ALINE ZAMBONI MACHADO

**Estudo do gene *MAP3K1* em pacientes portadores
de distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY
por anormalidades no desenvolvimento gonadal**

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

Programa de: Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo
Orientadora: Dra. Sorahia Domenice

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Machado, Aline Zamboni

Estudo do gene MAP3K1 em pacientes portadores de distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY por anormalidades no desenvolvimento gonadal / Aline Zamboni Machado. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de.Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo
Orientadora: Sorahia Domenice .

Descritores: 1.Desenvolvimento sexual 2.Disgenesia gonadal 46 XY 3.Análise de sequencia de DNA 4.Proteínas quinases p38 ativadas por mitogeno 5.Proteína quinase 3 ativada por mitogeno 6.MAP quinase quinases 7.

USP/FM/DBD-460/16

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

Apoios: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): bolsa de doutorado 12/19543-2.

Dedico esta tese aos meus pais, Manoel e Valdecira, e ao meu noivo Caio pelo eterno apoio em minhas conquistas.

Agradecimentos

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

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

Ao meu noivo Caio, o amor da minha vida que com seu companheirismo me apoiou em todos os momentos bons outros nem tanto. Sempre com paciência e positivismo facilitando a finalização deste trabalho.

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

Ao meu cunhado Gustavo, pelo entusiasmo com o trabalho e minhas idéias e pela super ajuda com as análises estatísticas do trabalho até altas horas da noite.

À minha orientadora, Dra Sorahia uma mentora exemplar que me proporcionou ótimos momentos de discussão profissional e pessoal e momentos de grande aprendizado sempre com paciência, entusiasmo e sabedoria.

À Dra Berenice, por toda confiança em meu trabalho, por todas as ricas discussões científicas e um exemplo de dedicação.

Às minhas amigas Tamaya e Mari pelos momentos ótimos de descontração, de trocas de experiências pessoais e profissionais, pelo companheirismo que foram essenciais na execução deste trabalho.

À Mirian, por sua tranquilidade e eterna disponibilidade em ajudar.

À Nathalia Lisboa e o Antono Lerario por toda a ajuda na análise do sequenciamento de nova geração.

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

À Andresa e a Denise por sempre se interessarem e perguntarem sobre o andamento do trabalho.

À Luciani pelos conselhos e conversas divertidíssimas nos finais de tarde.

À Cris pelos momentos de descontração no laboratório. À Fran pela manutenção dos materiais sempre prontos para o uso. À Cidinha pela disponibilização e compra dos materiais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Abreviaturas de Aminoácidos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Resumo

Summary

1 – Introdução.....	1
1.1- Via de sinalização MAPK.....	4
1.2- Interações da via Mapk com a cascata da determinação gonadal.	6
1.3- Via de sinalização de Map3k4	7
1.4- Via de sinalização Map2k3 e Map2k6	8
1.5- Via de sinalização Map3k1	8
1.6- Gene MAP3K1 e DDS em humanos	9
Justificativa do estudo.....	16
2 – Objetivos.....	18
3 – Casuística e Métodos	20
3.1- Pacientes	21
3.2- Grupo de indivíduos controles	23
3.3 - Avaliação Molecular do DNA	24
3.4– Avaliação Molecular Tecidual	37
4 – Resultados.....	48
4.1- Resultados Avaliação Molecular.....	49
4.2.- Estudos Funcionais	60
4.3- Resultados Avaliação Molecular Tecidual	66
5 – Discussão	74
6 – Conclusões.....	87

7 – Anexos	90
8 – Referências	103

Lista de Abreviaturas

AKT	Proteína quinase B
AXIN1	Gene codificador da proteína Axin-1
AMH	Hormônio anti-Mulleriano
CBX2	“Chromobox homolog 2”
CTNNB1	Gene codificador da proteína humana β -catenina
CNVs	Variações no número de cópias
DAX1	Sexo reverso dosagem-sensitivo, região crítica de hipoplasia adrenal, gene 1
DDS	Distúrbio do desenvolvimento sexual
DGC	Disgenesia gonadal completa
DGP	Disgenesia gonadal parcial
DHH	Gene homologo “Desert hedgehog”
DMRT1	Fator de transcrição relacionado com “doublesex” e “mab-3”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpc	Dias pós coito
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
dUTP	Deoxiuridina trifosfatase
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
ERK	Quinase reguladora de sinal extracelular
ER α	Receptor de estrógeno tipo alfa
ER β	Receptor de estrógeno tipo beta
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos

FGFR	Receptor dos fatores de crescimento de fibroblastos
FOG2	Proteína ligante a GATA 2
FRAT1	Rearranjo frequente em linfomas avançados de células T-Cell
Fst	Folistatina
GATA4	Fator de transcrição que se liga a sequência de DNA "GATA"
Indels	Termo molecular para inserções e deleções no DNA
c-JNK	c-Jun N terminal quinase extracelular
L-Pgds	Lipocalina- prostaglandina D2 sintetase
MAPK/ MEK	Proteína quinase ativada por mitógenos
NR5A1/SF1	Receptor nuclear subfamília 5, grupo A, membro 1/ Fator esteroideogênico 1
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCA	Persistência de canal arterial
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PLC γ	Fosfolipase C γ
Pgd2	Prostaglandina D2 sintetase
PTGDS	Gene codificador da proteína Prostaglandina D2 sintetase
PTCH1	"Patched 1"
RA	Ácido retinóico
RAF	Oncogene viral homólogo de leucemia murina v-raf-1

RNA	Ácido ribonucléico
RAS	Oncogene relacionado com tumores espontâneos de tireoide
RHOA	Membro A da Família de gene homologo Ras
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SRD5A2	Gene codificador da 5 alfa redutase
SOX9	“SRY –box 9”
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único ou polimorfismo de nucleotídeo simples
SRY	Região determinante do sexo no cromossomo Y
TE	Tampão Tris-EDTA
TdT	Deoxinucleotidil terminal transferase
WNT4	“wingless-type MMTV integration site family, member 4”
WT1	Gene supressor do Tumor de Wilms 1
ZEB2	Dedo de zinco E-box que se liga a homeobox 2

Lista de Abreviaturas de Aminoácidos

(Aminoácido - código de três letras- código de uma letra)

Alanina – Ala – A

Arginina - Arg – R

Asparagina – Asn – N

Ácido Aspártico – Asp – D

Cisteina – Cys – C

Glutamina – Gln – Q

Ácido glutâmico – Glu – E

Glicina – Gly – G

Histidina – His – H

Isoleucina – Ile – I

Leucina – Leu- L

Lisina – Lys – K

Metionina – Met – M

Fenilalanina – Phe – F

Prolina – Pro – P

Serina – Ser – S

Treonina - Thr – T

Triptofano – Trp – W

Tirosina – Tyr – Y

Valina – Val - V

Lista de Figuras

Figura 1. Cascata de expressão gênica e principais redes reguladoras envolvidas no desenvolvimento sexual.....	3
Figura 2. Representação esquemática da via de transdução de sinal da MAP quinase ERK 1/ 2.	5
Figura 3. Representação da via de sinalização do MAP3K1 e suas funções de indução de sobrevivência ou morte celular. A-	11
Figura 4. Esquema representativo da participação dos cofatores e alvos da via do MAP3K1 no processo de determinação gonadal masculino e feminino em humanos.	15
Figura 5. Representação da cascata de sinalização do FGF-FGFR que está interligado com a cascata de MAPK.	16
Figura 6. Fluxograma dos pacientes selecionados e métodos utilizados no estudo	23
Figura 7. Fluxograma dos pacientes selecionados para imunohistoquímicas e os tipos de teste realizados nos tecidos.	23
Figura 8. Imagens de microscopia de luz de corte histológico de um folículo linfóide (controle de reação) com marcação Caspase-3.....	42
Figura 9. Localização das variantes alélicas deletórias do MAP3K1..	50
Figura 10. Eletroferograma das novas variantes alélicas não sinônimas encontradas no gene <i>MAP3K1</i>	54
Figura 11. Diagrama com a descrição dos passos de filtragem na análise do exoma e a quantidade de variantes alélicas resultantes	55
Figura 12. Heredograma da família das pacientes 18 e 19 portadoras das variantes alélicas nos genes <i>FGFR2</i> e <i>MAP3K1</i>	59
Figura 13. Heredograma da família da Paciente 47 portadora das variantes nos genes <i>MAP3K1</i> e <i>SRD5A2</i>	60
Figura 14. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo disgenético da Paciente 18..	69
Figura 15. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo disgenético da Paciente 19..	70

