do CYP26B1, enzima que cataboliza o ácido retinóico, chamado de fator de prevenção da meiose, produzido pelas células de Sertoli (6,7).

1.1 Determinação Gonadal

A determinação sexual pode ser definida como a proliferação, migração e diferenciação das células de suporte em células de Sertoli, direcionando o destino da gônada para testículo (8).

A procura por um “fator de determinação testicular” data de muito tempo. Sinclair et al., 1990 localizaram um gene chamado SRY (“Sex-determining Region on the Y chromosome”) no braço curto do cromossomo Y (Yp11.3), próximo à região pseudo-autossômica. Este gene é considerado o “sinalizador” para que a gônada bipotencial tome seu caminho a testículo (9).

O SRY possui somente um éxon e codifica uma proteína de 223 aminoácidos com domínio de ligação ao DNA de 80 aminoácidos, com homologia aos fatores de transcrição nuclear humano, pertencentes ao grupo de proteínas de alta mobilidade (“high mobility group” – HMG) (10,11). A proteína SRY atua como fator de regulação da transcrição que, ao se ligar ao DNA, induz neste um dobramento (9,12,13). Pelo menos três fatores de transcrição estão envolvidos na transativação do SRY: Sip1: (“interacting-

protein 1”) que após se ligar a essa proteína nuclear provoca encurvamento de 60 - 85° no DNA, mediando parte da função do SRY; SF1 e WT1 (13,14).

A rigorosa expressão do SRY é essencial para gonadogênese fetal: tempo e nível de expressão são determinantes para induzirem a diferenciação testicular associados à capacidade de ligação da proteína SRY ao DNA e ângulo de dobramento que ela induz. Sabe-se que a variante KTS⁺ do WT1 (estabilizador pós transcricional do RNAm do SRY) (14), GATA4/FOG2 (GATA 4 ativo nas células somáticas da crista genital) (15) e Sp1 (16) ativam a transcrição do SRY.

O SRY juntamente com outros determinantes gênicos começam a produzir modificações na gônada indiferenciada, ou seja, proliferação dos cordões sexuais primitivos em direção à medula da gônada, dando origem aos cordões testiculares. As células epiteliais desses cordões dão origem às células de Sertoli por volta da 7ª semana de vida intra-uterina surgindo, logo após, uma espessa cápsula fibrosa que originará a túnica albugínea. Considera-se que a função do SRY como fator de regulação de transcrição seja acionar, direta ou indiretamente a diferenciação das células de Sertoli, que estão intimamente envolvidas na “organização” da estrutura testicular, agrupando-se para formar cordões que englobam as células sexuais primitivas, que passarão a ser as espermatogônias e compartimentalizando células em estruturas tubulares, como túbulos seminíferos, túbulos retos e *rete testis*.

As células de Sertoli têm papel central no desenvolvimento da função testicular, e conseqüentemente na expressão do fenótipo masculino. São as

primeiras células a se diferenciarem na gônada ainda bipotencial, capacitam a formação dos cordões seminíferos, previnem que as células germinativas entrem em meiose, participam da diferenciação e função das células de Leydig, cuja secreção originará a testosterona e o fator 3 *insulina-like* (INSL-3) (17) e ainda asseguram a regressão dos ductos de Müller pela secreção do hormônio anti-Mülleriano (18).

Durante a puberdade essas mesmas células estão envolvidas na espermatogênese, de forma que o número de células de Sertoli, determinaria o número de células germinativas presentes na espermatogênese e conseqüentemente a extensão numérica da produção dos espermatozóides, fator importante na fertilidade (19). O FSH agiria nesse momento aumentando a taxa de proliferação das células de Sertoli.

Apesar do SRY ser a principal chave nessa determinação, há muitas evidências de que o controle da gonadogênese é um processo muito mais complexo, e que vários genes autossômicos ou ligados ao X devem atuar antes e depois da determinação testicular (genes “upstream” e “downstream” SRY) (20). Considera-se que mutações no gene SRY humano são responsáveis por cerca de 15% dos casos de disgenesia gonadal XY, sendo a grande maioria dessas mutações encontradas em pacientes com disgenesia gonadal pural (21).

Os mecanismos de ação do SRY na diferenciação gonadal ainda não são completamente esclarecidos. Há autores que sugerem que ele seria um ativador da transcrição (capacidade de dirigir o desenvolvimento gonadal), outros, repressor (romperia a ligação ou função dos genes repressores do

SOX9 - gene candidato seria o DAX-1) ou ainda, fator arquitetural, capacitando o encurvamento do DNA proporcionando a interação com outras proteínas e estabilização do RNAm transcrito e/ou da proteína (22). Segundo Polanco and Koopman ainda não é possível demonstrar conclusivamente se SRY age como ativador transcricional, repressor ou fator arquitetural; a resolução desse problema dependerá da identificação dos genes alvos do SRY in vivo (23).

Nessa série de eventos que participam da determinação gonadal, o WT1 (Wilms Tumor supressor locus-gene 1; 11p13) autossômico, é expresso nas saliências das gônadas bipotenciais antes de sua diferenciação, portanto, antes da expressão do gene SRY. Seus RNA mensageiros são detectáveis a partir da sexta semana de gestação nos embriões humanos. Está envolvido na ativação da transcrição do SRY e HAM (hormônio anti-Mülleriano). A proteína WT1 contém quatro motivos protéicos do tipo “zinc-finger” (dedos de zinco) e sua atuação se dá pela combinação de sítios alternativos de início de tradução, de *splicing* e edição do RNA podendo resultar em 24 isoformas diferentes. Podem ser agrupadas em duas categorias funcionais relacionadas à presença (KTS^+) ou ausência (KTS^-) de três aminoácidos: lisina, treonina, serina, decorrentes de um *splicing* alternativo localizado entre as regiões que codificam o terceiro e quarto dedos de zinco. Considera-se que a forma KTS^+ atuaria no processamento de RNA e KTS^- regularia a transcrição do WT1(24) necessária para sobrevivência e proliferação celular na gônada indiferenciada (25).

A mutação desse gene é encontrada em quatro doenças: tumor de Wilms; síndrome de WAGR (tumor de Wilms, aniridia, malformação genitourinária e retardo mental), onde várias alterações genitourinárias podem ser encontradas, como: agenesia renal, rim em ferradura, atresia uretral, hipospádia e criptorquidia. Essa síndrome é causada por mutações do tipo deleção em heterozigose do gene WT1 (26); síndrome de Dennys-Drash caracterizada por tumor de Wilms, insuficiência renal grave devido a esclerose mesangial e gônadas disgenéticas em pacientes 46,XY; sendo a última a síndrome de Frasier que é uma variante caracterizada por disgenesia gonadal, pseudohermafroditismo masculino e esclerose glomerular focal, com elevado risco para desenvolvimento de gonadoblastoma. As mutações no gene WT1 que estão envolvidas com a síndrome de Frasier são encontradas no intron 9 por uso de *splicing* alternativo, alterando a razão entre a síntese das isoformas KTS⁺/KTS⁻ (27). Estudos sugerem que as síndromes Dennys-Drash e Frasier sejam espectros de uma mesma entidade causada por alterações no gene WT1 (28).

Outro fator envolvido na determinação gonadal é o Receptor Nuclear único (SF1 ou NR5A1: Nuclear Receptor Sub family 5 group A, member 1), gene autossômico, mapeado em 9q33, envolvido na determinação gonadal, juntamente com WT1, sua expressão ocorre na gônada ainda bipotencial sendo considerado o principal regulador das enzimas envolvidas na esteroidogênese adrenal e gonadal, no hipotálamo (região ventral e mediana) e hipófise. Está envolvido na expressão de genes específicos para o sexo masculino agindo na diferenciação e/ou manutenção do crescimento

das células somáticas (granulosa) da gônada indiferenciada, onde juntamente com SRY sustentam a expressão do SOX9 (29). É necessário em três momentos ao longo da determinação e diferenciação testicular: na formação da gônada bipotencial; nas células de Sertoli para regular a expressão do gene HAM e nas células de Leydig na regulação da expressão de hormônios esteróides, resultando na androgenização da genitália externa (30). Tem um papel essencial na esteroidogênese, visto que a transcrição da Sf 1 (em camundongos) já foi detectada quando o primórdio adrenal aparece como uma estrutura distinta por volta dos 10 a 10,5 dpc (dias pós coito). Essa expressão claramente precede a da P450scc (enzima que cliva a cadeia lateral do colesterol), que não foi detectada até 11º dpc tornando evidente a necessidade da SF1 para expressão das hidroxilases esteróides.

Também está envolvido na regulação da isoenzima tipo II da 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase que é expressa nas gônadas e córtex adrenal (31); regula a expressão da StAR (steroidogenic Acute Regulatory Protein), proteína mitocondrial que tem um papel crítico na entrada do colesterol para a mitocôndria onde a reação inicial na esteroidogênese é catalizada pela P450 scc (32) e finalmente regula a expressão do receptor do ACTH dentro das células adrenocorticais (33).

No ovário há uma aparente diminuição da transcrição do gene SF1 coincidente com a diferenciação sexual gonadal sugerindo que a diferenciação sexual feminina é facilitada pela diminuição da expressão do NR5A1/SF1, que permanece baixa até o início do desenvolvimento folicular.

Sua expressão é primeiro detectada nas células da teca e granulosa até o estágio pré-antral, que precede a expressão da aromatase nas células granulosas, portanto o SF1 é um regulador da aromatase (34). Nas células da teca e granulosa, o gene NR5A1/SF1 regula a esteroidogênese ovariana, crescimento e maturação folicular, incluindo STAR, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1, LHCGR (receptor hormônio luteinizante) e INHA (subunidade alfa da inibina). Segundo Lourenço et al., 2009 a desregulação de qualquer dessas proteínas pode levar a disfunção ovariana (35). Esses autores estudaram pacientes com insuficiência ovariana mostrando que mutações no NR5A1/SF1 estão associadas à diminuição do desenvolvimento e da função ovariana. Várias mutações apresentaram caráter familiar com muitos membros da família com a mesma mutação.

NR5A1/SF1 é formado por dois dedos de zinco. O primeiro denominado P box (proximal) confere especificidade no reconhecimento de sítios específicos do DNA. O segundo denominado D (distal) forma uma interface de dimerização do SF1 e três domínios: de ligação do DNA (A box), seguido da região “hinge” que é um domínio rico em prolinas (sete prolinas consecutivas no homem) totalmente envolvido na transcrição do SF1. O último domínio AF-2 (“Activation function 2”) é uma região crítica para ativação da transcrição dependente do ligante no SF-1 (domínio de ligação ao ligante) (36).

Da mesma forma que o SF1 a mutação do receptor nuclear órfão DAX-1 (*DSS* – Congenital Adrenal hypoplasia, em uma região crítica do cromossomo X, gene 1) expressa-se nas glândulas supra-renais e testículos. Sua deficiência apresenta padrão de herança ligada ao X, onde pacientes

46,XY manifestam o fenótipo e os 46,XX são normais. Pacientes com duplicação desse gene apresentam disgenesia gonadal 46,XY, sendo chamado por alguns autores de gene anti-testículos (37).

A similaridade de alterações fenotípicas que acompanham a mutação do SF1 e DAX-1 sugere que ambos agem no mesmo caminho no desenvolvimento sexual, determinando desenvolvimento adrenal e modulando a função reprodutiva em nível hipotálamo-hipofisário (38). Esses mesmos fatores atuam na formação das pregas urogenitais e na expressão do SRY, que uma vez expresso necessita de tempo para atingir seu limiar de ação e assim expressar seu gene alvo: SOX9 (39,40).

Sob a influência do SRY, os testículos começam a ser reconhecidos como dois compartimentos distintos: os cordões testiculares, que contêm as células de Sertoli fetal e germinativas primordiais, e a região intersticial com células de Leydig.

Para que o testículo fetal seja adequadamente diferenciado e os hormônios masculinos produzidos, todos esses fatores necessitam estar presentes juntamente com o SRY que deve atingir um nível de ação suficiente numa estreita janela de tempo. No camundongo essa janela de tempo para ação do Sry está por volta de seis horas (41) no homem ainda não se sabe.

No camundongo o atraso da expressão do Sry que deveria iniciar e manter a expressão do Sox9 para o desenvolvimento gonadal masculino e indução da formação testicular, resultaria num aumento dos níveis do Dax1 nas pregas genitais numa competição de sinalização entre Fgf9 e Wnt4

evoluindo a gônada para sexo feminino com formação de ovotestis e posteriormente degeneração.

SOX9 [SRY – related high-mobility group (HMG) box 9] localizado em 17q24.1-25.1 codifica um fator de transcrição que também participa na transformação das gônadas bipotenciais em testículos de embriões de sexo genético masculino e regula a expressão do HAM (42).

É também um gene ativador do gene do colágeno tipo II, essencial na formação da matriz extracelular da cartilagem; portanto os defeitos nesse gene levam a reversão sexual em pacientes 46,XY associado a malformações esqueléticas como displasia camptomélica, distúrbio dominante letal caracterizado por anormalidades congênitas dos ossos longos, pálato fendido, ausência do bulbo olfatório, malformação cardíaca e renal, pulmões hipoplásicos, caixa torácica estreita e atraso da idade óssea, sendo o óbito desses pacientes geralmente de causa respiratória. A avaliação dos pacientes com displasia camptomélica mostrou que mais de 75% eram XY com disgenesia testicular e sexo reverso (43,44). Esse gene autossômico da superfamília de proteínas HMG box tem se tornado um forte candidato para gene alvo do SRY.

A proteína SOX9 parece permanecer no citoplasma das pregas genitais de ambos os sexos. Após o SRY alcançar seu limiar de ação, o SOX9 é expresso na gônada XY sendo fosforilado, migrando para o núcleo onde alcança seu limiar de ação expressando o FGF9, mantendo-o ativo enquanto o FGF9 mantém o SOX9 ativo, direcionando a gônada rapidamente para sexo masculino.

Arango et al.,1999 mostraram que SOX9 juntamente com SF1 regulam a expressão gênica do HAM. Enquanto o SOX9 modula o início de transcrição do HAM o SF1 modula seu nível de transcrição (45). Estudos In vitro sugerem que o SOX9 é responsável pela manutenção mas não pelo início da expressão do SF1 nas células de Sertoli.

Além desses dois genes autossômicos SF-1 e WT-1, há outros genes envolvidos na formação da prega genital, como LHX1 (*Lim homeobox gene1*) localizado no 11p12-p13, envolvido na diferenciação e desenvolvimento de estruturas neurais e urogenital e LHX9 (1q31-q32) que participa da ativação do SF-1 na gônada bipotencial (46). O EMX2 localizado no 10q26.1 é expresso nos componentes epiteliais do sistema urogenital, rins e gônadas. Em camundongos mutados o espessamento do epitélio celômico para abrigar as células germinativas primordiais foi insuficiente, alterando o desenvolvimento gonadal (47).

O PAX2 (*paired box gene 2*) localizado no 10q24.3-q25.1 é um regulador transcricional da família “paired-box”, sendo largamente expresso durante o desenvolvimento de ambos os componentes do sistema urogenital: ductal e mesenquimal. Em mutação homozigótica não são formados os rins, ureteres e trato genital. Os ductos de Wolff e Müller, precursores do trato genital masculino e feminino, apresentam desenvolvimento parcial e degeneram durante a embriogênese, mostrando que esse gene é necessário para os múltiplos passos durante a diferenciação do mesoderma intermediário (48).

A expressão do PAX2 foi encontrada em pacientes com associação CHARGE, sendo proposto gene candidato para essa associação. Porém mais estudos foram realizados em pacientes com tal associação e não se conseguiu estabelecer essa correlação(49). A associação CHARGE (SC) foi descrita em 1979 por Hall et al. em pacientes com anomalias congênitas com atresia de coana (50). Posteriormente, em 1981, Pagon RA et al. propuseram o acrônimo CHARGE para descrever este conjunto de achados que consiste em: **C**oloboma de Íris ou retina; **H** cardiopatia congênita (**H**earth); **A**tresia de coanas; **R**etardo do crescimento e desenvolvimento; **G** Anomalias **G**enitais; **E** anomalias de pavilhão auricular e/ou surdez (**E**ar). A maioria dos casos de SC são esporádicos, geralmente não herdados. O risco de recorrência para familiares com um filho com SC está em torno de 1 a 2%. Acredita-se que muitos dos achados da SC derivem de anormalidades ocorridas na morfogênese entre o 35° e 45° dias de gestação (51). O diagnóstico é feito com duas ou mais anomalias incluídas no acrônimo:

- Coloboma: Varia desde coloboma isolado da íris, uni ou bilateral, sem o comprometimento de visão até anoftalmia, sendo o coloboma de retina e nervo óptico mais freqüente.
- Malformações cardíacas: incluem o PCA, CIA, Tetralogia de Fallot, dupla via de saída do VD, canal AVC e dextroposição da aorta (52).
- Atresia de Coanas, uni ou bilateral, mais freqüente `a esquerda (50). Pode ser membranosa e em alguns casos há obstrução óssea da coana posterior. Dependendo da extensão da mesma os sintomas variam desde respiração ruidosa, rinorréia, apneia e cianose.

- Retardo do crescimento e desenvolvimento: 80% dos pacientes têm crescimento estatural abaixo do percentil 2,5. O retardo mental está presente em 94% dos pacientes e varia de leve a grave. O comprometimento da visão e audição prejudica ainda mais as funções cognitivas do paciente.
- Anomalias genitais: 75 a 100% dos casos apresentam micropênis e criptorquidia (50).
- Anomalias do pavilhão auricular: variam desde pavilhão pequeno a orelhas em cálice ou pêndulo, podendo ou não estar associado a surdez condutiva e /ou neurosensorial grave (50).

Outras malformações como microcefalia, ptose palpebral, micrognatia com seqüência de Pierre-Robin, lábio leporino, malformações de costelas e renal, incompetência de faringe e do véu do palato levando à dificuldade de sucção (53). Análise com hibridização *in situ* do gene CHD7 durante o desenvolvimento humano precoce mostrou uma boa correlação entre expressão padrão do CHD7 e o desenvolvimento de anomalias observadas na SC (54). Outro estudo encontrou pequena microdeleção do cromossomo 8q12 em dois pacientes com SC. Dentro dessa região o gene CHD7 foi identificado e seqüenciado em 17 pacientes. Muitas mutações encontradas são proteínas truncadas prematuramente (55).

Outro gene envolvido na formação das pregas genitais é o M33 (CBX2) (*chromobox homolog gene 2*), localizado no 17q25. Defeitos no desenvolvimento gonadal aparecem próximos à expressão do Sry sugerindo que esse gene interfere com passos *upstream* Sry. Camundongos

mutados morrem antes do desmame e os sobreviventes apresentam sexo reverso M $\rightarrow$ F (56).

ATRX (XH2), *Helicase 2 X-Linked*, localizado no Xq13 possui 3 éxons, codificado por três dedos de zinco é outro gene envolvido na formação das pregas genitais. Mutações no gene ATRX causam grave retardo mental, α talassemia e anormalidades gonadal e urogenital, que vão desde micropênis à genitália ambígua em pacientes XY, principalmente quando a mutação ocorre nos dois últimos éxons do gene. Comporta-se como proteína remodeladora de cromatina (57).

Os *Insulin receptor (Ir)*, *Insulin growth factor receptor (Igfr1)* e *Insulin receptor-related receptor* pertencem à família tirosina kinase necessários para diferenciação sexual masculina. Camundongos xy mutados para esses três receptores desenvolvem ovários e fenótipo completamente feminino (58).

O gene DMRT1, também participa da formação das pregas genitais, é mapeado sobre o 9p também está envolvido na determinação testicular em humanos, pois sua inativação evolui com disfunção gonadal (59). Em vertebrados como aves, reptéis é expresso precocemente na prega genital.

1.2 Diferenciação sexual a partir da determinação testicular

Inicialmente grupos de células gonadais se separam em dois compartimentos. A interação entre a diferenciação das células mióides peritubulares e Sertoli resultam na formação dos cordões testiculares que são

rodeados pela membrana basal que circunda as células germinativas (60), enquanto as células mesenquimais, matriz e vasos sanguíneos preenchem os espaços intersticiais nos quais ficarão as células de Leydig. As células endoteliais contribuem para caracterização vascular dos testículos necessárias para eficiente exportação da testosterona (61). A formação dos cordões testiculares é o primeiro sinal da diferenciação testicular, seguido pelas células primitivas de Sertoli e pela expressão do hormônio antiMülleriano (HAM) e Desert Hedgehog (DHH) (62). Ao redor da gônada uma camada da membrana basal abaixo do epitélio celômico se espessa para formar a túnica albugínea. O interstício com células de Leydig que deriva do epitélio celômico e das células mesenquimais de origem mesonéfrica produz o mais importante andrógeno do sexo masculino, a testosterona, que tem importante papel na estabilização dos ductos de Wolff, na masculinização da genitália externa e na produção do *insulin-like growth factor 3* (INSL3), o fator de crescimento responsável pela fase transabdominal da descida testicular (63). A diferenciação e proliferação das células de Leydig dependem do hCG placentário no primeiro e segundo trimestre de vida fetal e após, do LH pituitário. Depois do nascimento essas células desaparecem do tecido intersticial testicular até a puberdade (64). A proliferação de células somáticas parece ser crítica para a diferenciação testicular. O FGF9 (fibroblast growth factor 9) que age *downstream* SRY está envolvido em dois eventos: indução da proliferação de células de Sertoli e no estabelecimento do seu destino (65). O FGF9 e WNT4 (Wingless-related MMTV integration) agem como sinais antagônicos na precoce diferenciação

gonadal. Assim que o SRY é expresso e alcança seu limiar de ação ele dá início à expressão do SOX9. O equilíbrio entre FGF9 e WNT4 é rompido quando o SOX9 aumenta a expressão do FGF9 que, por sua vez, mantém alta a expressão do SOX9 resultando numa troca de ação que acelera o caminho masculino. A expressão do WNT4 é inibida quando o FGF9 alcança seu limiar de ação (66). O DHH, proteína secretada pelas células de Sertoli imediatamente após a determinação testicular e seu receptor Patched 2 expresso nas células germinativas, peritubulares e intersticiais do testículo também participam da diferenciação gonadal, pois mutação homozigótica do DHH em pacientes 46,XY estão associadas com disgenesia gonadal (67).

No sexo masculino, o HAM, produzido pelas células de Sertoli a partir de 7,5 semanas de vida intra-uterina é responsável pela regressão dos ductos de Müller, porém, precisa ser expresso antes que esses ductos percam sua sensibilidade a este hormônio, ou seja, antes do final do oitava semana; após isso, os ductos de Müller tornam-se insensíveis ao HAM (68). O HAM age impedindo o desenvolvimento de trompas, útero e terço proximal da vagina em um processo de apoptose. Acredita-se que seu promotor seja ativado pela interação entre SF-1 e WT1 (69), que o SF1, WT-1 e GATA 4 aumentam sua transcrição (70), enquanto o DAX1 a diminui (71) e que a ligação do SOX9 ao promotor do HAM é essencial para o início da sua expressão no desenvolvimento fetal precoce (45). É mapeado no 19p13.3 e é uma das primeiras proteínas expressas pela gônada assim que tem início a formação dos cordões testiculares na gônada fetal (72).

Sua expressão se mantém elevada até a puberdade, exceto por uma transitória diminuição no período perinatal. Durante o desenvolvimento puberal os resíduos de expressão do HAM coincidem com aumento dos andrógenos produzidos pelas células de Leydig e com início da meiose das células germinativas (73,74). A diminuição da produção do HAM pelas células de Sertoli pode ser observada entre os estágios II e III do desenvolvimento puberal (74) coincidindo com aumento intratesticular da testosterona, inibindo a produção de HAM na puberdade. Devido a falta de expressão do receptor androgênico nas células de Sertoli, o HAM não é diminuído pela testosterona durante a vida fetal e nos primeiros meses após nascimento (75) explicando essa transitória coexistência nas altas concentrações do HAM e andrógenos.

O primeiro sinal da diferenciação do trato genital é a regressão dos ductos de Müller, sendo seguido pela estabilização e diferenciação dos ductos de Wolff. A conexão entre os túbulos mesonéfricos e primórdio gonadal é permanentemente estabelecida na sexta semana originando no sexo masculino a *rete testis*. O epidídimo se forma por volta da 9ª a 13ª semana de vida seguido pelos vasos deferentes, que se abrem dentro do seio urogenital ao nível do tubérculo Mülleriano. A vesícula seminal tem origem na dilatação da porção terminal dos vasos deferentes na 12ª semana de gestação (76). Ainda por volta da 12ª semana os testículos começam a migrar da sua posição pararenal para o escroto. Os testículos são seguros pelos ligamentos: suspensório craniano (LSC) próximo ao rim e pelo gubernaculum testicular que conecta o polo inferior do testículo com a cauda

do epidídimo no escroto. É um processo complexo que tem sido dividido em duas fases, sendo a primeira marcada pelos eventos: os movimentos transabdominais trazem os testículos para baixo próximo ao anel inguinal interno; andrógenos agem provocando dissolução do LSC enquanto o *insulin like factor 3* (INSL3) medeia a proliferação do gubernaculum trazendo o testículo para o orifício interno do canal inguinal (77). A migração ínguino-escrotal consiste na passagem dos testículos através do canal inguinal para dentro do escroto e está sob a dependência dos andrógenos. O gubernaculum sofre protuberância além do anel inguinal externo formando um divertículo peritoneal, chamado processo *vaginalis*, puxando o testículo para dentro da bolsa escrotal. Essa segunda fase, inguinoescrotal, ocorre entre 27 e 30ª semanas de vida intra-útero (78).

O INSL3 é membro da família Relaxin-like Factor (RLF). É um peptídeo produzido como um pré pro hormônio, composto de cadeias A e B conectadas por um peptídeo C. Semelhante a testosterona, o INSL3 é produzido pelas células de Leydig dos testículos durante a vida fetal e adulta e é considerado um marcador da função e diferenciação dessas mesmas células (79). Sua expressão é alta nos testículos fetal, diminui após o nascimento e aumentam novamente na puberdade (80). Nos adultos parece ter uma ação endócrina e parácrina ainda não identificada, porém sua deficiência pode representar um importante sinal de hipogonadismo. (79)

O papel do INSL3 na descida testicular tem origem na sua alta concentração no sangue do cordão até os três meses de idade. Essa mesma concentração está baixa no sangue do cordão de pacientes criptorquídicos.

É produzido através do desenvolvimento testicular sob a influência da gonadotrofina coriônica humana (hCG) materna e/ou LH fetal para controlar a primeira fase da descida testicular. Aumenta precocemente após o nascimento, presumivelmente estimulado pelo pico LH transitório neonatal (81), diminui até puberdade, sendo novamente produzido sob a influência da secreção do LH típica do desenvolvimento puberal (82). Sua concentração se mantém até a vida adulta por mecanismos não claros (83) e finalmente se reduz com a idade (84).

Se houver falha nesse processo de descida testicular através do canal inguinal teremos a criptorquidia que pode ser manifestada por testículo ectópico, que após sua passagem através do anel inguinal externo o testículo aloja-se superficialmente sendo palpado com facilidade na parede abdominal, na porção superior da coxa ou períneo; retrátil, posicionado dentro do escroto e que esporadicamente deixa o escroto ou ainda criptorquídico, quando há interrupção da progressão dentro do trajeto normal a partir de sua posição original, localizando-se em qualquer local do trajeto: segmento intra-abdominal, fossa ilíaca ou conduto inguinal.