Figura 16. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo disgenético da Paciente com mutação no gene <i>NR5A1</i>	71
Figura 17. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo de um paciente com insensibilidade parcial aos andrógenos. e.....	72
Figura 18. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo controle normal. e	73

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos específicos para amplificação dos exons do gene <i>MAP3K1</i>	26
Tabela 2. Listas dos 62 genes que foram estudados no painel customizado para DDS	36
Tabela 3. Variantes alélicas encontradas no gene <i>MAP3K1</i> pelo método de Sanger.....	49
Tabela 4. Variantes alélicas e seus scores potenciais para alteração deletéria na proteína	53
Tabela 5. Descrição dos genes encontrados na análise final do exoma.....	56
Tabela 6. Descrição das variantes alélicas encontradas no exoma.....	57
Tabela 7. Comparação dos achados nas reações de imunohistoquímica com anticorpos anti-Caspase-3 em testículos de pacientes portadores de variantes alélicas no <i>MAP3K1</i> e de outras etiologias de DDS 46,XY	67
Tabela 8. Dados clínicos e hormonais dos pacientes com disgenesia gonadal completa 46,XY	91
Tabela 9. Continuação da tabela de dados clínicos e hormonais dos pacientes com disgenesia gonadal completa 46,XY.....	92
Tabela 10. Genitais internos e exame anátomo-patológico dos pacientes com disgenesia gonadal completa 46,XY	93
Tabela 11. Dados clínicos e hormonais dos pacientes com disgenesia gonadal parcial 46,XY	94
Tabela 12. Continuação da tabela de dados clínicos e hormonais dos pacientes com disgenesia gonadal parcial 46,XY.....	95
Tabela 13. Genitais internos e exame anátomo-patológico dos pacientes com disgenesia gonadal parcial 46,XY	96
Tabela 14. Continuação da tabela de genitais internos e exame anátomo-patológico dos pacientes com disgenesia gonadal parcial 46,XY	97
Tabela 15. Dados clínicos e hormonais e genitais internos e exame anátomo-patológico da paciente com DDS46,XY de origem indeterminada	98

Lista de Gráficos

Grafico 1. Valores de média de absorbancia para AKT fosforilado e não fosforilado para cada diferente linhagem mutada.....62

Grafico 2. Valores de média de absorbancia para ERK fosforilado e não fosforilado para cada diferente linhagem mutada.....63

Grafico 3. Valores de fluorescência normalizados para as taxas de ERK fosforilado (pERK) e p38 fosforilado (pp38) para cada diferente linhagem linfoblastóide mutada.65

Machado AZ. *Estudo do gene MAP3K1 em pacientes portadores de distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY por anormalidades no desenvolvimento gonadal* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: Pearlman e colaboradores relacionou a presença de mutações ativadoras no gene *MAP3K1* com o desenvolvimento testicular anormal em pacientes com disgenesia gonadal 46,XY familiar, embora os estudos em camundongos tenham demonstrado que o gene *Map3k1* não é essencial para a determinação testicular. No desenvolvimento gonadal masculino, a ligação do MAP3K1 à proteína RHOA promove uma fosforilação normal de p38 e ERK1/2, o que determina um bloqueio da via da β -catenina pela MAP3K4. Já no desenvolvimento feminino, ocorre uma hiper fosforilação de p38 e ERK1/2, o que determina a ativação da via da β -catenina e o bloqueio da via de retroalimentação positiva do SOX9 e o desenvolvimento testicular. **Objetivos:** Pesquisar a presença de variantes alélicas do gene MAP3K1 em pacientes portadores de distúrbios do desenvolvimento sexual (1) 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal e avaliar a repercussão funcional das variantes identificadas. **Casística e Métodos:** Quarenta e sete pacientes com disgenesia gonadal 46,XY (17 com a forma completa e 29 com a forma parcial) e uma paciente com DDS 46,XY de causa etiológica não conhecida foram estudados. As regiões codificadoras do gene MAP3K1 foram amplificadas e sequenciadas pelo método de Sanger ou painel customizado de genes-alvo associados ao DDS. Estudo in vitro utilizando o método de detecção colorimétrica In-Cell ELISA com anticorpos específicos para detecção de ERK1/2 e AKT, fosforilado e não fosforilado foi realizado em fibroblastos obtidos por biópsia de pele e mantidos em cultura celular de 3 indivíduos portadores de variantes no MAP3K1. A quantificação da fosforilação de p38 e ERK por ensaio de citometria em células linfoblastóides mutadas foram realizados em amostras de 4 indivíduos portadores de variantes no MAP3K1 em estudo realizado em colaboração. Imunohistoquímica com anticorpos anti Caspase-3 foram realizadas em tecidos gonadais parafinados das pacientes portadoras de variantes alélicas nos genes MAP3K1 e FGFR2. **Resultados:** Vinte e uma variantes alélicas, sete das quais ainda não descritas na literatura, foram identificadas no gene MAP3K1. Quatro novas variantes alélicas exônicas e não sinônimas (p.Leu639Pro, p.Leu447Trp, p.Thr657Arg e p.Cys691Arg) foram identificadas em heterozigose; todas foram classificadas como deletérias para a proteína nos estudos de predição “in silico”, não foram identificadas em indivíduos controles brasileiros estudados e não estão descritas nos bancos de dados populacionais. A variante p.Leu639Pro foi identificada em duas irmãs com disgenesia gonadal 46,XY portadoras da variante p.Ser453Leu no gene FGFR2 identificada previamente. A variante intrônica c.834+1G>T identificada em heterozigose foi classificada como deletéria à proteína na análise no site de predição para alteração de “splicing”. Os ensaios colorimétricos para detecção de ERK1/2 e AKT, fosforilado e não fosforilado foram inconclusivos. Os estudos in vitro de avaliação dos níveis de fosforilação de p38 e ERK evidenciaram uma maior fosforilação nas culturas celulares mutantes para o MAP3K1 quando comparado com a linhagem celular selvagem, resultado estatisticamente significativo ($p<0,001$) e que corrobora com os dados publicados previamente. A imunohistoquímica com anticorpos anti Caspase-3 mostrou uma maior marcação em células germinativas nos tecidos gonadais das pacientes portadoras das variantes no MAP3K1 e FGFR2 do que no tecido testicular normal, porém marcações foram identificadas também em células germinativas de tecidos testiculares de indivíduos com DDS 46,XY de outras etiologias. **Conclusões:** Os achados sugerem fortemente a participação das mutações identificadas no MAP3K1 na etiologia dos distúrbios do desenvolvimento sexual dos pacientes estudados. Porém, uma melhor compreensão dos mecanismos de participação da via MAPK nas redes gênicas de regulação do processo de determinação testicular humano ainda é necessário.

Descritores: desenvolvimento sexual; disgenesia gonadal 46 XY; análise de sequência de DNA; proteínas quinases p38 ativadas por mitógeno; proteína quinase 3 ativada por mitógeno; MAP quinase quinases.