Várias causas (mecânica, genética, hormonal ou inerentes ao próprio testículo) podem provocar o fracasso na descida testicular. A incidência da criptorquidia está por volta de 10% ao nascimento, diminuindo para 1,7% até o primeiro ano de vida. Cerca de 50% dos casos de criptorquidia ocorrem no lado direito, 30% no esquerdo e 20% bilateral (85).

Sabe-se que o risco de câncer testicular em pacientes criptorquídicos é de 4 a 10 vezes maior que na população geral e o seminoma é o câncer

mais freqüente. A orquípexia não diminui o risco do câncer mas facilita sua detecção mais precocemente devido à palpação testicular. Um em cinco tumores testiculares tem origem no contralateral ao criptorquídico sugerindo que há uma anormalidade primária nos testículos criptorquídicos (86).

A próstata é formada pelo seio urogenital regredindo o desenvolvimento vaginal por volta da 10ª semana. A maturação da glândula prostática é acompanhada pelo desenvolvimento do utrículo prostático. O cordão do seio utricular circunda dentro da glândula prostática canalizando-a por volta da 18ª semanas de gestação, formando o utrículo prostático equivalente masculino da vagina (87). A masculinização da genitália externa começa com aumento da distância ano – genital (88), fusão das pregas lábio escrotal e formação do falo.

As anormalidades na formação ou remodelação das suturas no pênis podem explicar os casos de hipospádia. O processo de invaginação das células ectodérmicas da ponta do pênis não depende de estímulo hormonal. Portanto, a ocorrência esporádica de hipospádia pode ser independente de distúrbio da produção, ação e conversão da testosterona. Estudos sobre número de receptores androgênicos em pacientes portadores de hipospádia detectaram diminuição desses receptores, sugerindo que essa deficiência parcial poderia ser uma causa de hipospádia. O gene CXorf6 (MAMLD1) “*mastermind-like domain containing 1*” (Chromosome X open reading frame 6) tem sido envolvido no desenvolvimento da genitália masculina devido à sua provável interação com SF1 no testículo fetal e com a produção de testosterona. Sua mutação tem sido encontrada em pacientes com ADS, 46,

XY com micropênis e hipospádia. A hipospádia, segundo Maki et al., 2008 seria um fenótipo causado pela redução, mas não ausência dos efeitos da testosterona durante o período crítico do desenvolvimento sexual (89).

Hipospádia é uma das mais freqüentes malformações da genitália masculina. Sua incidência é de um em cada 300 lactentes masculinos. Resulta de anormalidades no fechamento do pênis e uretra por volta da oitava à 14ª semana gestacional. Parece ser consequência de vários mecanismos incluindo fatores genéticos e ambientais. Tem sido sugerido que a exposição materna à progesterona e derivados de testosterona no início da gravidez pode aumentar o risco de hipospádia pela interferência com a produção ou ação de andrógenos fetais que são críticos para fechamento normal de uretra. Hipospádia é uma forma de ADS 46,XY e, embora muitos pacientes apresentem fertilidade e masculinização na puberdade, a função testicular deve ser avaliada para excluir defeitos na síntese ou ação da testosterona (90).

A organogênese uretral está completa por volta da 14ª semana de gestação e não há diferença no tamanho do pênis ou clitóris antes disso (91). Durante a vida intra-uterina as células de Leydig são estimuladas pelo hCG placentário e somente após a 14ª semana gestacional é que o LH secretado pela hipófise fetal começa a influenciar a produção de testosterona, garantindo o crescimento peniano. O maior crescimento fálico ocorre durante o terceiro trimestre de gestação e o micropênis é o sinal da deficiência congênita de gonadotrofinas.

O pênis medido desde a base e esticado em linha reta deve estar abaixo de 2,5 DP da média para ser considerado micropênis. A etiologia do micropênis está relacionada à atividade anormal do eixo hipotálamo-hipófise-testículos.

Para que ocorra a virilização da genitália externa alguns passos são básicos: síntese de testosterona pelo testículo fetal e estimulação adequada da produção hormonal que, nessa fase da embriogênese depende da hCG de origem placentária; redução de testosterona a diidrotestosterona pela 5 α redutase tipo 2 existente no próprio tecido genital (falo e seio urogenital), córtex cerebral, fígado, próstata e finalmente, a presença e função adequada de receptores intracelulares nas células-alvo (92).

1.3 Aspectos morfológicos do testículo – As disgenesias gonadais

Os testículos são estruturas dinâmicas desde o nascimento até a puberdade de forma que todos os seus componentes sofrem ondas de proliferação e diferenciação antecedendo a puberdade. Há três fases na proliferação das células germinativas que ocorrem nos períodos: neonatal, infância e puberdade, sendo que a última completa a espermatogênese. Há também três ondas de proliferação das células de Leydig: fetal, neonatal e puberal, sendo que a última corresponde à proliferação das células germinativas (93).

Os testículos do recém nascido apresentam-se cobertos por uma fina túnica albugínea da qual se originam septos intratesticulares, que os divide em lóbulos contendo túbulos seminíferos e o interstício testicular. Os túbulos seminíferos têm um diâmetro que varia de 60 a 65 μm e são preenchidos com células de Sertoli e germinativas sem lúmen aparente. As células de Sertoli são as mais abundantes com 26 a 28 células por corte de túbulo, formando um epitélio pseudoestratificado. Junções semelhantes à desmosomos aparecem entre as células de Sertoli e as germinativas (94).

Dois tipos de células germinativas estão presentes ao nascimento: os gonócitos e as espermatogônias. Gonócitos geralmente se localizam no centro dos túbulos com núcleo volumoso e nucléolo central largo. As espermatogônias localizam-se principalmente na lâmina basal com núcleo pequeno e menos citoplasma que gonócitos, os nucléolos são periféricos e muito pequenos (95). O interstício testicular contém células de Leydig fetal que lembram células de adulto sem os cristalóides de Reinke. As células germinativas do testículo adulto contêm espermatogônia, espermatócito primário e secundário e espermatídes. A transformação de espermatíde em espermatozóide é chamada de espermiogênese, durante esse processo o citoplasma da espermatíde desenvolve o acrossoma e flagelo; a mitocôndria se aglomera ao redor da primeira porção da cauda do espermatozóide e o restante do citoplasma é fagocitado pelas células de Sertoli. O desenvolvimento das espermatídes é dividido em quatro estágios: golgi, cap, acrossomo e maturação (96).

A primeira onda de desenvolvimento testicular que ocorre durante o período neonatal envolvendo as células germinativas e Leydig; é causada pelo aumento do hormônio folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) durante os três meses pós-natal. O hormônio luteinizante estimula as células de Leydig a produzir testosterona que por sua vez estimula a transformação dos gonócitos a espermatogônia (97). Dos seis meses a aproximadamente metade do terceiro ano de vida os testículos permanecem nesse primeiro período que termina com a proliferação das células germinativas (segunda onda). O número de espermatogônias aumenta, não há elevação do FSH ou LH entre seis meses e dez anos de idade. Por volta do terceiro ano de vida muitas células de Leydig degeneram. Nessa idade os níveis de testosterona são iguais em ambos os sexos e a maior parte dos andrógenos tem origem adrenal (98).

Aos nove anos de idade a terceira e definitiva onda de espermatogênese tem início coincidindo com um aumento do LH. Esse aumento induz os fibroblastos precursores das células de Leydig a se diferenciarem em células de Leydig maduras (99). As células de Leydig secretam andrógenos que com o aumento do FSH vão amadurecer as células de Sertoli, desenvolver as células germinativas e o lúmen tubular aumentando o tamanho dos testículos por volta dos 11 a 12 anos de idade. Também secretam a ocitocina que age sobre os miofibroblastos estimulando a contração dos túbulos seminíferos (100).

A média de peso dos testículos adultos é de 21,6 g $\pm$ 0,4 g o direito e 20,4 g. $\pm$ 0,4 g o esquerdo (101).

Os túbulos seminíferos adultos têm 180 a 200 μm de diâmetro. São muito enrolados e firmemente compactados dentro dos lóbulos (102). Entre os túbulos seminíferos está o interstício com células de Leydig, macrófagos, vasos sanguíneos, linfáticos e nervos e contém 25% a 40% do volume testicular (103).

A “rete testis” é uma rede de canais e cavidades que conectam os túbulos seminíferos com os ductos eferentes. As funções da “rete testis” são amortecimento das diferentes pressões entre túbulos seminíferos e ductos eferentes, reabsorção das proteínas do fluido tubular e ocasionalmente fagocitose dos espermatozóides (104).

As ADS 46,XY disgenéticas vão passo a passo alterando a formação estrutural e funcional dessa complexa estrutura que é o testículo, produzindo uma sequência de alterações que são chamadas de disgenesias testiculares.

Nas disgenesias testiculares a túnica albugínea (TA) é fina e contém escasso feixe de fibras colágenas desestruturadas. Túbulos abaixo ou acima de sua superfície assim como componentes testiculares ectópicos como células germinativas, túbulos seminíferos (isolados ou com células de Leydig) ou somente células de Leydig são considerados irregulares.

No sentido de quantificar a disgenesia gonadal a morfometria testicular tem sido cada vez mais utilizada avaliando o diâmetro tubular médio que é um indicador do desenvolvimento do epitélio seminífero, de tal forma que quando esse diâmetro tubular está normal indica que houve adequado estímulo das células de Sertoli pelo FSH. Em gônadas

disgenéticas esse diâmetro geralmente está diminuído com túbulos seminíferos hipoplásicos ou fibrosados e poucas células germinativas (105).

O Diâmetro tubular varia através da infância sendo seu menor tamanho até o quarto ano de vida, aumentando lentamente até o nono ano e rapidamente após os 15 anos. Há três níveis de gravidade na avaliação do diâmetro tubular: leve quando há menos de 10% de redução do diâmetro; marcada quando a redução está entre 10 e 30% e grave quando maior que 30% (105).

As células germinativas podem ser contadas de várias maneiras, sendo mais freqüentemente avaliadas pelo cálculo do índice de fertilidade tubular (IFT) que é a porcentagem de cortes tubulares que possuem pelo menos uma célula germinativa (105).

Nos primeiros meses de vida pós natal o testículo normal tem 68% células germinativas por túbulo. Aos três anos diminui para 50% seguido de um progressivo aumento de 100% na puberdade (105). Segundo Nistal e Paniagua, 1986 e Scolfaro et al., 2003 também no IFT existem três graus de gravidade de hipoplasia germinal: leve, quando o IFT for maior que 50%, isto é, mais de 50% dos cortes tubulares possuem pelo menos uma célula germinativa; marcada quando o IFT estiver entre 30% e 50% e grave quando menor que 30%. Geralmente casos de hipoplasia germinal estão associados à hipoplasia tubular e ocorrem devido a disgenesia tubular (105,106).

O número de células de Sertoli por túbulo varia durante a infância como resultado de lenta proliferação dessas células dos quatro até os 12 anos de idade. No recém nascido, existem em média 26 a 28 células por corte

tubular e na vida adulta em torno de 10. A biópsia testicular pode revelar hipoplasia ou hiperplasia dessas células. Quando a hiperplasia é pronunciada pode ser um sinal de disgenesia tubular sendo geralmente detectada no primeiro ano de vida e no período pré-puberal (105,106).

O cálculo do número de células de Leydig durante a infância é dificultado pela sua escassa população. Baixo número dessas células é observado nos testículos criptorquídicos, hipogonadismo hipogonadotrófico, alguns pseudohermafroditas masculinos e em fetos anencéfalos.

As ADS 46,XY disgenética são caracterizadas por alterações na diferenciação testicular com testículos disgenéticos e ambigüidade genital, acompanhadas por grande risco de transformação neoplásica dessas gônadas, exigindo diagnóstico e tratamento precoce.

Nesse sentido seqüenciamos o SRY devido às mutações nas seqüências desse gene que estão relacionadas com a disgenesia gonadal 46,XY (107); também avaliamos as microdeleções do braço longo do cromossomo Y que contém muitos genes envolvidos na fertilidade masculina e que estão associados a defeitos na espermatogênese (108) e não são detectados no cariótipo. Essas microdeleções que ocorrem na região AZF (azospermia factor) são freqüentemente encontradas em pacientes com azoospermia. A incidência dessas microdeleções varia de 3% a 55% dos pacientes com problemas de infertilidade (109). Essa região é dividida em 3 subregiões chamadas: AZFa na porção proximal; AZFb na região intermediária e AZFc na região distal (110). Sabe-se que uma microdeleção no AZFa induz a “Sertoli cell-only syndrome”; mutação no AZFb provoca

uma interrupção da meiose I e mutação no AZFc resulta em hipoespermatogênese progredindo para uma grave azoospermia ou oligozoospermia (111). Na região AZFc também se encontra o chamado “deleted in azoospermic gene” ou DAZ.

2 OBJETIVO

Proceder avaliação clínica, laboratorial, anatomopatológico, morfométrica e molecular das alterações gonadais de 10 pacientes portadores de ADS 46,XY disgenético.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Dos 400 pacientes com anomalias da diferenciação sexual que são acompanhados no Instituto da Criança os pseudohermafroditas masculinos disgenéticos (ADS 46,XY disgenéticos) estão em torno de 10%, sendo que dessa porcentagem estudamos somente dez pacientes, devido ao fato de muitos terem abandonado o tratamento após cirurgia e terapêutica, pois são de estados distantes, outros, apesar de terem recebido alta médica mudaram seu endereço tornando o contacto impossível, pois seria necessário a sua presença para coleta de sangue para avaliação molecular. Portanto, foram estudados 10 pacientes do ambulatório de Endocrinologia do Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da USP no período de 1983 até 2007.

Todos os pacientes tiveram como motivo para primeira consulta a genitália ambígua.

O primeiro atendimento na Unidade de Endocrinologia ocorreu em idades que variaram de 15 dias a três anos.

Todos os cariótipos eram 46, XY.

Todos os pacientes apresentaram linhagem androgênica normal.

Somente um paciente apresentou na anamnese, história materna de uso de medicamentos durante a gravidez. A consangüinidade somente foi detectada em um paciente.

Os antecedentes patológicos variaram com: Associação CHARGE (um paciente) e tumor de Wilms (um paciente).

Oito pacientes permaneceram com sexo masculino e dois com sexo feminino.

Os consentimentos informados foram obtidos de todos os pacientes que participaram desse estudo. O projeto foi aprovado pela CAPPesq sob o número 1246/06.

3.2 Avaliação Clínica

Todos os pacientes foram avaliados no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP para onde foram encaminhados devido genitália ambígua. A avaliação clínica constou de exame clínico geral seguido de exame detalhado da genitália onde foi caracterizada a presença de criptorquidia, micropênis, hipospádia.

3.3 Avaliação por Imagem

Para caracterizarmos a ausência de ovários e útero foi realizada a ultrassonografia (US) pélvica. A US da região inguinal foi realizada para localização dos testículos. A US do abdômen foi realizada somente no

paciente DSFJ para comprovarmos que tumor de Wilms havia sido totalmente ressecado.

A ressonância nuclear magnética da pelve foi realizada somente no paciente IZ para confirmação dos testículos ectópicos.

3.4 Avaliação citogenética

O estudo genético consistiu na realização do cariótipo a partir de cultura de linfócitos de sangue periférico e análise de 20 metáfases através de técnica de coloração convencional e bandamento G (112).

Essa análise descartou a presença de mosaicismo ou qualquer outra aberração cromossômica. Todos os pacientes estudados apresentaram cariótipo 46,XY.

Esse estudo foi realizado na Cidade Universitária – Instituto de Biociências da Faculdade de Medicina da USP, pelas dras Célia Koijmann e Anita Wajental.

3.5 Avaliação Hormonal

A avaliação hormonal constou de toda linhagem androgênica para exclusão de alterações hormonais de origem adrenal. Todos os pacientes apresentaram essa linhagem sem alteração.

O teste de estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG) foi realizado em todos os pacientes para podermos caracterizar a resposta testicular e a detecção de eventuais defeitos de síntese de testosterona ou de sua conversão a diidrotestosterona. A dosagem de gonadotrofina coriônica humana utilizada foi de 100 UI/Kg/dia, intramuscular, cinco dias seguidos, com coleta de sangue antes do teste e 24 horas após a aplicação da última injeção. Após o estímulo, indivíduos normais apresentam aumento da concentração da testosterona de 150 ng/dl (Radioimunoensaio) em relação ao basal e relação testosterona (T)/ Diidrotestosterona (DHT) até 15ng/ml (eletroquímioimunoensaio). Valores superiores a 30 são considerados indicativos de deficiência de 5 α redutase tipo 2, enquanto valores entre 15 e 30 podem ser observados nas insensibilidades androgênicas.

A avaliação sérica do hormônio anti-mülleriano tornou-se uma opção importante na investigação da genitália ambígua com cariótipo 46,XY, além de apresentar uma estreita correlação com os valores de testosterona, porém no nosso serviço ainda não tínhamos tal exame, portanto somente em três pacientes foi possível ser realizado. A metodologia utilizada foi ELISA.

Alguns pacientes não obtiveram o resultado da DHT pois em vários momentos no nosso serviço estivemos sem condições de realiza-los.

As gonadotrofinas LH e FSH foram dosadas com método imunofluorimétrico.

3.6 Avaliação Anatomopatológica

Foram realizadas revisões de lâminas das biópsias realizadas durante as orquipexias. Essas reavaliações foram feitas no Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) pela Dra Renee Zoon Filipe. Após tais revisões foi realizado estudo morfométrico.

Para as revisões das lâminas foram utilizados microscópio da marca Weiss modelo Axiokop2 plus; as fotografias das gônadas foram feitas em campo de grande aumento no programa computador Weiss Axio VISION 3.1.

O estudo morfométrico avaliou diâmetro tubular médio, índice de fertilidade tubular (IFT) e número de células de Sertoli por corte tubular. Foram avaliados cerca de 50 túbulos seminíferos de cada secção. Nossos resultados foram comparados com dados normais para idade publicado por Nistal M & Paniagua R, et al, 1986 (105) e Scolfaro MR et al, 2003 (106).

A média do diâmetro tubular de ambos os cortes longitudinal e transversal foi medida usando um micrômetro vernier ocular calibrado com uma objetiva 40X, como descrito por Lennox et al., 1970 (102).

A redução do diâmetro foi classificada de acordo com Nistal & Paniagua em 3 graus de gravidade: Leve: redução menor que 10% em relação do diâmetro normal para a idade; Moderada: redução entre 10 a 30%; Grave quando a redução ocorre em mais de 30%, caracterizando uma hipoplasia tubular.

O número de células germinativas foi avaliado pelo Índice de Fertilidade Tubular (IFT) que segundo Nistal & Paniagua et al., 1986 seria a porcentagem de túbulos que mostram pelo menos uma célula germinativa (105).

Novamente usamos sua metodologia para classificarmos a hipoplasia germinal: Leve quando o IFT for maior que 50%; Moderada quando o IFT estiver entre 50 a 30% e Grave quando for menor que 30% (105).

O número de células de Sertoli apresenta variações, sofre lenta diminuição com o decorrer da idade. No recém nascido existe em média 26 a 28 células por corte tubular e na vida adulta em torno de 10. Entre 4 e 12 anos ocorre uma lenta proliferação destas células. Hiperplasia das células de Sertoli é um sinal bem definido de disgenesia tubular sendo geralmente detectada no primeiro ano de vida e no período pré-puberal (94).

O número de células de Leydig não foi avaliado porque esse número é baixo durante a infância, somente acusamos ou não sua presença.

3.7 Avaliação Molecular

Após a assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) os indivíduos foram encaminhados para a coleta de 4 ml de sangue periférico em tubo com EDTA, para a extração do DNA genômico

3.7.1 Protocolo para extração do DNA

Após a coleta o sangue foi encaminhado ao Laboratório de Investigação Médica em Pediatria, LIM 36 do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para extração do DNA, realizada pelo método de precipitação com sal (113).

O sangue foi homogeneizado com 35 mL de solução de Lise (155 mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃ e 1mM EDTA em pH 7,4) deixado em gelo por 30 minutos e centrifugado por 15 minutos a 1800 rpm, procedimento repetido até obtenção de “pellet” limpo. O “pellet” foi ressuspendido vigorosamente em 3 mL de solução de lise nuclear (10 mM Tris-HCL, 50 mM NaCl, 10mM EDTA em pH 8,2) ao que foram adicionados 5uL de Proteinase K (20 mg/mL) e 300uL de SDS 10% para incubação por 24 horas a 37 °C. No dia seguinte, 1 mL de NaCl 6M foi adicionado ao conjunto e agitado em vórtex até obtenção de solução leitosa que foi então centrifugada por 20 minutos a 2500 rpm para separação dos ácidos nucleicos das indesejáveis frações protéicas. O sobrenadante foi transferido para tubo cônico de 15 mL ao que foi adicionado dois volumes de etanol absoluto para precipitação do DNA (formação da medusa). O DNA precipitado foi transferido para microtubo de 1,5mL, lavado duas vezes em etanol 70% a 13.500 rpm, deixado secar e eluído com TE 10:1 (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA em pH 8,0). Após completa eluição, o DNA foi quantificado e aliquotado para uso. Alíquotas foram encaminhadas para o Instituto Pasteur, onde foi realizada pesquisa de mutação em *NR5A1/SF1*.

3.7.2 Análise das mutações em *NR5A1/SF1*: Realizado no Instituto Pasteur, Paris

Para a pesquisa de mutação nas regiões exônicas codificadoras do gene *NR5A1/SF1* foi utilizado DNA genômico em reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

cujas seqüências e temperaturas de anelamento encontram-se a seguir. As condições de amplificação foram 95°C por 5 minutos seguidos por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de cada “*primer*” (Tabela 1) por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, seguidos por um ciclo final de extensão com duração de 5 minutos 72°C. O produto da PCR foi corrido em gel de agarose 2%, posteriormente corado com brometo de etídeo e vizualizado em sistema de fotodocumentação utilizando luz ultra-violeta.

Tabela 1: Seqüência de bases e temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados na PCR para amplificação das regiões exônicas do gene *NR5A1/SF1*

Exon	Seqüência de bases	Temperatura de anelamento
1	F1: 5' - GGGCACAGAGAGGGGATTAC - 3' R1: 5' - CTGCGGGAGCTGAGAGTC- 3'	60°C
2	F2: 5'-ATTCGTACGACGAGGACCTG- 3' R2: 5' - CGAAGGCCAATGGTACTATCC- 3'	64°C
3	F3: 5'-GTGTTGAGCAGGGGAGAGAG- 3' R3: 5'- AGAGAAGGGCTCTGGGTAGC- 3'	60°C
3a	F3a: 5'-TCTGAGTACCCGGAGCCTTA-3' R3a: 5'-AAGGATGGCCCTATCCAAAG-3'.	64°C
4	F4: 5'- ATCTGGGTAGATGGGCACAG -3' R4: 5'- GTGGGGAAAGGGCTGATAAT-3'.	60°C
5	F5: 5'- TCTGACCTGCACCTCCAATC-3' R5: 5'- CTCTGGCTGTCTCCACCTCT-3'	64°C
6	F6: 5'- ATGCCCATGTCTTTGATGGT-3' R6: 5'-GGTGGGCATCAGAAAATGAA-3'	60°C

Após a amplificação as amostras foram purificadas e 200ng de DNA foram adicionados na reação de seqüenciamento automatizado utilizando o kit “Taq DyeDeoxy terminator” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com *primers* fluorescentes, de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram então submetidas a eletroforese capilar no seqüenciador ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Duas mutações foram identificadas no amplicon F3/R3 e confirmadas posteriormente por meio de análise utilizando enzimas de restrição, uma vez que a mutação c.369G>A cria um sítio de restrição para a enzima *HaeIII* e a mutação c.387C>T elimina o sítio de restrição da enzima *BanI*.

Uma terceira mutação foi identificada no éxon 6 e consiste na transição de uma citosina por uma adenina, alterando o codon 404 de TAC, que codifica uma tirosina (Y) para TAA, resultando em um codon de terminação (X).

3.7.3 Estudos funcionais da atividade de *NR5A1/SF1*: Realizado no Instituto Pasteur, Paris

Ensaio para a análise da expressão gênica de *NR5A1/Sf1* foram realizados em placa de 96 poços com células tsa201 de rim de embrião humano, lipofectamine 2000 (Invitrogen) em ensaio utilizando sistema duplo com a Luciferase como repórter (Dual-Luciferase reporter assay system; Promega) e expressão de luciferase pRLSV40 *Renilla* (Promega) como marcador de eficiência da transfecção. Os vetores de expressão pCMXWT

ou o mutante NR5A1/SF1 foram co-transfectados (2ng/poço) nas células tsa201 juntamente com os repórteres contendo elementos responsivos mínimos do promotor do gene SF1(murine *Cyp11a1*, rat *Cyp19a1*) (100ng/poço). Após 24 horas as células foram lisadas e ensaio para luciferase foi realizado (Dual Luciferase Reporter Assay system, Promega) utilizando o leitor de fluorescência de placas Fluostar Optima (BMG Labtech). Todos os dados foram estandardizados com base na atividade da *Renilla*. Os resultados indicados nas figuras 2 e 3 são mostrados em média $\pm$ SEM dos 3 experimentos realizados independentemente, cada um realizado em triplicata.

3.7.4 Pesquisa de Microdeleção nas regiões AZF:Realizado no LIM 36 do Instituto da Criança.

3.7.4.1 PCR - Reação em cadeia da polimerase

Para verificar a integridade do cromossomo Y foram realizadas reações de PCR utilizando *primers* Y-específicos. A presença de banda do tamanho esperado implica na presença da região correspondente; por outro lado, quando a banda esperada está ausente a reação de PCR é repetida pelo menos mais duas vezes em condições de menor estringência, com a finalidade de comprovação da deleção.

Os pares de *primers* (todos disponíveis no *GeneBank*) foram utilizados para a identificação da presença dos genes *SRY* e *TSPY*, um par para identificação da presença do centrômero (sY78) e vários pares para

amplificação das diferentes regiões de Yq denominadas AZF ou *Azoospermic Factor*. Para AZFa, a mais proximal das regiões AZF, foi utilizado o par de *primers* sY84, para AZFb os pares sY114, sY132, sY143, para a região limítrofe entre AZFb e AZFc foram utilizados os pares sY1161 e sY1197, e para AZFc, a mais distal, os pares sY254 (cuja ausência identifica deleção total de AZFc), sY1191 e sY1291. Cada reação de PCR foi realizada em volume final de 25 uL contendo: 50ng de DNA genômico, 150mM de dNTPmix, 0,5uM de cada *primer* (direto e reverso) e 1 unidade da enzima Taq DNApolymerase. As concentrações de MgCl₂ utilizadas para cada par de *primers* estão indicadas na tabela abaixo (2) juntamente com as temperaturas de anelamento.

Figura 1: Desenho ilustrando o cromossomo Y, as regiões pela técnica de bandas G (à esquerda), e as 3 regiões AZF localizadas em Yq com os respectivos pares de *primers* utilizados no rastreamento de rotina das microdeleções

Para a identificação de deleções parciais em AZFc foram utilizados *primers* (G73166, G73168, G63908, G73167) flanqueadores de SNVs (variante de um único nucleotídeo) capazes de, por análise de restrição subsequente, identificar especificamente qual cópia de *DAZ*, em AZFc está presente ou não (114). As condições de PCR utilizadas foram: um ciclo inicial de denaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento respectivamente 1 minuto, 72°C por 1 minuto, seguidos por ciclo adicional de 5 minutos a 72 °C para extensão final dos fragmentos. O produto final do PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose a 2% posteriormente corado com brometo de etídio, visualizado no transiluminador com luz ultra-violeta (U.V.) e fotografado.