Machado AZ. *Study of the MAP3K1 gene in patients with disorders of sexual development 46,XY by abnormalities in gonadal development* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Introduction: Pearlman et al. associated the presence of activating mutations in *MAP3K1* gene with abnormal testicular development in patients with familial 46,XY gonadal dysgenesis, although studies in mice have shown that the *Map3k1* gene is not essential for testicular determination. In male gonadal development, the binding of MAP3K1 to the RHOA protein promotes a normal phosphorylation of p38 and ERK1/2, and a blockade of the β -catenin pathway is determined by MAP3K4. In the female development, hyperphosphorylation of p38 and ERK1/2 occurs. p38 and ERK1/2 hyperphosphorylated determine the activation of the β -catenin pathway, the blockade of the positive feedback pathway of SOX9 and the testicular development. **Objectives:** To investigate the presence of allelic variants of the MAP3K1 gene in patients with 46,XY disorders of sex development (DSD) due to abnormalities of gonadal development and to evaluate the functional repercussion of the identified variants. **Patients and Methods:** Forty-seven patients with 46,XY gonadal dysgenesis (17 patients with complete form and 29 with partial form) and one patient with 46,XY DSD of unknown cause were studied. The MAP3K1 coding regions were amplified and sequenced by Sanger method or by custom panel of target genes associated with DSD. In-Cell ELISA assay with specific antibodies for the detection of phosphorylated and non-phosphorylated ERK1/2 and AKT was performed on fibroblasts obtained by skin biopsy and kept in cell culture of 3 individuals with MAP3K1 variants. Quantification of p38 and ERK phosphorylation by cytometric assay on mutated lymphoblastoid cells were performed on samples from 4 subjects with *MAP3K1* variants in a collaborative study. Immunohistochemistry with anti-Caspase-3 antibodies were performed on paraffin-embedded gonadal tissues of patients with *MAP3K1* and *FGFR2* allelic variants. **Results:** Twenty-one allelic variants, seven of them have not yet been described in the literature, were identified in the *MAP3K1*. Four novel exonic and non-synonymous allelic variants (p.Leu639Pro, p.Leu447Trp, p.Thr657Arg and p.Cys691Arg) were identified in heterozygous state; all of them were classified as deleterious in silico prediction sites; they were not identified in Brazilian control subjects and they were not described in the human genetic variation databases. The p.Leu639Pro variant was identified in two sisters with 46,XY gonadal dysgenesis carrying the previously identified *FGFR2* variant (p.Ser453Leu). The intronic c.834+1G>T variant identified in heterozygous state was classified as deleterious in the prediction sites. Colorimetric assays for the detection of phosphorylated and non-phosphorylated ERK1/2 and AKT were not significant. In vitro studies to evaluate p38 and ERK phosphorylation levels evidenced increased phosphorylation in the MAP3K1 mutant cells when compared to the wild type cells line; a statistically significant result ($p < 0.001$) that confirmed previously published data. The immunohistochemistry study with anti-Caspase-3 antibodies showed that the gonadal tissues of patients with *MAP3K1* and *FGFR2* variants exhibited more apoptotic germ cells than normal testicular tissue, but stained germ cells were also identified in the testicular tissues of the 46,XY DSD controls. **Conclusions:** These findings strongly suggest the participation of *MAP3K1* mutations in the etiology of the testicular abnormalities of the 46,XY DSD patients of this study. However, a better understanding of the mechanisms of MAPK pathway in the gene regulatory networks of the human testicular determination process is still necessary.

Descriptors: sexual development; gonadal dysgenesis, 46,XY; sequence analysis, DNA; p38 mitogen-activated protein kinases, mitogen-activated protein kinase 3; MAP kinase kinase kinases.

1 – Introdução

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

Embora muitos dos eventos que participam do processo de determinação sexual não tenham sido elucidados, é indiscutível que o tecido gonadal é o responsável na vida fetal pela diferenciação das estruturas genitais. Os experimentos clássicos de Alfred Jost realizados em mamíferos na década de 70 estabeleceram que o desenvolvimento da gônada embrionária bipotencial para testículo ou ovário é o primeiro passo da determinação sexual em mamíferos, sendo o fenótipo sexual adulto consequência da presença ou da ausência de ação dos hormônios sintetizados pelas gônadas (2).

A gônada embrionária indiferenciada inicia seu desenvolvimento por volta da 5ª semana de vida fetal nos humanos (2). Nas semanas seguintes (6ª - 7ª semana) um “sinal” desencadeia a diferenciação de grupos celulares específicos no tecido gonadal bipotencial. Este tecido gonadal embrionário tem a capacidade de se desenvolver em dois órgãos com arquiteturas teciduais e funções especializadas extremamente diferentes como são o ovário e o testículo. O mesmo processo ocorre em camundongos, o principal modelo utilizado para estudos “in vivo” de determinação sexual em mamíferos.

A gônada embrionária normalmente desenvolve-se em testículo ou ovário, mas em alguns casos podem ocorrer anormalidades no processo de desenvolvimento gonadal gerando gônadas disgenéticas. Estas situações são classificadas como distúrbios do desenvolvimento sexual (1) por anormalidades no desenvolvimento gonadal. O termo distúrbio do desenvolvimento sexual (1) foi estabelecido em 2006, no Consenso Internacional sobre anomalias do desenvolvimento sexual, para definir as condições congênitas nas quais o desenvolvimento do sexo cromossômico, do sexo gonadal ou do sexo anatômico é atípico (3, 4).

Apesar do grande avanço nos conhecimentos dos mecanismos envolvidos nos processos de determinação e diferenciação sexual o papel exato dos inúmeros genes, que participam das diferentes etapas deste complexo processo, não está completamente esclarecido (Figura 1).

Figura 1. Cascata de expressão gênica e principais redes reguladoras envolvidas no desenvolvimento sexual. Com base em estudos em humanos e camundongos (genes apresentados em letras maiúsculas), ou apenas em camundongos (letras minúsculas). Apresentação dos principais genes relacionados ao desenvolvimento do testículo (azul) e genes relacionados ao desenvolvimento do ovário (vermelho) que participam das vias reguladoras da diferenciação das células somáticas da gônada indiferenciada nas células de Sertoli ou nas células da granulosa, respectivamente. Com contorno vermelho estão marcados os genes que serão estudados neste trabalho. Modificado de Ono & Harley, 2012 (5).

1.1- Via de sinalização MAPK

As enzimas citoplasmáticas MAPKs são ativadas por uma variedade de estímulos extracelulares, como citocinas inflamatórias, hipóxia e fatores de crescimento (6) e regulam as atividades celulares de divisão, diferenciação, movimento, metabolismo e morte celular programada (7)

As MAPK constituem um módulo de três quinases, formando um sistema regulatório que estabelece uma via sequencial de ativação de proteínas quinase: a MAP quinase quinase quinase (MAPKKK), a MAP quinase quinase (MAPKK) e a MAP quinase (8).

A MAPKKK, primeiro componente do módulo, pode ser ativada tanto por fosforilação quanto por interação com uma proteína de ligação chamada GTP da família Ras ou Rho. As MAPKKK quando ativadas, fosforilam e ativam a próxima quinase no módulo, a MAP quinase quinase (MAPKK). As MAP quinases (MAPK) constituem a quinase final no módulo de ativação e fosforilam seus substratos, constituídos geralmente por fatores de transcrição. Cerca de 70 genes, que são traduzidos em várias isoformas de splicing alternativo, codificam todo o sistema de MAPK, o que permite o amplo leque de funções de cascata (9).

As três principais MAPKs que participam do mecanismo de sinalização incluem a via p38, JNK (c-Jun N terminal quinase extracelular) e ERK (quinase regulada pelo sinal 1/2). Enquanto a ativação das MAPK-p38 e JNK está geralmente associada à apoptose, a ativação da MAPK-ERK 1/2

inibe a atividade da apoptose (10, 11), através da regulação de processos de mitose, meiose e funções pós-mitóticas em células diferenciadas (7).

A existência de vários componentes em cada etapa das diferentes vias da MAPK, a regulação destes componentes, bem como o envolvimento deles com outros mecanismos, determinam a especificidade de sinalização pela cascata da MAPK. Anormalidades na regulação dos componentes da via MAPKs podem causar doenças (9).

Figura 2. Representação esquemática da via de transdução de sinal da MAP quinase ERK 1/2.

Quando um agonista (como o $\text{TNF-}\alpha$, por exemplo) liga-se ao receptor tirosina quinase, ocorre uma auto-fosforilação e cooptação de um complexo de proteínas (Shc/Grb2/Sos) que ativa Ras próximo à membrana. Ras ativa c-Raf-1, ou MAP quinase quinase quinase, que por sua vez fosforila a próxima quinase do módulo, MEK 1/2 (MAP quinase quinase). MEK 1/2 forma um complexo citoplasmático com ERK 1/2 (MAP quinase) inativada; quando MEK fosforila ERK, as duas se separam, e ERK ativada transloca-se rapidamente para o núcleo, onde fosforila substratos tais como fatores de transcrição (FT), incrementando a transcrição de genes envolvidos em diferentes processos (12).

1.2- Interações da via Mapk com a cascata da determinação gonadal

No início do processo de desenvolvimento testicular, o gene *Sry* ativa a transcrição do *Sox9*, que promove a diferenciação de células precursoras nas células de Sertoli (13, 14). Uma alça de estímulo positivo entre o *Sox9* e o *Fgf9* mantém a expressão do *Sox9*. Neste ambiente, o balanço entre os sinais *Fgf9* (masculino) e *Wnt4/Rspo1* (feminino) desvia-se em favor do *Fgf9*, estabelecendo o domínio da cascata gênica masculina e o desenvolvimento testicular. Diferentemente, a via feminina se inicia na ausência da alça de retrocontrole positivo entre *Sox9* e *Fgf9*, o que permite que o sistema gênico feminino *Wnt4/Rspo1* bloqueie a expressão do *Fgf9* e direcione o desenvolvimento no sentido ovariano (5).

Porém, para que o processo da determinação testicular normal se inicie é necessário que ocorra a expressão adequada, no tempo e espaço, do *Sry*. Vários fatores reguladores da atividade transcricional do *Sry* atuam nesta fase inicial, dentre estes fatores estão o *Wt1* (+kts), *Gata4/Fog2* e *Nr5a1*(15, 16).

Uma maior potência de ativação transcricional induzida pelos fatores *Nr5a1* e *Gata4* parece depender de um processo de fosforilação destes fatores transcricionais. Os estudos demonstraram que o *Gata4* liga-se ao promotor do *Sry* apenas após sua fosforilação, que é realizada por uma Map quinase, especificamente a p38 Mapk (17, 18). Outros componentes da via Mapk tem sido também implicados na regulação da expressão do *Sry* e de outros genes da cascata testicular (19, 20). Em camundongos foi demonstrado que a produção de testosterona pelas células de Leydig é

estimulada pelo Fgf9. O estímulo da esteroidogênese nas células de Leydig normais de camundongos pelo Fgf9 ocorre via ativação do sistema Akt e Erk 1/2 (20).

1.3- Via de sinalização de Map3k4

Os camundongos XY com perda de função da Map3k4 apresentam sexo reverso gonadal. Nestes animais, o tecido gonadal no dia 11.5 pós coito apresenta poucas células Sry-positivas e observa-se neste período na gônada em formação a presença de células Fox2-positivas. Células Fox2 – positivas correspondem a linhagens celulares ovarianas equivalentes às linhagens celulares pré-Sertoli do testículo (19).

Em camundongos, a presença de alelos homozigotos com perda de função para o Map3k4 causa falha no desenvolvimento do cordão testicular interrompendo o desenvolvimento testicular normal. Já a interrupção do Map3k1, não gerou anormalidades no desenvolvimento testicular dos animais (19). A redução da proteína Map3k4 por “knockout” genético ou pela perda do complexo Map3k1 – Map3k4 podem causar defeitos semelhantes. O aumento da ligação entre o complexo Map3k4 em Map3k1 ou “knockout” de Map3k4 pode afetar a via “downstream” de WNT através de Axin1. A Axin1 é um inibidor da via de sinalização WNT, pois interage com a β -catenina reduzindo a proteína WNT (21, 22). Esse resultado de aumento ou estabilização da β -catenina é um efeito causador de reversão sexual

masculina para feminina em gônadas XY, por reduzir a expressão de Sox9 (23).

1.4- Via de sinalização Map2k3 e Map2k6

As quinases Map2k3 e Map2k6 também parecem participar do processo de formação testicular. Embora o estudo de animais knockout para a Map2k3 isolada e para a Map2k6 isolada tenha revelado nenhuma ou poucas repercussões na gônada masculina respectivamente, a associação de perda de função nestas duas Mapks leva a um atraso no processo de determinação testicular e a formação transitória de ovotesticular é observada. Estes achados sugerem um possível papel destas Mapks talvez com atividades parcialmente redundantes na determinação testicular (24).

1.5- Via de sinalização Map3k1

Nas gônadas embrionárias de camundongos o gene *Map3k1* é expresso no dia 11.5 pós-coito, período da determinação do sexo gonadal no animal. No dia 13.5 pós-coito ele é altamente expresso, tanto nas gônadas femininas como nas masculinas, especificamente nas células de Sertoli e cordões testiculares. Neste período observa-se que a gônada masculina mutada é maior do que a gônada normal, cujo significado não é conhecido (25).

Os estudos em camundongos demonstraram que o Map3k1 não é um gene essencial para a determinação testicular. Porém, esses estudos se basearam na análise de camundongos knockout Map3k1DKD cujo índice de letalidade é menor e as alterações testiculares observadas são discretas (25, 26). A análise de camundongos Map3k1mPHD tem sido difícil pela sua alta e precoce letalidade embrionária relacionada a gravidade do fenótipo apresentado pelo animal. No entanto, camundongos Map3k1mPHD/+ são viáveis, e sua análise revelou defeitos no desenvolvimento de células B, na sinalização de células T, no tecido cardíaco e no desenvolvimento testicular. Charlaftis e colaboradores reavaliaram as características histológicas testiculares em estudos de camundongos *knockin* mutantes heterozigotos com inativação do núcleo PHD da Map3k1(27). Nestes animais a histologia testicular corada pela técnica de hematoxilina e eosina identificou células de Leydig condensadas e em número diminuído (27).

1.6- Gene MAP3K1 e DDS em humanos

Em 2010, Pearlman e colaboradores realizaram estudos de mapeamento gênico em pacientes com DDS 46,XY familiar e utilizando a análise de ligação gênica e cálculo de logaritmo de probabilidade (LOD score) identificaram uma região candidata no cromossomo 5 (5q11.2), potencialmente relacionada à causa da anormalidade gonadal dos pacientes em avaliação. Nesta região está localizado o gene *MAP3K1* (28).

O gene *MAP3K1*, também denominado *MEKK1*, é um membro da família das MAPK quinases. Este gene é composto por 20 exons que

codificam uma serina/treonina quinase constituída por 1512 aminoácidos, que pode ser ativada por vários fatores estimulatórios e que exerce seus efeitos através de diferentes moléculas efetoras situadas a jusante na cascata de sinalização MAPK, incluindo JNK, ERK1/2, e p38 (12).