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para investigação da integridade do cromossomo Y, com suas respectivas seqüências, concentração de cloreto de magnésio (MgCl₂) e temperatura de anelamento

Primer	Seqüência	[MgCl ₂] mM	Temperatura de anelamento
SRY (sY14)	F- GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA R- GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG	1,5mM	58°C
TSPY	F- GATGTGACCATTGTTGGGAAC R- GCTGAGAACTCGCTTCTGCT	1,70mM	55°C
sY78	F- TCC TTT TCC ACA ATA GAC GTC A R- GGA AGT ATC TTC CCT TAA AAG CTA TG	1,5mM	58°C
sY84	F- AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT R- GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC	1,5mM	58°C
sY114	F- TGC ACT CAT GGA GAC AAC AG R- AAC CAG GGT TTT CAC TGA AA	2mM	56°C
sY132	F- GAG AGT CAT AAT GCC GAC GT R- TGG TCT CAG GAA GTT TTT GC	1,5mM	58°C
sY143	F- GCA GGA TGA GAA GCA GGT AG R- CCG TGT GCT GGA GAC TAT TC	1,5mM	56°C
sY1161	F- CGA CAC TTT TGG GAA GTT TCA R- TTG TGT CCA GTG GTG GCT AT	1,5mM	56°C
sY1197- G67168	F-TCA TTT GTG TCC TTC TCT TGG R- CTA AGC CAG GAA CTT GCC AC	1,5mM	60°C
sY254	F- GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA R- GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C	1,5mM	58°C
sY1191- G73809	F- CCA GAC GTT CTA CCC TTT CG R- GAG CCG AGA TCC AGT TAC CA	1,5mM	60°C
sY1291- G72340	F- TAA AAG GCA GAA CTG CCA GG R- GGG AGA AAA GTT CTG CAA CG	1,5mM	58°C
DAZ1- G73166	F- GACATCCACGTCATTAACAAACG R- GGAAGCTGCTTTGGTAGATAC	1,9mM	54°C
DAZ2- G73168	F- CTTCTCATCTTTCTTGACTT R- TTATTTATTCTCAAAAAGGTG	2,1mM	54°C
DAZ3/4- G63908	F- TGGTTAATAAAGGGAAGGTGTTTT R- TCTCCAGGACAGGAAATCC	2mM	62°C
DAZ4- G73167	F- CACAGGCACTCAGTAATCTCTC R-CAGTGTTTCACCCACCACTTCTGGGT	2mM	62°C

3.7.4.2 Análise para investigação de número de cópias no locus DAZ pela técnica de amplificação e digestão por restrição: Realizado no LIM 36 do Instituto da Criança

Após a visualização da amplificação das seqüências alvo de estudos obtidas por PCR foi utilizada a técnica da digestão por enzima de restrição. Enzimas de restrição ou endonucleases são enzimas que “cortam” a molécula de DNA através do reconhecimento de seqüências nucleotídicas específicas. Elas são altamente específicas, cada tipo de enzima reconhece e cliva apenas uma determinada seqüência de nucleotídeos, em geral constituída por 4 ou 6 pares de bases nitrogenadas.

Nesse estudo utilizamos 4 tipos diferentes de enzima, uma para cada seqüência específica de *DAZ*. Para a reação de restrição foi preparada uma solução tamponada contendo 3 unidades de enzima. Em seguida 20µl dessa solução é adicionada ao produto amplificado de PCR seguido de incubação a 37°C por 16 a 18 horas em termocicladora e 20 minutos a 65°C para inativação completa da enzima.

Logo após a incubação os tubos foram retirados, colocados em gelo, e 28 uL foram aplicados em um gel de agarose 2% para separação por eletroforese utilizando tampão TAE [1X]. Após a corrida o gel foi corado em brometo de etídio, visualizado e fotodocumentado.

Os *primers* utilizados para a diferenciação entre as cópias do gene *DAZ* foram desenhados por Fernandes et al., 2002 (114). Todos os pares de *primers* amplificam todas as cópias de *DAZ* eventualmente presentes nos

indivíduos, mas cada cópia possui uma SNV, o que torna possível sua diferenciação, isto é, cada SNV está presente em apenas uma das cópias de *DAZ* e não nas demais cópias. Assim, os autores desenharam *primers* que amplificam regiões que contém essas SNVs e, como essas SNVs criam ou eliminam sítios de reconhecimento por endonucleases específicas, após a digestão, pode-se evidenciar a presença ou ausência da cópia de *DAZ* correspondente.

Para a identificação da cópia *DAZ1* foi utilizado o par de *primers* *GeneBank-G73166* seguido de digestão pela endonuclease *Mbol* (deleção de *DAZ1* implica em ausência de banda específica de 181pb). Para a identificação da cópia *DAZ2* foi utilizado na PCR o par de *primers* *GeneBank-G73168* seguido de digestão com *AluI* (deleção de *DAZ2* evidenciada pela ausência do fragmento de 659pb). Para *DAZ4* os *primers* foram *GeneBank-G73167* seguidos de restrição com a enzima *FspI* (presença de *DAZ4* implica na presença de dois fragmentos, um de 397p.b e outro de 312pb). Na ausência de *primers* para identificação de deleções específicas de *DAZ3* foram utilizados *primers* que permitem apenas analisar os loci *DAZ3/DAZ4* conjuntamente, na medida em que não existem SNVs *DAZ3* específicos. Assim, utilizando o par de *primers* *GeneBank-G63908* seguido de digestão por *DraI* é possível evidenciar a presença ou ausência simultânea de *DAZ3/DAZ4* (presença ou ausência de fragmento de 195pb, respectivamente).

3.7.5 Sequenciamento automatizado do gene SRY: Realizado no LIM 36 do Instituto da Criança

Para o seqüenciamento do gene SRY foi realizado PCR para amplificação do gene SRY seguido de análise por eletroforese em gel de alta resolução após desnaturação (SSCP- single strand conformational polymorphism). No rastreamento foi obtido padrão eletroforético distinto para a paciente ALP que foi então, submetido a seqüenciamento automatizado utilizando a metodologia de “terminação de cadeia” (dye-terminator) ou método “dideoxi”, utilizando kit específico *Dye Terminator* (GE HealthCare, Buckinghamshire, UK) e corrido em seqüenciador capilar modelo Mega Base (GE HealthCare, Buckinghamshire, UK).

4 RESULTADOS

Os resultados dos antecedentes pessoais, avaliações clínico, hormonal, anatomopatológica dos 10 pacientes estão resumidos nas tabelas 3, 4, 5 e 6

Tabela 3: Antecedentes pessoais dos pacientes estudados

	parto	Pn/Alt	Medicamento na gravidez	consanguinidade	1º cons
MMF	nl	3/45	nega	primos 1º grau	1ano
LSSB	nl	2,5/48,5	nega	nega	15dias
WS	nl	2,5/50	nega	nega	3 anos
ALP	nl	3,6/49	nega	nega	3meses
DSFJ	ces	2,5/50	nega	nega	3meses
MAMS	ces	3/49	nega	nega	2anos
IZ	nl	2,9/42	nega	nega	5meses
OAMJr	nl	2,8/50	nega	nega	2 anos
BLS	ces	3,5/48	nega	nega	1mês
LSOS	ces	3/50	Pregnyl + clomid	nega	1mês

Parto normal = nl; Parto cesariana = ces; Pn/Alt = Peso e altura no nascimento

Tabela 4: Avaliação Clínica dos Pacientes Estudados

	Criptorquidia	micropênis	hipospádia	Síndromes/Dçs	Genitália
MMF	+ a D	+	penoescrotal	Não há	masculina
LSSB	+ a E	+	Uretra tópica	Não há	Bolsa lábio escrotal
WS	+ bilateral	normal	penoescrotal	Não há	Inversão falo bolsa
ALP	+ bilateral	+	Uretra tópica	Não há	Bolsa lábio escrotal
DSFJ	+ bilateral	normal	penoescrotal	Tu Wilms	Bolsa escrotal rasa
MAMS	+ a E	+	Uretra tópica	Não há	masculina
IZ	+ bilateral	normal	Uretra tópica	Não há	masculina
OAMJr	+ bilateral	normal	distal	Não há	masculina
BLS	+ E	+	Uretra tópica	Assoc Charge/PCA/CIV	masculina
LSOS	+ bilateral	+	Uretra tópica	Não há	Bolsa lábio escrotal

Tabela 5: Avaliação Hormonal dos Pacientes Estudados

	T (Pré hCG) ng/dl	T/DHT (Pós hCG)	HAMng/ml	LHUI/L//FSH
MMF	13	64/ não realizado	Não realizado	<0,6/1,3
LSSB	12	76/12	não realizado	<0,2/5,0
WS	25	125/12,2	2,4	<0,6/1,0
ALP	9,4	25/ não realizado	não realizado	<0,3/3,0
DSFJ	26	31/4,7	não realizado	<0,8/8,0
MAMS	<14	68/ não realizado	não realizado	<0,6/4,0
IZ	32,5	76,5/não realizado	não realizado	<0,5/5,0
OAMJr	14	84/ não realizado	4,18	0,6/4,0
BLS	<10	117/30,2	3,5	<0,4/1,0
LSOS	<10	31/ não realizado	não realizado	<0,2/4,0

T = Testosterona: ng/dl; DHT = Dihidrotestosterona; HAM = Hormônio Anti-Mülleriano: ng/ml
 LH = Hormônio Luteinizante UI/L; FSH = Hormônio Folículo Estimulante: UI/L

Tabela 6: Avaliação Anatomopatológica e Estudo Morfométrico dos pacientes estudados

	MB	A	T	L	G	Gravidade da hipoplasia tubular	IFT	sertoli
MMF	+	AP	SI	-	-	Moderada		30
LSSB	-	AE	SI	-	-	Moderada	-	hiperplasiada
WS	-	AE	CI	+	+	Grave	leve↓	25,8
ALP	-	AP	SI	-	-	Grave	-	-
DSFJ	+	AP	CI	-	+	Grave	leve↓	29
MAMS	-	AE	SI	+	+	Grave	Mod↓	20
IZ	-	AE	CI	+	+	Grave	leve↓	20
OAMJr	+	AP	SI	-	-	Grave	-	22,2
BLS	+	AE	SI	+	+	Grave	leve↓	18
LSOS	-	AE	SL	+	+	Grave	mod↓	25

Resquícios Müllerianos: WS = tuba uterina + tec conjuntivo fibroso; DSFJ = restos Müllerianos retrovesical

MB = membrana basal: espessada (+) ou não espessada (-)

A = Albugínea; AP = Albugínea preservada; AE = Albugínea espessada

T = Túbulos: 1- com luz: 2- sem luz:

L = Células de Leydig: (+) presente; (-) ausentes

G = Células germinativas: (+) presentes (-) ausentes

DTM = Diâmetro tubular médio

TFI = Índice de fertilidade tubular

S = Células de Sertoli

4.1 Resultados Moleculares

4.1.1 Resultados das mutações no gene NR5A1/SF1

Estudo de mutações no gene NR5A1/SF1 revelou no paciente WS, duas mutações próximas em heterozigose c.369G>C (p.Gly123Ala) e c.387C>T (p.Pro129Leu) ambas no domínio hinge (ponto crítico: onde há articulação de dois domínios, e portanto, deve estar envolvido na mobilidade da proteína e conseqüentemente em seu encaixe no DNA para exercer sua função) da proteína. Diferenças quantitativas na transativação dos promotores mínimos tanto de *Cyp11a1* (P450scc) quanto de *Cyp19a1* (aromatase) foram observadas para cada uma das mutações na proteína NR5A1/SF1 estudadas no ensaio de expressão gênica utilizando células tsa201 de rim de embrião humano. Para ambos os promotores a mutação p.Pro129 Leu resultou em perda grave de sua capacidade de ativação, enquanto a mutação p.Gly123Ala apresentou atividade semelhante à da proteína selvagem (Figura 2 abaixo). Os achados sugerem que a variante p.Pro129Leu é patológica.

Outra mutação no paciente MMF implicou na troca do códon TAC (tirosina) na posição 404 da proteína SF1 por um códon TAA, que é um stop códon, produzindo portanto, uma proteína truncada de somente 404 aminoácidos. (ptyr404stop) ou Y404X, com ausência dos 57 aminoácidos N terminais de NR5A1. (Figura 3)

Figura 2: Mutação do SF1: (paciente WS) duas mutações próximas em heterozigose (c.369G>C (p.Gly123Ala) e c.387C>T (p.Pro129Leu) ambas no domínio *hinge*.

Figura 3: Mutação do SF1: (paciente MMF) troca do códon TAC (tirosina) na posição 404 da proteína SF1 por um códon TAA, que é um stop códon, produzindo portanto, uma proteína truncada de somente 404 aminoácidos (ptyr404stop) ou Y404X.

4.1.2 Resultados da Pesquisa da Microdeleção do Cromossomo Y

AZFa e c: Não foi visualizado microdeleção de AZF a e c.

AZFb: três pacientes: ALP; MAMS; IZ apresentaram microdeleção de AZFb

DAZ 2: Sítio de reconhecimento da enzima AluI

Figura 4: Gel de agarose 2% representando análise por restrição para *DAZ 2* com a enzima AluI. Amostras sem a banda superior como dos pacientes ALP, MAMS e IZ, representam deleção da cópia *DAZ2*.

4.1.3 Seqüenciamento do SRY

Não obtivemos alterações.

5 DISCUSSÃO

As anomalias da diferenciação sexual 46,XY são um grupo de doenças de complicado diagnóstico diferencial e etiológico, resultando numa dificuldade constante de opção pelo melhor tratamento, principalmente em relação ao sexo, já que um dos fatores considerados nessa decisão é o grau de anormalidade da genitália.