MAP3K1 é o único componente da cascata MAPK que contém além do domínio quinase um núcleo PHD (*homeodomain plant motif*) também denominado domínio RING (Figura 3)(29). Esta característica permite que a MAP3K1 atue tanto em processos regulatórios das vias de fosforilação como nos processos de ubiquitinação proteica e desempenhe um papel fundamental na regulação de mecanismos celulares essenciais em vários sistemas biológicos. A importância da MAP3K1 no sistema imune, tecido cardíaco, placa auditiva, tumorigênese e câncer foi demonstrada em modelos animais e em humanos (29).

Figura 3. Representação da via de sinalização do MAP3K1 e suas funções de indução de sobrevivência ou morte celular. A- Representação dos domínios da proteína MAP3K1 e a ligação com a diferentes proteínas de regulação ou fosforilação. **B-** Via de sinalização da MAP3K1 desencadeando sobrevivência celular ou apoptose. (29)

No estudo já citado de Pearlman, a mutação identificada no *MAP3K1*, c.634-8T>A, p.Val211_Val212insIleGln, causadora de uma mudança no “splice” do RNA, segregava nos membros de uma família com onze portadores de disgenesia gonadal 46,XY. No mesmo estudo, foram identificadas; a mutação p.Gly616Arg em uma segunda família com cinco portadores de disgenesia gonadal 46,XY e duas outras novas mutações p.Leu189Pro e p.Leu189Arg no *MAP3K1* em dois de onze pacientes com disgenesia gonadal 46,XY forma esporádica avaliados (28).

Experimentos em cultura de linfoblastos de três dos quatro pacientes portadores das mutações no *MAP3K1* foram realizados com o objetivo de avaliar possíveis alterações na função da MAP3K1. Estes estudos revelaram que a regulação da fosforilação de alvos da cascata MAPK nas linhagens celulares mutadas estava alterada. A fosforilação do p38 em duas (p.Leu189Arg e p.Val211_Val212insIleGln) das três linhagens celulares era maior do que nas células controles e os níveis de ERK fosforilado estavam aumentados nas três linhagens celulares mutadas em comparação às linhagens controles. Desta forma, comprovou-se que a atividade de regulação da via de sinalização MAPK era modificada pela presença de mutações no *MAP3K1*, levando a um aumento na ativação desta via de sinalização em linhagens celulares linfoblastóides dos pacientes (28).

A localização na região N terminal da MAP3K1 era uma característica comum a todas as 4 mutações identificadas no *MAP3K1*. Nesta região, encontra-se um conhecido sítio de interação com a proteína RHOA (Rashomolog gene Family), a qual atua regulando positivamente a atividade quinase da MAP3K1 (30).

A análise de experimentos de imunoprecipitação seguidos por western blot e citometria de fluxo em lisados de linhagens celulares mutantes para *MAP3K1* e células controles demonstrou um aumento de ligação da proteína RHOA ao complexo MAP3K1, o que poderia justificar o aumento da ativação da via de sinalização MAPK observada nos estudos prévios.

Na investigação de variantes alélicas no *MAP3K1*, novas mutações foram encontradas em dois indivíduos com disgenesia gonadal 46,XY isolada (p.Pro153Leu, p.Lis246Glu) e em um caso familiar (p.G727_I761del)(28). Nestes novos estudos os efeitos resultantes da interação da MAP3K1 mutante com cofatores e fatores alvos de fosforilação foram confirmados e ampliados (28). Assim, foi confirmado o aumento de fosforilação dos alvos p38 e ERK1/2 da via MAPK e aumento de ligação das proteínas RHOA, MAP3K4, FRAT1 e AXIN1 em linhagens celulares linfoblastóides mutantes bem como em experimentos realizados em linhagens celulares de teratocarcinoma humano NT2/D1 transfectadas com o cDNA do *MAP3K1* mutado (31).

Estudos prévios em condrócitos humanos mostram que a atividade transcricional do SOX9 é regulada pela ligação de RHOA à MAP3K1 (32-34), e que o aumento dos níveis de SOX9 em condrócitos induzido por FGF2 é mediado pela via de sinalização quinase da MAP (35). Neste contexto, mutações no gene *MAP3K1* poderiam mediar um balanço entre as sinalizações de determinação sexual masculina e feminina, diminuindo as atividades dos genes *SOX9* e *FGF9* (genes envolvidos no desenvolvimento testicular) e aumentando a atividade dos genes *WNT4* e *CTNNB1* (β -catenina) (genes envolvidos no desenvolvimento ovariano) (31, 36, 37).

No estudo de Das e colaboradores 4 variantes (p.D806N, p.Q1028Q, p.T428T, p.942insT) no *MAP3K1* foram identificadas em 10 pacientes com DDS 46,XY de várias etiologias, não apenas disgenesia gonadal, incluindo uma família com duas irmãs afetadas. Todas essas variantes foram

descritas como polimorfismos pelos bancos de dados como o NCBI SNP e Ensembl, porém os autores sugerem baseados na análise “in silico” que a variante p.D806N é deletéria para a proteína (38).

Embora o gene *MAP3K1* não seja usualmente requerido para a determinação testicular em camundongos, mutações ativadoras neste gene podem causar anormalidades no desenvolvimento gonadal como demonstrado no estudo de pacientes com disgenesia gonadal 46,XY descrito por Loke e colaboradores. A ligação do MAP3K1 a proteína RHOA no desenvolvimento masculino acarreta em uma fosforilação normal de p38 e ERK1/2 o que levaria a MAP3K4 bloquear a via da β -catenina. Já no desenvolvimento feminino temos a presença de uma hiper fosforilação de p38 e ERK1/2 ativando a via da β -catenina e bloqueando a via desencadeada por SOX9. (Figura 3) (37).

Figura 4. Esquema representativo da participação dos cofatores e alvos da via do MAP3K1 no processo de determinação gonadal masculino e feminino em humanos.

Fatores da via testicular são mostrados em azul e ovarianos em vermelho. Fatores que promovem a ação de alvos abaixo são mostrados com setas. Fatores que bloqueiam a ação de alvos abaixo são mostrados com linhas vermelhas. Modificado de Loke *et al.*, 2013 (37).

Outro ponto de ligação entre a via MAPK e o processo de determinação testicular é o receptor FGFR2; um receptor da família tirosina quinase, que atua como receptor de superfície celular para o FGF9 no tecido gonadal. Embora os estudos com modelos animais sejam fortemente indicativos da participação do gene FGF9 e do seu receptor FGFR2 no desenvolvimento testicular, em humanos a presença de mutações nesses genes não foram ainda relacionadas à etiologia dos DDS.

O receptor FGFR2 possui sítios de ligação extracelulares e intracelulares e interage com as vias de transdução de sinais: RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT e fosfolipase Cy (PLCy) (Figura 5) (39-41). Ligantes da

via MAPK/ERK (“mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinases”) podem interagir nesta região do receptor e modificações na estrutura conformacional do FGFR2 poderia comprometer esta interação e consequentemente interferir nas funções celulares de inibição de apoptose e de proliferação celular (42).

Figura 5. Representação da cascata de sinalização do FGF-FGFR que está interligado com a cascata de MAPK. Na presença do ligante FGF o receptor dimerico FGFR que sofre fosforilação da sua porção quinase e desencadeia uma sinalização intracelular com fosforilação de outras proteínas como por exemplo MAPK,PI3K,AKT (43)

Justificativa do estudo

A demonstração em modelos animais e a identificação da participação da via MAPK nas redes gênicas de regulação do processo de determinação testicular humano motivaram a realização do estudo em uma grande coorte

de pacientes com disgenesia gonadal 46,XY. A presença de alterações no gene da via de sinalização MAP quinase, *MAP3K1* foi avaliada bem como as repercussões funcionais no processo de fosforilação. Neste estudo determinamos a coexistência de vários defeitos moleculares em genes da via de desenvolvimento sexual masculina em pacientes com DDS 46,XY e discutimos as possíveis interações destes defeitos com as mutações no *MAP3K1* e no fenótipo dos pacientes.

2 – *Objetivos*

1. Pesquisar mutações no gene *MAP3K1*, componente da via MAPK em pacientes portadores de DDS 46,XY por anormalidades gonadais e realizar a segregação das variantes alélicas nas famílias de afetados.
 2. Realizar a caracterização funcional das variantes alélicas identificadas no gene *MAP3K1*;
 - 2.1- Através da realização de ensaio Elisa para quantificação intracelular de fosforilação das proteínas AKT e ERK1/2 em cultura celular primária de fibroblastos de pacientes portadoras das variantes alélicas *MAP3K1* e *FGFR2* e de controles normais;
 - 2.2- Através da realização de estudo “in vitro” por estabelecimento de linhagens celulares linfoblastóides de sangue periférico das pacientes portadoras das variantes alélicas na *MAP3K1*, avaliando as repercussões funcionais destas alterações no processo de fosforilação dos ERK e p38.
 3. Avaliar a presença de apoptose nas células testiculares das pacientes portadoras das variantes alélicas *MAP3K1* e *FGFR2* pelas técnicas de imunohistoquímica com anticorpos anti-Caspase 3 para comparar com os achados de tecidos testiculares norma e de pacientes com DDS 46,XY de diferentes etiologias.
-

3 – Casuística e Métodos

Este estudo foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº 12349). Todos os pacientes ou seus responsáveis foram esclarecidos sobre o estudo e assinaram o Termo de Consentimento Pós-Informado e Termo de Assentimento autorizando sua participação.

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

O estudo “in vitro” das MAP3K1 mutadas utilizando linhagens celulares linfoblastóides imortalizadas foi realizado no Albert Einstein College of Medicine da Yeshiva University no laboratório do Dr. Harry Ostrer em estudo colaborativo.

3.1- Pacientes

Quarenta e sete pacientes com diagnóstico de DDS 46,XY acompanhados no Ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento (Unidade A1MN 1003) da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram selecionados para o estudo. O diagnóstico de DDS 46,XY por anomalias do desenvolvimento gonadal baseou-se na avaliação clínica, hormonal, citogenética, radiológica e histológica (Tabelas 8 a 13 em Anexos).

Nestes pacientes, alterações em genes classicamente reconhecidos como membros da cascata da determinação testicular foram previamente pesquisados

pelo método de sequenciamento por Sanger ou por painel customizado de genes-alvo por sequenciamento em larga escala.

O diagnóstico etiológico dos 45 pacientes estudados consistiu em:

- Disgenesia Gonadal XY – forma completa (DGC)- n= 17

- Disgenesia Gonadal XY – forma parcial (DGP)- n= 29

- DDS 46,XY de causa não conhecida ou indeterminada (DDS Ind)- n=1. A

suspeita diagnóstica de DDS 46,XY por deficiência da 5 α redutase 2 foi realizada pela avaliação hormonal dessa paciente, porém o estudo pelo método de Sanger do gene que codifica a enzima 5 alfa redutase 2 (*SRD5A2*) identificou apenas uma mutação em heterozigose, não estabelecendo o diagnóstico molecular de deficiência da 5 α redutase 2. Esta paciente foi então incluída no estudo do painel customizado para DDS (Paciente 47).

No decorrer do estudo, alguns dos pacientes com variantes alélicas identificadas no *MAP3K1* foram submetidos a estudos funcionais, a saber:

Estudo *in vitro* em fibroblastos obtidos por biópsia de pele e mantidos em cultura celular foram realizados em: duas pacientes (Pacientes 10 e 12) e na mãe das duas pacientes com DG 46,XY (Pacientes 18 e 19) carreadora das mesmas variantes alélicas das filhas.

Estudo *in vitro* em células linfoblastóides foram realizados na paciente com DDS indeterminado (Paciente 47) além dos indivíduos que realizaram o estudo em fibroblastos de pele (Pacientes 10 e 12, e mãe das pacientes 18 e 19). Não foi possível obter o material das duas irmãs portadoras de variantes alélicas no

MAP3K1 e *FGFR2* para realização dos ensaios funcionais em células linfoblastoides e fibroblastos.

Figura 6. Fluxograma dos pacientes selecionados e métodos utilizados no estudo

Figura 7. Fluxograma dos pacientes selecionados para imunohistoquímicas e os tipos de teste realizados nos tecidos.

3.2- Grupo de indivíduos controles

Cento e cinco homens e quarenta e duas mulheres adultos normais foram selecionados para constituir o grupo controle para a análise de variantes alélicas identificadas no estudo dos genes *MAP3K1*.

Foram utilizados biópsia de pele de dois indivíduos controles: um feminino (46,XX) e um masculino (46,XY).

3.3 - Avaliação Molecular do DNA

3.3.1- Extração do DNA a partir de sangue periférico

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos pacientes e familiares selecionados. Quinze mL de sangue venoso foram colhidos em EDTA 25mM e submetidos ao método de extração com NaCl saturado (44). A primeira etapa da técnica é a lise de hemácias (114 mM de NH_4Cl , 1 mM de NH_4HCO_3) e a segunda etapa é a lise de leucócitos (100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH8, 1 mM de EDTA pH8) utilizando-se SDS (0,2%) e proteinase K (160 mg/mL). A precipitação do DNA foi realizada com etanol absoluto gelado seguida de lavagem com etanol 70% finalizando com suspensão em TE (10:0,1) (10 mM de Tris-HCl pH8, 0,1 mM de EDTA pH8) (45).

A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Alemanha) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Foi estabelecido que a relação acima de 1,75 entre esses dois comprimentos de onda seria a ideal para a caracterização da pureza do material (46).

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

O gene *MAP3K1* (NM_005921.1) foram utilizados oligonucleotídeos específicos para os seus 20 exons conforme o artigo de Pearlman e colaboradores (28). Todos os oligonucleotídeos foram revisados utilizando a sequência genômica

dos genes do banco de dados “Ensembl” sendo feito as devidas correções e otimizações em alguns exons (www.ensembl.org/index.html).

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

O protocolo básico de amplificação para o gene *MAP3K1* constituiu-se de um ciclo inicial de temperatura inicial de 94°C durante 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, temperatura variável dependendo do par de oligonucleotídeos utilizado (Tabela 1) por 30 segundos e 72°C durante 1minuto, mais um ciclo final de 72°C por 10 minutos, realizado em um termociclador (Veriti® Thermal Cycler, Life Technologies, NY, EUA).

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos específicos para amplificação dos exons do gene *MAP3K1*.

Exon	Oligonucleotídeos específicos	Produto (pb)	Temperatura de hibridação (°C)
1.1	F: 5'CGA GAT TGC CGA GAG GAA G 3' R: 5'AAG GAA GAG CGG CTG CTC 3'	663	55
1.2	F: 5'ATGTAGCCCGCGAGAGAA3' R: 5'AACAACTCTTCCGCACGTC 3'	722	55
2	F: 5'CCATCCATTCTGTTTGTCTTG3' R: 5'TGGTTTCTTCCAAATGACCAC3'	379	58
3	F: 5'AAATGACTGAAATTTGTGCAGGT3' R: 5'CTGGCCAGTCTTTTCTTGTT3'	479	55
4	F: 5'CTGACCGGATAATAGTTTCT 3' R: 5'GTTTAACTTTGTTTACTATAGGG 3'	388	55
5	F: 5'TGAAAGATTAAATCATGGAAATAGC3' R: 5'CACCTTTAAATGGTCACTGC 3'	398	55
6	F: 5'AATAATTCAGCCTCTAGAACTCTTC3' R: 5'CATGCCCAGCGAACTTTTAG3'	390	55
7	F: 5'TGTGAATGTGAGTTCATGCAG3' R: 5'TCCTGACCTCAAGTGATCCA 3'	248	55
8	F: 5'CCTGCTGTGTTTACTTGCTTTTC3' R: 5' TCTGAGGAAGAAGGGGAAT 3'	295	55
9	F: 5'AAAAATTTCTCAGTGTGGTTTGTC3' R: 5' GTCTCCTTCCCTCAGTTGTTCA3'	327	55
10	F: 5' TGATGCTAAACTCAAAATGCTCTG3' R: 5' CCTTGGACATCATAAAAATCAG 3'	551	57
11	F: 5'TTGTTGCTCAAATTGTCTCA3' R: 5'CACTAGGTGTGAGGCTTGCT3'	282	55