As dificuldades para chegarmos ao diagnóstico etiológico são muitas. Além de um grande desconhecimento sobre a origem dessas doenças, porque partimos de erros que geralmente ocorreram precocemente no desenvolvimento sexual muitas vezes em gônada bipotencial, a nomenclatura ainda é confusa e a caracterização clínica acaba sendo repetitiva em cada paciente, ou seja, apresentam criptorquidia, micropênis ou hipospádia em combinações variadas. A biologia molecular tem se mostrado uma grande aliada nessas investigações, pois aponta alterações gênicas que o cariótipo mesmo com um grande número de células não consegue detectar.

Adicione-se a todas essas dificuldades e incertezas os riscos de transformação neoplásica a que a gônada disgenética está exposta. Esses tumores freqüentemente são calcificados e bilaterais em cerca de 1/3 dos casos. Podem ter início num “streak” ou num testículo disgenético. Na metade dos casos de gonadoblastoma (tumor misto de células germinativas e de células imaturas de cordões sexuais do estroma, com características de

benignidade) as células germinativas se infiltram no estroma para formar um seminoma ou disgerminoma com alto potencial de malignidade. Em cerca de 8% dos casos o tumor de saco vitelínico, altamente maligno, carcinoma embrionário, coriocarcinoma, ou teratoma estão associados ao gonadoblastoma, na mesma gônada ou na contralateral e já podem ser encontrados antes da puberdade (115).

No camundongo, por volta dos 10,5 dias pós coito (dpc) a população de células germinativas que migra para as pregas genitais começa a se dividir em dois grupos: as mais próximas das pregas genitais continuam a se mover em sua direção, enquanto as mais próximas da linha média rapidamente se fragmentam e desaparecem (116) sugerindo que somente as células germinativas que estiverem mais próximas das pregas genitais conseguirão alcançá-las.

Há um mecanismo para remoção dessas células da linha média, que começa por volta de 10,5 dpc e termina com a eliminação de muitas ou todas as células aos 12,5dpc. A remoção dessas células germinativas é extremamente importante, pois os tumores de células germinativas extragonadais são comuns em crianças e quase sempre são formados na linha média (117). Pensa-se que esses tumores tenham origem nessas células germinativas que escaparam dessa remoção ((118).

Transformações neoplásicas de células germinativas em gônadas disgenéticas (gonadoblastomas ou tumores de células germinativas invasivas) ocorrem em 20 a 30% e estão associadas à presença do cromossomo Y ou parte dele. A presença de uma parte do Y já bem definida,

conhecida por “locus do gonadoblastoma no Y (GBY) é pré-requisito para a transformação maligna. Dentre os genes localizados sobre essa região estão o “testis-specific protein Y” (TSPY) que parece ser o gene candidato mais significativo para o processo de promoção tumoral (119).

O TSPY está envolvido na proliferação e diferenciação das células germinativas, estimulação da síntese protéica, ligação a ciclinas tipo B, aumentando sua atividade de quinase dependente de ciclina (CDK1). Em gônadas disgenéticas, o TSPY rompe a evolução do ciclo celular normal predispondo as células hospedeiras a tumorigênese. O aumento das suas concentrações tem sido observado em gonadoblastoma, tumor de células germinativas testiculares, melanoma, tumor de próstata e fígado (120).

A biópsia testicular há longo tempo comporta-se como grande aliada nos estudos das ADS apontando informações essenciais para identificar, classificar e detectar precocemente essas neoplasias. Atualmente, estudos imunohistoquímicos e pesquisa de marcadores tumorais têm acrescentado informações aos estudos histopatológicos. Por outro lado, o estudo da morfometria testicular tem sido considerado muito importante possibilitando a visualização de alterações no diâmetro tubular que se constituem num indicador do estado trófico do túbulo seminífero. Antes da puberdade, os túbulos não têm lúmen, sendo que o diâmetro depende exclusivamente do número e trofismo das células de Sertoli, portanto, um diâmetro tubular normal indica adequada estimulação dessas células pelo FSH. A mais freqüente alteração histológica testicular durante a infância é a diminuição do diâmetro tubular resultando num tamanho diminuído do testículo, que pode

ser resultado de várias doenças como, hipogonadismo hipo ou hipergonadotrófico, criptorquidia e ectopia testicular.

A biópsia gonadal também permite avaliar o número de células germinativas que normalmente varia durante a infância, possibilitando estabelecer o índice de fertilidade tubular (IFT) que é definido como a porcentagem de túbulos que mostram pelo menos uma célula germinativa. Marcada e grave hipoplasia germinal estão associadas com grave hipoplasia tubular e, em muitos casos, resultam em disgenesia tubular.

5.1 Pacientes WS e MMF

Após o estudo desses 10 pacientes com genitália ambígua e cariótipo 46,XY encontramos três mutações no gene do fator esteroidogênico 1 (NR5A1/SF1): o paciente WS apresentou duas das mutações, ambas muito próximas, no espaço “hinge” da proteína, considerado essencial para mediar a ativação transcricional (121). Uma dessas mutações (p.Pro129Leu) foi considerada patológica, portanto, a responsável por todas as malformações da genitália desse paciente que constou de criptorquidia bilateral, hipospádia penoescrotal, inversão falo-bolsa e pênis de tamanho normal. Após estímulo com hCG a concentração de testosterona foi sub-normal (125 ng/ml) e o HAM apresentou baixa concentração (2,4ng/mL). Células germinativas e células de Sertoli estavam presentes porém, o IFT estava levemente diminuído e DTM apresentava grave hipoplasia tubular. Este paciente

também apresentou resquícios Müllerianos com tuba uterina e tecido conjuntivo fibroso. A segunda mutação (p.Gly123Ala) não foi considerada patológica.

Com este quadro clínico evidencia-se a importância da correta expressão do SF1. Segundo Keith L et al., 1997 a mutação do SF1 produz regressão importante das estruturas e células das pregas genitais, porém não das células germinativas, sugerindo que o NR5A1/SF1 não esteja envolvido nessa migração (30). No entanto, em nosso paciente, constatamos um IFT reduzido colocando alguma dúvida sobre o papel do NR5A1/SF1 no desenvolvimento das células germinativas. Por outro lado, o DTM não foi poupado, mostrando-se gravemente diminuído.

Ao estudo anátomo-patológico visualizamos resquícios Müllerianos com tuba uterina e tecido conjuntivo fibroso. Sabe-se que o primeiro sinal de diferenciação masculina do trato genital ocorre por volta dos 55 a 60 dias de vida do embrião humano, no local onde os ductos estão muito próximos ao pólo caudal do testículo (122) e , uma vez iniciada a regressão dos ductos de Müller, o processo se estende caudal e cranialmente, porém poupa a extremidade cranial que se tornará a *hidátide de Morgagni* e a terminação caudal que participa na organogênese do utrículo prostático. Como o paciente apresenta restos Müllerianos podemos inferir que a produção e/ou a função e/ou a janela temporal de ação do HAM foi comprometida. O HAM está sob o controle transcricional do SOX9 e precisa ser expresso antes que os ductos de Müller percam sua sensibilidade, por volta da oitava semana de vida intra-útero. Segundo Arango NA et al., 1999 o NR5A1/SF1 parece agir

como um regulador quantitativo sobre os níveis transcricionais do HAM (45). A mutação do SF-1 diminui a transcrição do HAM, porém ainda permite que ocorra a regressão Mülleriana. O SF-1 e o GATA-4 (fator transcricional) cooperam sinergicamente para transcrição do HAM nas células de Sertoli, através do aumento da atividade do SOX-9. A ruptura desse sinergismo com a mutação do SF-1 pode ser responsável por muitos casos de ADS 46,XY (70,123). Portanto, a mutação do SF1 no paciente WS deve ter ocorrido em época muito precoce do seu desenvolvimento alterando a partir daí, toda a cascata do seu desenvolvimento sexual. Fica, porém evidente que a linhagem esteroidogênica foi totalmente poupada. Casos com mutações heterozigóticas no NR5A1/SF1 são relativamente freqüentes associadas as ADS 46,XY com biossíntese esteroidogênica adrenal intacta. Se esses pacientes desenvolverão ou não falência adrenal somente o tempo mostrará. Nosso paciente em questão não tem qualquer comprometimento adrenal até o momento.

Há estudos que apóiam a hipótese que nos seres humanos, o desenvolvimento testicular pode ser mais sensível à perda parcial da função do SF1 quando comparado à glândula adrenal, por ação de SF1 dependente de dose (124).

Biason-Lauber,A.,et al.,2000 descrevem uma paciente 46,XX com desenvolvimento ovariano normal e insuficiência adrenal que apresentou transversão heterozigótica G-T no éxon 4 do NR5A1/SF1 levando a mutação missense R255L da proteína NR5A1/SF1. Essa mutação não interferiu com a tradução ou estabilidade da proteína, sendo a primeira mutação no SF1

onde se sugere que tal proteína não é necessária ao desenvolvimento gonadal feminino, entretanto confirma seu papel crucial na formação adrenal de ambos os sexos (125). Segundo Lourenço et al.2009, há evidências que sugerem envolvimento do fator esteroideogênico no desenvolvimento e função ovariana. Após estudos em 4 famílias com história de ADS 46,XY e XX, foram identificadas uma série de mutações missense, *in-frame* e *frameshift* no gene NR5A1/SF1 associadas com anormalidades no desenvolvimento e função ovariana. Nesse estudo uma paciente senegalesa com hipertrofia clitoriana sem consangüinidade familiar e insuficiência ovariana (concentrações de FSH elevadas) apresentou duas mutações no gene SF-1: p.Gly123Ala e p.Pro129Leu, ambas no domínio *hinge* do SF1 (35) exatamente a mesma mutação do nosso paciente WS.

Mallet et al.,2004 sugerem que no caso descrito por Biason-Lauber et al., 2000 não poderia ter sido excluído uma alteração no desenvolvimento ovariano pelas concentrações de LH e FSH pois nessa idade essas concentrações não estão aumentadas e também pelo fato que a deficiência do SF1 poderia diminuir a secreção das gonadotrofinas (126).

Os mesmos autores descreveram uma nova mutação no gene SF1 heterozigótica (C16X) identificada num paciente com disgenesia gonadal . O paciente apresentava baixas concentrações de HAM e testosterona pós hCG, hipoplasia testicular com raras células germinativas sem alteração da função adrenal. Essa mutação causou um término prematuro (stop códon) de tradução anulando a atividade do SF1. A haploinsuficiência pode explicar

o efeito deletérico dessa mutação sugerindo que o desenvolvimento testicular é mais dose dependente do SF1 que o adrenal (126).

Esse fenótipo de disgenesia gonadal com função adrenal normal sugere que o SF1 age de maneira dose-dependente e que a perda de 50% da proteína SF1 é suficiente para permitir o desenvolvimento e função da adrenal, mas não permite o desenvolvimento gonadal normal. Uma perda maior que 50% de proteína não é suficiente para o desenvolvimento adrenal e gonadal (126).

O segundo paciente de nosso estudo (MMF) apresentou a mutação Y404X no gene SF1, semelhante à descrita por Mallet et al., em 2004. O paciente MMF apresenta uma troca do códon TAC (tirosina) na posição 404 da proteína SF1, éxon 6, por stop códon (TAA) produzindo uma proteína truncada com somente 404 aminoácidos (aa) e ausência de 57 aa N terminais. Esse paciente também não teve qualquer comprometimento adrenal mas evoluiu com disgenesia gonadal, criptorquidia à direita, micropênis, hipospádia penoescrotal, genitália com aspecto masculino tendo permanecido no sexo masculino. A testosterona pós estímulo com hCG foi baixa (64 ng/dl). O paciente apresentava ausência de células germinativas e, portanto, o IFT não pode ser avaliado. O número de células de Sertoli por túbulo foi normal (30) e o DTM estava moderadamente diminuído.

Comparando nosso paciente ao descrito por Mallet D. et al., 2004 verificamos que ele se encaixa como uma haploinsuficiência, pois devido à proteína truncada produzida ele desenvolveu uma genitália com muitas malformações, porém com possibilidade de permanecer com o sexo de

origem (masculino). Por outro lado, o efeito negativo dessa mutação predominou, causando todas essas alterações na sua genitália e na produção hormonal com necessidade de reposição.

Mais estudos devem ser realizados para avaliar a exata prevalência da mutação do NR5A1/SF1 em pacientes com desordens reprodutivas e risco de disfunção adrenal e também para avaliar se variantes polimórficas do SF1 são importantes modificadores da expressão fenotípica das desordens reprodutivas (124).

5.2 Pacientes ALS e LSOS

Ambas as pacientes ALS e LSOS apresentaram malformação genital intensa a ponto de não ser possível mantê-las no sexo masculino. Do ponto de vista molecular foi encontrada uma microdeleção do braço longo do Y (DAZ2) na paciente ALS. Essas microdeleções do Yq estão associadas a defeitos na espermatogênese, enquanto a região AZF é considerada crítica para desenvolvimento das células germinativas. Embora não haja um consenso definitivo sobre a relação entre os tipos de microdeleções e seus efeitos na espermatogênese, sabe-se que microdeleções no AZFa leva à síndrome “Sertoli-cell only”, situação clínica em que não se desenvolvem células germinativas e os túbulos apresentam somente células de Sertoli. Mutações no AZFb provocam uma interrupção na meiose I, e no AZFc hipoespermatogênese progredindo com grave azoospermia ou

oligozoospermia (127). Provavelmente a microdeleção do DAZ2 não foi a responsável por toda alteração na formação da genitália da paciente ALS. O estudo molecular não apontou qualquer alteração do SF1 e SRY, porém essa malformação genital intensa em ambas as pacientes deve ter ocorrido durante a determinação sexual, período crucial do desenvolvimento gonadal onde há vários genes envolvidos, embora somente dois tenham sido avaliados em nosso estudo. A morfometria apontou a disgenesia tubular em ambas as pacientes e diminuição moderada do IFT, ficando evidente a necessidade de aumentarmos o número de genes estudados nesses pacientes com ADS 46,XY.

5.3 Paciente DSFJ

Outro paciente intrigante é o DSFJ com criptorquidia bilateral, hipospádia penoescrotal, resposta de testosterona ao hCG baixa (de 26 para 31ng/dL) e restos Müllarianos. Foi submetido a cirurgia aos 3 meses de idade devido a tumor de Wilms. Não havia qualquer alteração nefrológica que nos levasse a suspeitar de síndromes envolvidas com mutação do WT1. Sabe-se que o WT1 está implicado em anormalidades urogenitais incluindo tumor de Wilms, síndrome de WAGR, síndrome de Denys-Drash (DDS), que se apresentam com ADS,46,XY, associada a tumor de Wilms e glomerulopatia (esclerose mesangial difusa) com progressão precoce para insuficiência renal enquanto a síndrome de Frasier também apresenta uma glomerulopatia,

porém com lesão mesangial focal e a progressão para insuficiência renal é mais tardia.

O tumor de Wilms, nefroblastoma que ocorre durante a embriogênese, indica que houve ruptura do processo normal do desenvolvimento urogenital. Segundo Tagliarini et al., 2004, mutações no gene WT1 não é causa comum de disgenesia gonadal parcial 46,XY na ausência de anormalidades renais ou tumor de Wilms (128). No entanto, a análise desse gene deve ser feita devido ao risco de desenvolvimento tardio dos tumores de Wilms e gonadoblastoma.

5.4 Paciente BLS

A associação CHARGE foi descrita pela primeira vez em 1979 por Hall, como anomalia congênita com atresia de coanas (50). Pagon et al., em 1981 fizeram uma descrição mais completa do quadro e o referiram como “associação CHARGE” (51). Esta doença está relacionada a microdeleção do cromossomo 8q12, levando a mutação do gene CHD7. O quadro clínico se apresenta com anormalidades da genitália hipogonadismo, micropênis, hipospádia e alterações renais. O paciente BLS apresentou o menor diâmetro tubular dentre todos os nossos pacientes, IFT levemente diminuído, células de Sertoli em número próximo ao normal e HAM baixo, mostrando mais uma vez a dificuldade para se caracterizar a disgenesia testicular, pois neste paciente, esperaríamos que não houvesse células

germinativas presentes, tampouco células de Sertoli devido à intensidade de suas malformações. Os estudos moleculares não apontaram qualquer alteração no SRY ou SF1, embora não tenha sido avaliada a microdeleção do gene CHD7.

5.5 Pacientes LSSB, MAMS, IZ e OAMJr

Os pacientes LSSB, MAMS, IZ e OAMJr também tiveram suas genitálias alteradas necessitando de cirurgias mas permaneceram com sexo masculino e necessitam de reposição hormonal.

Desses quatro pacientes somente o LSSB apresentou um diâmetro tubular moderadamente diminuído porém não havia células germinativas impossibilitando o cálculo do IFT. O MAMS, IZ e OAMJr apresentaram DTM gravemente diminuído. O IFT moderadamente diminuído no MAMS e levemente no IZ.

O estudo molecular desses quatro pacientes apontou microdeleção do DAZ2 nos pacientes: MAMS e IZ.

O Hormônio AntiMülleriano dosado em três pacientes (WS,OAMJr,BLS) apresentou baixas concentrações. O paciente WS apresentou as duas mutações no SF-1 e resquícios Müllerianos; o paciente BLS apresenta a associação CHARGE e o OAMJr apresentou DTM gravemente diminuído. Provavelmente a diminuição do HAM cooperou muito para a disgenesia gonadal desses pacientes, de tal forma

que os três apresentam um DTM gravemente diminuído, configurando essa hipoplasia tubular.

Apesar de não termos realizado a pesquisa molecular do gene CHD7 e WT1 fica a dúvida da presença de mutações nesses genes.

6 CONCLUSÕES

O estudo de pacientes com ADS 46,XY disgenético é difícil dada a gama de possibilidades etiológicas, as dificuldades diagnósticas e os riscos de malignidade envolvidos. Ainda nos falta conhecimento para podermos interpretar e correlacionarmos essas anomalias a fim de que possamos em cada paciente descobrir o(s) erro(s) ocorrido(s) durante seu desenvolvimento e chegar a um diagnóstico etiológico e, com a melhora da compreensão dessas anormalidades poderemos proporcionar uma boa qualidade de vida sexual e social com um tratamento eficaz e principalmente, que nos dê condições de optarmos com mais embasamento científico na escolha sexual.

As mutações do SF-1 encontradas nos pacientes WS e MMF mostram a maior sensibilidade do testículo à perda parcial da função do SF1 que a glândula adrenal.

O efeito dominante negativo em ambos os pacientes mostram uma perda gênica importante, mas suficiente para mantermos o sexo fenotípico masculino.

Apesar de não haver consangüinidade familiar em ambos os pacientes (WS e MMF) a mutação do gene SF-1 apresenta um envolvimento familiar e hereditário, sendo necessário investigar tal mutação em toda a família dos pacientes.

A ampliação dos estudos moleculares avaliando vários genes sabidamente envolvidos na determinação gonadal pode trazer informações importantes para a compreensão de cada caso. Em algumas situações como no caso de mutações no WT1, passa-se a ter a preocupação com doenças renais, eventualmente evoluindo para tumores. Dentre nossos pacientes, um

deles apresentava tumor de Wilms, sendo um candidato a apresentar mutações no WT1.

A realização da pesquisa do AZF que se mostrou presente em três pacientes pode apontar dados sobre o potencial de fertilidade de alguns desses pacientes e pode ser, eventualmente, levado em conta na decisão do sexo de criação.

Como a porcentagem de alterações no SRY chega a 15% nas ADS 46,XY, esta análise deve fazer parte da investigação desses pacientes.

O aumento no número de células dos cariótipos talvez pudesse nos trazer maior informação citogenética nesses pacientes com ADS 46,XY.

7 REFERÊNCIAS

- 1- Jacobs PA, Balkie AG, Stewart JS, Court Brown WM, Forrest TH, Roy JR, Stewart JS, Lennox B. Chromosomal sex in the syndrome of testicular feminization. *Lancet*, 1959;2:591-2.
- 2- Ford CE, Jones KW, Briggs JH. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis. *Lancet*. 1959; 1: 711-3.
- 3- Bendel-Stenzel M, Anderson R, Heasman J, Wylie C. The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Semin Cell Dev Biol*; 1998; 9:393-400.
- 4- Motro B, Van der Kooy D, Rossant J, Reith A, Bernstein A. Contiguous patterns of c-Kit and steel expression: analysis of mutations at the W and Sl loci. *Development*. 1991;113:1207-21.
- 5- Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, O'Brien W, Raz E, Littman D, Wylie C, Lehmann R. The chemokine SDF1/CXCL 12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development*. 2003;130:4279-86.
- 6- Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhem D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J, Hamada H, Koopman P. Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice. *Science*. 2006;312:596-600.
- 7- Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *PNAS*. 2006;103:2474-9.
- 8- Schmahl J, Eicher EM, Wasburn LL, Capel B. Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development*. 2000;127:65-73.

-
- 9- Sinclair AH, Berta P, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved-DNA-binding motif. *Nature*. 1990;346:240-4.
 - 10- Behlke MA, Borgan JS, Beer-Ramero P, Page DC. Evidence that the SRY protein is encoded by a single exon on the human Y chromosome. *Genomics*. 1993;17:736-9.
 - 11- Su H, Lau YFC. Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am J Hum Genet*. 1993;52:24-38.
 - 12- Giese K, Grosschedl R. The HMG domain of the lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell*. 1992;69:185-95.
 - 13- Desclozeaux M, Poulat F, de Santa Barbara P, Soullier S, Jay P, Berta P, Boizet-Bonhoure B. Characterization of two Sp1 binding sites of the human sex determining SRY promoter. *Biochem Biophys Acta*: 1998;1397:247-52.
 - 14- Hossain A, Saunders GF. The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem*. 2001;276:16817-23.
 - 15- Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM, Orkin SH. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development*. 2002;129:4627-34.
 - 16- Assumpção JG, Ferraz LF, Benedetti CE, Maciel-Guerra AT, Guerra G, Jr., Marques-de-Faria AP, Baptista MT, de Mello MP. A naturally occurring deletion in the SRY promoter region affecting the Sp1 binding site is associated with sex reversal. *J Endocrinol Invest*. 2005;28:651-656.

- 17- Mackay S. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. *Int Rev Cytol.* 2000;200:47-99.
- 18- Josso N, di Clement N and Gouedard L. Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;179:25-32.
- 19- Orth JM, Gunsalus GM and Lamperti AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid numbers in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology.* 1988;122:787-94.
- 20- Maclaughin DT, Danohoe PK. Mechanisms of disease: Sex determination and differentiation. *N Engl J Med.* 2004;350:367-378.
- 21- Hawkins JR. Mutational analysis of SRY in XY females. *Hum Mutat.* 1993;2:347-50.
- 22- Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiol Rev.* 2007;87:1-28.
- 23- Polanco, JC and Koopman P. SRY and the hesitant beginnings of male development. *Dev Biol.* 2007;302:13-24.
- 24- Wagner KD, Wagner N, Schedl A. The complex life of WT1. *J Cell Sci.* 2003;116:1653-8.
- 25- Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Schedl A. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell.* 2001;106:319-29.
- 26- Hastie ND. The genetics of Wilms' tumor—a case of disrupted development. *Ann Rev Genet.* 1993;28:523-8.
- 27- Barbaux S, Niandet P, Gubler MC, Grünfeld JP, Jaubert F, Kuttenn F, Fékété CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavey K. Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet.* 1997;17:467-70.

-
- 28- Melo KF, Martin RM, Costa EM, Carvalho FM, Jorge AA, Arnhold IJ, Mendonça BB. An unusual phenotype of Frasier syndrome due to IVS9+4C>T mutation in the WT1 gene: predominantly male ambiguous genitalia and absence of gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol.Metab.* 2002;87:2500-5.
- 29- Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature.* 2008; 453:930-4.
- 30- Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: A Key Determinant of Endocrine Development and Function. *Endocr Rev.* 1997;18:361-77.
- 31- Leers-Sucheta S, Morohashi K, Mason JI, Melner MH. Synergistic activation of the human type II 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *J Biol Chem.* 1997;272:7960-7.
- 32- Caron KM, Ikeda Y, Soo C-C, Stocco DM, Parker KL, Clark BJ. Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *Mol Endocrinol.* 1997;11:138- 47.
- 33- Cammas FM, Pullinger GD, Barker S, Clark AJL. The mouse ACTH receptor gene: cloning and characterization of its promoter and evidence for a role for the orphan nuclear receptor SF1. *Mol Endocrinol.* 1997;11:867-76.
- 34- Ikeda Y, Shen W-H, Ingraham HÁ, Parker KL. Developmental expression of mouse steroidogenic factor 1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol.* 1994;8: 654-62.

- 35- Lourenço D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, Boudjenah R, Guerra-Jr G, Maciel-Guerra AT, Achermann JC, McElreavey K, Bashamboo A. Mutations in NR5A1 Associated with Ovarian Insufficiency. *New Engl J Med*. 2009;360:1200-10.
- 36- L.Lin JC. Achermann. Steroidogenic Factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and Disorders of Testis Development. *Sex Dev*. 2008; 2:200-9.
- 37- Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Camerino G. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet*. 1994;7:497-501.
- 38- Majdic G, Saunders PTK. Differential patterns of expression of Dax-1 and steroidogenic factor-1 (SF-1) in the fetal rat testis. *Endocrinology*. 1996;137:3586-9.
- 39- Shen WH, Moore CCD, Ikeda Y, Parker KL, Holly AL. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell*. 1994;77:651-61.
- 40- Crawford PA, Dorn C, Sadovsky Y, Milbrandt J. 1998. Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. *Mol Cell Biol*. 1998;18:2949-56.
- 41- Ryuji H, Shogo M, Masami K-A, Naoki T, Yuko K-F, Masamichi K, Ken-ichirou M, Dagmar W, Peter K, Yoshiakira K. A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice. *Development*. 2009;136: 129-38.
- 42- de Santa Bárbara P. Moniot B, Poulat F, Berta P. Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1 and AMH proteins during early human testicular development. *Dev Dyn*. 2000;217:293-8.
- 43- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J et al. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*. 1994;111:11-20.

-
- 44- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kowk G, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Good-fellow PN, Brook JD, Schafer AJ. Campomelic dysplasia and Autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. 1994;372:525-30.
 - 45- Arango N, Lovell-Badge R, Behringer R. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell*. 1999;99:409-19.
 - 46- Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, Grinberg A, Huang S, Kreidberg JÁ, Parker KL, Porter FD, Westphal H. The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature*. 2000; 403:909-13.
 - 47- Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S. Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development*. 1997;124: 1653-64.
 - 48- Torres M, Gómez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P. Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development*. 1995; 121:4057-65.
 - 49- Tellier, A-L, Amiel J, Delezoide AL, Audollent S, Augé J, Esnault D, Encha-Razavi F, Munnich A, Lyonnet S, Vekemans M, Attié-Bitach T. Expression of the PAX2 gene in human embryos and exclusion in the CHARGE syndrome. *Am J Med Genet*. 2000;93:85-8.
 - 50- Hall BD. Choanal atresia and associated multiple anomalies. *J Pediat*. 1979;95:395-8.
 - 51- Pagon RA, Graham JM. Jr Zonana J, Young SL. Coloboma, congenital heart disease, a multiple anomalies: CHARGE association. *J Pediat*. 1981;99:223-7.