Exon	Oligonucleotídeos específicos	Produto (pb)	Temperatura de hibridação (°C)
12	F: 5'TCACAAGGCATTACATTACTCCTC3' R: 5'TGAGATTAGACAAGGCTGCT 3'	247	55
13	F: 5'TGAGGCAGTTTACAGGATTTTG3' R: 5'GCAACCTATTTCATGCTCTGAGTC3'	500	55
14.1	F: 5'TGCTGAAATGGTTTTTGAAG3' R: 5'GGTTGACAAGGCTGGAAACA 3'	698	55
14.2	F: 5'AACTCCTCTCCTTTATCTCATCA3' R: 5'CTCCCAAGTGCTGGAAT3'	850	55
15	F: 5'GTTTGGGAAGCCAGACTGAA3' R: 5'CACACACGTGGACATATCCTTT3'	345	55
16	F: 5'GCATAAATGCCATCTGTTGCT3' R: 5'GCATAAATGCCATCTGTTGCT 3'	326	55
17	F: 5'CCCTGTGGGTCTGTGAAAAT3' R: 5'GCCTGGCCCCAAATTTTA3'	394	55
18	F: 5'TGCACCTCTGACATGTAGTTCA3' R: 5'AGGGCCACGGACTTCTAGTT 3'	392	55
19	F: 5'TCCACAGAATTCCTGTTTGTACC 3' R: 5'CCATCAAAATTTGCCTCCTG3'	331	55
20	F: 5'GGATGTAAATGTAAGGGTTATGAGG3' R: 5'TTCACCTAGGGCCAGTTCCTT3'	491	55

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

Aproximadamente 30 ng deste produto amplificado foi submetido a uma reação de purificação enzimática com 10 U da enzima “ExoSAP-IT” (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 15 minutos a uma temperatura de

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

O produto da reação de sequenciamento foi transferido para uma placa de 96 poços (“MicroAmpoptical 96-well Reaction Plate”, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e precipitado de acordo com o protocolo de isopropanol/EDTA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Após o acréscimo de 15 µL de formamida (“FormamidaHi-Di”, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em cada poço da placa, esse produto foi submetido a uma eletroforese capilar no sequenciador automático “ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise foi realizada pelo programa “Sequencing Analysis” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Estudo 'in silico' do impacto funcional das novas variantes identificadas

O estudo do impacto funcional das variantes identificadas foi realizado pela análise *in silico* da proteína modificada utilizando-se os programas:

- Mutation taster (<http://mutationtaster.org/>),
- Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>),
- SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) e
- Mutation Acessor (<http://mutationassessor.org/>).
- Human Splice Finder version 2.4.1(<http://www.umd.be/HSF/>)

Estes programas foram utilizados na análise do grau de conservação entre as diferentes espécies das regiões onde se localizam as variantes identificadas no estudo, análise e predição da presença de um novo sítio de “splice”, identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, single nucleotide polymorphism), e para avaliação do grau de comprometimento estrutural das proteínas modificadas.

Os programas abaixo foram utilizados para averiguar a presença e comparar a frequência das variantes alélicas identificadas no estudo com banco de dados populacionais:

- 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/ensembl-browser>),
- dbSNP (Short Genetic Variations, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>),
- ESP6500 (Exome Sequencing Project, <https://esp.gs.washington.edu>)
- ExAC Browser (Exome Aggregation Consorsitum, <http://exac.broadinstitute.org/>)

3.3.3- Estudo do exoma da família portadora das variantes alélicas nos genes *FGFR2* e *MAP3K1*

Para o estudo do exoma na família das portadoras das variantes alélicas nos genes *FGFR2* e *MAP3K1* o DNA genômico extraído previamente dessas pacientes foram submetidos as seguintes etapas:

A) Sequenciamento de nova geração do exoma

A biblioteca para o sequenciamento exômico dos indivíduos selecionados foram preparados com kits comerciais disponíveis para essa finalidade, o “SureSelect^{XT} Human All Exon V5+UTRs” (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA)

-B) Genotipagem por sequenciamento de nova geração

O sequenciamento de nova geração foi realizado em sequenciadores da plataforma Illumina (Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA). As sequências produzidas pela plataforma possuem de 36 a 100 pares de bases, podendo ser lidas tanto em configuração “single-end” (quando apenas uma das extremidades da molécula do DNA é lida), quanto “paired-end” (quando as duas extremidades da molécula do DNA são lidas), permitindo leituras de fragmentos de até 200 pares de base.

O sequenciamento envolve três etapas fundamentais:

1. Confecção de bibliotecas de fragmentos de DNA: O DNA genômico foi fragmentado, de forma mecânica, foram adicionados adaptadores e índice e foi realizada uma amplificação. No caso do painel customizado, as bibliotecas serão enriquecidas em sequências provenientes dos genes previamente selecionados, enquanto que no exomas, estas bibliotecas serão altamente enriquecidas em sequências provenientes das regiões codificadoras de todos os genes do genoma. O enriquecimento foi obtido através da captura das
-

regiões de interesse com a utilização de “beads” magnéticas acopladas a estreptavidina, após uma hibridação do DNA fragmentado com sondas biotiniladas complementares a essas regiões.

2. Amplificação clonal: Nesta etapa, as bibliotecas, com seus fragmentos de DNA ligados aos adaptadores são depositados em uma lâmina especial, denominada “flowcell”, em cuja superfície encontram-se fixados de maneira paralela duas espécies de oligonucleotídeos. Estes são complementares às moléculas adaptadoras acopladas às extremidades dos fragmentos de DNA da biblioteca. Após a ligação dos fragmentos aos seus oligonucleotídeos complementares presentes na superfície da “flowcell”, acontece a clusterização, onde cada molécula é amplificada várias vezes, através de uma reação conhecida como PCR em ponte (“bridge PCR”). Ao final desta etapa, são gerados clones (“clusters”) de moléculas de DNA idênticas à molécula original, ligadas covalentemente à superfície da “flowcell”.
 3. Sequenciamento: Após a amplificação clonal, as moléculas antisense são removidas enzimaticamente e o processo de sequenciamento é iniciado com o acoplamento de um oligonucleotídeo iniciador especial. Em seguida, nucleotídeos modificados com terminadores reversíveis marcados com fluoróforos específicos são adicionados ao meio. A cada ciclo de incorporação, são geradas imagens de toda a superfície da “flowcell” através de um scanner de fluorescência em cada um dos comprimentos de onda específicos para cada fluoróforo. Os “clusters” presentes na superfície da “flowcell” são então identificados e mapeados. A sobreposição das imagens produzidas a cada
-

ciclo de incorporação propicia a identificação da sequência de bases nucleotídicas de cada “cluster” de moléculas, ou seja, a sequência do fragmento que deu origem ao “cluster”.

4. Bioinformática

O grande volume de dados gerados pelos sequenciadores de nova geração requer o emprego de ferramentas de bioinformática altamente sofisticadas, a fim de que as poucas alterações genéticas de interesse sejam identificadas em meio a centenas ou milhares de polimorfismos não relacionados ao fenótipo. Este processo é realizado por diversos programas de computador que funcionam em cadeia (“pipelines”).