-
- 52- Lin AE; Chin AJ; Devine W; Sang CP; Zackal E. The pattern of cardiovascular malformation in the CHARGE association. *Amer J Dis Childh.* 1987;141:1010-3.
- 53- Davenport SLH; Hefner MA; Mitchell JA. The spectrum of clinical features in CHARGE syndrome. *Clin Genet.* 1986;29:298-310.
- 54- Sanlaville D, Etchevers HC, Gonzales M, Martinovic J, Clément-Ziza M, Delezoide AL, Aubry MC, Pelet A, Chemouny S, Cruaud C, Audollent S, Esculpavit C, Goudefroye G, Ozilou C, Fredouille C, Joye N, Morichon-Delvallez N, Dumez Y, Weissenbach J, Munnich A, Amiel J, Encha-Razavi F, Lyonnet S, Vekemans M, Attié-Bitach T. Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome in fetuses with CHD7 truncating mutations correlates with expression during human development. *J Med Genet* 2006;43:211-7.
- 55- Lalani SR, Safiullah AM, Ferbach SD, Harutyunyan KG, Thaller C, Peterson LE, McPherson JD, Gibbs RA, White LD, Hefner M, Davenport SL, Graham JM, Bacino CA, Glass NL, Towbin JA, Craigen WJ, Neish SR, Lin AE, Belmont JW. Spectrum of CHD7 mutations in 110 individuals with CHARGE syndrome and genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet.* 2006;78:303-14.
- 56- Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Shiroishi T, Natahara Y, Hashimoto N, Noguchi K, Higashinakagawa T. Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature.* 1998;393:688-92.
- 57- Gibbons RJ, Picketts DJ, Villard L, Higgs DR. Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell.* 1995;80:837-45.
- 58- Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassalli JD, Efstratiadis A, Accili D, Parada LF. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature.* 2003;426: 291-5.

-
- 59- Zarkower D. Invertebrates may not be so different after all. *Novartis Found Symp.* 2002;244:115-126.
- 60- Tilmann C, Capel B. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:1-18.
- 61- Lovell-Badge R, Canning C, Sekido R. Sex-determining genes in mice: building pathways. *Novartis Found Symp.* 2002;244:4-18.
- 62- Park SY, Meeks KK, Raverot G, Pfaff LE, Weiss J, Hammer GD, Jameson JL. Nuclear receptors SF1 and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development. *Development.* 2005;132:2415-23.
- 63- Nef S, Parada LF. Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *Nat Genet.* 1999;22:295-9.
- 64- Prince FP. The triphasic nature of Leydig cell development in humans and comments on nomenclature. *J Endocrinol.* 2001;168:213-6.
- 65- Schmahl J and Capel B. Cell proliferation is necessary for the determination of male fate in the gonad. *Dev Biol.* 2003;258:264-76.
- 66- Kin Y, Kobayashi A, Sekido R, Di Napoli L, Brennan J, Chaboissier MC, Poulat F, Behringer RR, Lovell-Badge R, Capel B. *Fgf9* and *Wnt4* act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol.* 2006;4:e187.
- 67- 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.
- 68- Taguchi O, Cunha GR, Lawrence WD, Rabbay SJ. Timing and irreversibility of Müllerian duct inhibition in the embryonic reproductive tract of the human male. *Dev Biol.* 1984;106:394-8.

-
- 69- D Damiani- O Enigma da Determinação Gonadal In Nuvarte Setian. Endocrinologia pediátrica- aspectos físicos e metabólicos do recém-nascido ao adolescente. São Paulo: Sarvier; 2002. P.433-7.
- 70- Tremblay JJ, Viger RS. Transcription factor GATA-4 enhances Müllerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol Endocrinol*. 1999;13:1388-9.
- 71- Natctigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell*. 1998;93:445-54.
- 72- Tran D, Meusy-Dessolle N, Josso N. Anti-Müllerian hormone is a function marker of foetal sertoli cells. *Nature*. 1977;269:411-2.
- 73- Rajpert-De Meyts, Jorgensen N, Graem N, Müller J, Cate RL, Skakkeak NE. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulose cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:3836-44.
- 74- Rey R, Lordereau-Richard I, Carel JC, Barbet P, Roger M, Lahlou N. Anti-Müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;77:1220-6.
- 75- Al-Attar L, Noel K, Dutertle M, Forest MG, Burgoyne OS, Josso N, Rey R. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the post-natal mouse. *J Clin Invest*. 1997;100:1335-43.
- 76- Hannema SE, Hughes IA. Regulation of Wolffian duct development. *Horm Res*. 2007;67:142-51.
- 77- Bedford JM. Anatomical evidence for the epididymis as the prime mover in the evolution of the scrotum. *Am J Anat*. 1978;152:483-507.

-
- 78- Sampaio FJB, Favorito LA. Analysis of testicular migration during the fetal period in humans. *J Urol*. 1998;159: 540-2.
- 79- Ferlin A, Arredi B, Zuccarello D, Garolla A, Selice R, Foresta C. Paracrine and endocrine roles of insulin-like factor 3. *J Endocrinol Invest*. 2006;29:657-64.
- 80- Ferlin A, Garolla A, Rigon F, Rasi Caldogno L, Lenzi A, Foresta C. Changes in serum insulin-like factor 3 during normal male puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:3426-31.
- 81- Bay K, Virtanen HE, Hartung S, Ivell R, Main KM, Skakkeback NE, Anderson AM. Nordic Cryptorchidism Study Group, Toppari J. Insulin-like factor 3 level in cord blood and serum from children: effects of age, postnatal hypothala-pituitary-gonadal axis activation and cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:4020-7.
- 82- Wikström AM, Bay K, Hero M, Andersson AM, Dunkel L. Serum insulin-like factor 3 levels during puberty in healthy boys and boys with Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;1:4705-8.
- 83- Bay K, Hartung S, Ivell R, Shumacher M, Jürgensen D, Jorgensen N, Holm M, Skakkebaek NE, Anderson AM. Insulin-like factor 3 serum levels in 135 normal men and 85 men with testicular disorders: relationship to the luteinizing hormone-testosterone axis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90: 3410-8.
- 84- Anand-Ivell R, Wohlgemuth J, Haren MT, Hope PJ, Hatzinikolas G, Wittert G, Ivell R. Peripheral INSL3 concentrations decline with age in a large population of Australian men. *Int J Androl*. 2006;29:618-26.
- 85- Setian N. Endocrinologia pediátrica – aspectos físicos e metabólicos do recém-nascido ao adolescente. São Paulo: Sarvier; 1989, p. 438-9: Criptorquidia.

-
- 86- Giwercman A, Müller J, Skakkebaek NE. Cryptorchidism and testicular neoplasia. *Horm Res.* 1988;30:157-63.
- 87- Glenister TW. The development of the utricle and the so-called “middle” or “median” lobe of the human prostate. *J Anat.* 1962;96:443-55.
- 88- Jirasek JE. Morphogenesis of the genital system in the human. In: Blandau RJ, ed *Morphogenesis and malformation of the genital system.* New-York: Alan Liss; 1977. p.13-40.
- 89- Maki F, Yuda W, Michiyo O, Fumiko K, Noriyuki K, Takashi B, Ken-ichirou M, Jocelyn L, Motoo K, and Tsutomu O. Maternind-like Domain-containing 1 (MAMLD1 or CXorf6) Transactivates the Hes3 Promoter, Augments Testosterone Production and Contains the SF1 Target Sequence. *J Biol Chem.* 2998;283:5525-32.
- 90- Hutson JM. Cryptorchidism and hypospadias In *Endocrinology of Male Reproduction.* Editor: Robert Mc Lachlan – 2007.
- 91- Zalel Y, Pinhas-Hamiel O, Lipitz S, Mashiach S, Achiron R. The development of the fetal pênis an in utero sonographic evaluation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001;17:129-31.
- 92- D Damiani. Embriologia do Aparelho Genital. In: Setian N. *Endocrinologia pediátrica - aspectos físicos e metabólicos do recém-nascido ao adolescente.* São Paulo: Sarvier; 2002,p 428-32.
- 93- Müller J, Skakkebaek NE. Fluctuations in the number of germ cells during late foetal and early postnatal periods in boys. *Acta Endocrinol.* 1984;105:271-4.
- 94- Nistal M, Abaurrea MA, Paniagua R. Morphological and histometric study of human Sertoli cells from birth to the onset of puberty. *J Anat.* 1982;134:351-63.

-
- 95- Cortes D, Müller J, Skakkebaek NE. Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods, *Int J Androl.* 1987;10:589-96.
- 96- Fawcett DW, Anderson WA, Phillips DM. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Dev Biol.* 1971; 26: 220-51.
- 97- Prince FP. Ultrastructural evidence of mature Leydig cells and Leydig cell regression in the neonatal human testis. *Anat Rec.* 1990; 228:405-17.
- 98- Paniagua R, Nistal M: Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to the onset of puberty. *J Anat.* 1984;139: 535-52.
- 99- Nistal M, Gonzalez-Peramto P, Paniagua R. Congenital Leydig cell hyperplasia, *Histopathology.* 1988;12: 307-17.
- 100- Skinner MK. Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev.* 1991;12:45-77.
- 101- Behre HM, Nashan D, Nieschlag E. Objective measurement of testicular volume by ultrasonography: evaluation of the technique and comparison with orchidometer estimates. *Int J Androl.* 1989;12:395-403.
- 102- Lennox B, Ahmad RN, Mack WS. A method for determining the relative total length of the tubules in the testis. *J Pathol.* 1970;102:229-38.
- 103- Johnson L, Petty CC, Neaves WB. Influence of age on sperm production and testicular weights in men. *J Reprod Fertil.* 1984;70: 211-8.
- 104- Jonte G, Holstein AF. On the morphology of the transitional zones from the rete testis into the ductuli efferentes and from the ductuli efferentes into the ductus epididymidis, investigation on the human testis and epididymis, *Andrologia.* 1978;19:398-412.
- 105- Nistal M, Paniagua R, Regadera J, Santamaria L, Amat P. A quantitative morphological study of human Leydig cells from birth to adulthood. *Cell Tissue Res.* 1986;246:229-36.

-
- 106- Scolfaro MR, Cardinalli IA, Guerra GJr. A importância da Análise Histológica Morfométrica Gonadal na Identificação da Gônada Disgenética. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47:128-34.
- 107- McElreavey K, Vilain E, AbbasN, Costa J, Fellous M. XY Sex reversal associated with a deletion 5' to the SRY "HMG box" in the testis-determining region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89:11016-20.
- 108- Ferras C; Costa P, Fernandes S, Carvalho F. Importância dos estudos das microdeleções do cromossomo Y na Infertilidade masculina. *Acta Urol.* 2004;4: 17-26.
- 109- Voght PH. Molecular genetics of human male infertility from genes to new therapeutic perspectives. *Curr. Pharm. Des.* 2004;10: 471-500.
- 110- Foresta C, Moro E and Ferlin A. Y Chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endoc.Rev.* 2001;22:226-39.
- 111- Foresta C, Garolla , Bartoloni L, Bettella A, Ferlin A. Genetic abnormalities among severely oligospermic men Who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90:152-6.
- 112- Beilguelman B. Citogenética Humana. Citogenética Humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1986.
- 113- Muller SA; Dykes DD; Polesky KF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16: 1215.
- 114- Fernades S, Huellen K, Gonçalves J,Dukal H. Zeister J, Rajpert De Meyts E, Skakkebaek NE, Habermann B, Krause W, Sousa M, Barros A, Vogt PH. High frequency of *DAZ1/DAZ2* gene deletions in patients with severe Oligozoospermia. *Mol Hum Reprod.* 2002;8:286-98.
- 115- Joanne L. Rutgers JL, Scully RE. Pathology of the testis in intersex syndromes. *Semin Diagn Pathol.* 1987;4:275-91.

-
- 116- Molyneaux KA, Stallock J, Schaible K and Wylie C. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev. Biol.* 2001; 240:488-98.
- 117- Dehner LP. Gonadal and extragonadal germ cell neoplasms: In: Finegold M, Benington JL. Editors. *Teratomas in childhood in pathology of neoplasia in children and adolescents*. Philadelphia: W.B.Saunders Co; 1986.p282-312.
- 118- Ueno T, Tanaka YO, Nagata M and Itai Y. Spectrum of germ cell tumors: from head to toe. *Radiographics*; 2004;24:387-404.
- 119- Cools M, Drops SL, Wolffenbuttel KP, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Germ Cell Tumors in the Intersex Gonad: Old paths, News directions, Moving frontiers. *Endocr Rev.* 2006;27:468-84.
- 120- Lau YF, Kido T. Gonadoblastoma locus and the TSPY gene on the human Y chromosome. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2009;87:114-22.
- 121- Honda S, Morohashi, K, Nomura, M, Takeya, K, Kitajima, M, Omura T. Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Chem.* 1993;268:7494-502.
- 122- Jirasek JE. Morphogenesis of the Genital System in the Human In Blandau RJ and Bergsma D (eds). *Morphogenesis and Malformation of the Genital System*. National Foundation March of Dimes Birth Defects Original Articles Series. New York. 1977; vol 13, p13-39.
- 123- Watanabe K, Clarke TR, Lane AH, Wang XZ, Donohoe PK. Endogenous expression of Müllerian inhibiting substance in early postnatal rat Sertoli cells requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA-4 binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:1624-9.
- 124- Wada, Y; Okada, M; Fukami, M; Sasagawa, I; Ogata, T. Association of cryptorchidism with Gly146Ala polymorphism in the gene for steroidogenic factor-1. *Fertil Steril.* 2006;85:787-90.

-
- 125- Biason-Lauber A; Schoenle EJ. Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor 1 (NR5A1/SF-1) and adrenocortical insufficiency. *Am J Hum Genet.* 2000;67:1563–8.
- 126- Mallet D, Bretones P, Michel-Calemard L, Dijoud F, David M. Gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46, XY patient heterozygous for the nonsense C16X mutation: a case of SF1 haploinsufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:5927-9.
- 127- Ferlin A, Tessari A, Ganz F, Marchina E, Barlati S, Garolla A, Foresta C. Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J Med Genet.* 2005; 42:209-13.
- 128- Tagliarini EB, Assumpção JG, Scolfaro MR, de Mello MP, Maciel-Guerra AT, Guerra Jr G, Hackel C. Mutation in SRY and WT-1 genes required for gonadal development are not responsible for XY partial gonadal development are not responsible for XY partial gonadal dysgenesis. *Braz J Med Biol Res.* 2004;38:17-25.