Inicialmente, os dados brutos gerados pelo sequenciador (sequências propriamente ditas - arquivo *.fastq) foram mapeadas e alinhadas ao genoma-referência, gerando no final um arquivo *.bam. Em seguida, são listadas todas as alterações divergentes da sequência referência (“Variant Call Format” - VCF), algumas centenas ou milhares de alterações, o que tornaria impossível a verificação manual de cada uma delas. Assim, foi feito um processo automatizado de “filtragem” destas alterações, tipicamente através da comparação com familiares não afetados, através do cruzamento de informações com bancos de dados públicos ou ainda com emprego de algoritmos que predizem “in silico” o impacto funcional de determinadas variantes.

As principais etapas da análise dos dados encontram-se descrita a seguir, de forma resumida:

- Checação da consistência dos arquivos (cujo tamanho varia de dezenas a centenas de gigabytes) e cálculo de estatísticas básicas, como número de sequências produzidas. Nesta etapa, serão utilizados programas padrão de cálculo de integridade como md5sum.

-Alinhamento das sequências das amostras a uma sequência referência do genoma humano (hg19 UCSC ou b37 GRC/NCBI). Nesta etapa, a origem de cada fragmento do DNA da amostra será determinada. Existem vários programas alinhadores e a maioria leva em conta a qualidade da sequência produzida para fazer a melhor escolha. O programa BWA foi utilizado.

-Recalibragem das sequências alinhadas. Como o alinhamento é feito sequência a sequência individualmente, torna-se necessário recalibrar o alinhamento realizado na fase anterior, visto que, em algumas situações, diferentes sequências oriundas da mesma região cromossômica apresentem resultados ligeiramente diferentes de mapeamento (por exemplo, quando existem pequenas inserções, deleções ou repetições no genoma alvo). A recalibragem pode ser considerada um realinhamento, mas agora de forma contextualizada. Nesta etapa, foi utilizada a ferramenta GATK.

-Genotipagem a partir do melhor alinhamento possível. Será realizada a genotipagem da amostra, que consiste em determinar, com bases estatísticas, todos os alelos do genoma da amostra (as bases de cada par do cromossomo para uma dada posição). A ferramenta GATK também foi utilizada para esta etapa. Esta ferramenta identifica SNPs (“Single Nucleotide

Polymorphisms”) e “Indels”. No caso de exomas, pacotes estatísticos como R ExomeDepth ou Pindel para genomas, foram utilizados para identificação de CNVs (“Copy Number Variations” - duplicações ou grandes deleções genômicas).

-Recalibragem da genotipagem. Na fase anterior, os genótipos são calculados levando-se em conta apenas os dados disponíveis do alinhamento. Uma correção ou recalibragem deve ser realizada a fim de que outros parâmetros sejam levados em conta, principalmente populacionais. Sucintamente, nesta fase, falsos positivos são detectados e sinalizados a fim de que sejam descartados do processo. Novamente, módulos do GATK realizam esta tarefa para SNPs e Indels. CNVs identificados não são recalibrados e passam diretamente para a próxima etapa da análise.

-Anotação dos genótipos variantes detectados. Esta etapa consiste em: (a) anotar as variantes encontradas, com “SnpEff” e “AnnoVar”; (b) filtrar de acordo com bancos públicos de variantes (por exemplo, do projeto 1000 genomas), sendo que nesta etapa bancos da variação genética brasileira também são utilizados; e (c) estimar o efeito de cada variante (por exemplo, se neutro ou deletério na proteína sintetizada. VAAST e “PolyPhen” são ferramentas disponíveis para esta tarefa.

-Priorização das variantes candidatas. Com toda a base de dados gerada a partir das etapas anteriores, algoritmos heurísticos de priorização foram empregados para gerar uma lista ordenada e, de preferência, com poucas

variantes para análise do pesquisador. Não existem critérios fixos e padrão para esta priorização. Em geral, considera-se desde parâmetros de alinhamento, como quantidade de *reads*, confirmando a variante até ser uma variante supostamente deletéria ou não.

3.3.4- Desenho de painel de genes-alvo

O painel customizado de genes-alvo associados ao DDS para sequenciamento em larga escala foi elaborado a partir da ferramenta *AgilentSureDesign 2.0* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EUA) e está sendo utilizado na rotina de investigação de pacientes portadores de DDS em acompanhamento no ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas (HC-FMUSP).

Essa ferramenta desenha sondas específicas para seleção e captura das regiões genômicas de interesse (Tabela 1) e está descrita neste trabalho, pois uma nova variante alélica no gene *MAP3K1* foi encontrada em uma paciente com DDS de causa não conhecida estudada por esta técnica. Os resultados encontrados estão descritos no próximo item.

Tabela 2. Listas dos 62 genes que foram estudados no painel customizado para DDS

Genes envolvidos na determinação gonadal						
AMH	DMRT2	LHX1	FOXL2	SOX 9	PBX1	WWOX
CBX2	FGF9	MAMLD1	NANOS3	SRY	AXIN1	PAX2
CITED2	FGFR2	MAP3K1	PTDGS	STAG3	GSK3B	GSK3B
DHH	GATA4	NR0B1	RSPO1	WNT4	NANOS2	
DHX37	FOXL2	NR5A1	RSPO2	WXT1	TCF21	
DMRT1	GDF9	BMP15	SOX 3	ZFPM2	TES	
Genes envolvidos na síntese hormonal						
AKR1C2	AKR1C3	AKR1C4	CYP17A1	CYP19A1	HSD11B1	HSD17B3
HSD3B2	POR	SRD5A2	STAR	RAC1	CYP21A2	
Genes envolvidos com receptores hormonais						
AMHR2	ESR2	FSHR	LHCGR	ESR1		
Genes envolvidos com malformações genitais síndrômicas						
ARX	ATRX	DHCR7	HNF1B	CDH7		

Sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE)

Os SPLE, tanto do painel customizado quanto dos exomas, foram realizados em sequenciadores da plataforma Illumina (*Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA*). As etapas fundamentais do sequenciamento são as que já foram previamente descritas no item anterior para a técnica de exoma.

As variantes alelicas foram analisadas de acordo com o guia do Colegio Americano de Genética Médica e Genômica (47). Novas variantes foram classificadas como patogênicas se essas tivessem preditas como patogênicas em pelo

menos três de oito sites de predição *in silico* utilizados. Variantes com frequência alélica > 0.5% nos bancos de dados populacionais ExAC e 1000 Genomes foram excluídas.

3.4– Avaliação Molecular Tecidual

3.4.1- Cultura primária de fibroblastos oriundos de pele

Cultura primária de fibroblastos dérmicos de pacientes portadores de variantes alélicas no gene *MAP3K1* foi utilizada nos ensaios de quantificação intracelular de proteínas (ERK1/2 e AKT, fosforilado e não fosforilado) pela técnica de detecção colorimétrica.

Desta etapa do estudo participaram: duas pacientes portadoras das variantes alélicas p.Thr657Arg e p.Cys691Arg no gene *MAP3K1* e a mãe de duas pacientes com disgenesia gonadal 46,XY, portadoras das variantes nos genes *MAP3K1* e *FGFR2* (p.Leu639Pro e p.Ser453Leu; respectivamente), carreadora das mesmas variantes.

Os fibroblastos foram obtidos por biópsia de pele (“punch” de 3 mm de diâmetro) da região do antebraço que foi realizado em ambiente ambulatorial com assepsia e anestesia local. Os fragmentos foram coletados em frasco contendo o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco®). Após a coleta o tecido foi cortado em pequenos fragmentos e colocados em placas de 6 poços contendo de 5-8 fragmentos por poço. Esses fragmentos foram mantidos em cultura celular com meio AmnioMaxTM-C100 (Gibco®) com 20% AmnioMaxTM-C100 Supplement(Gibco®) e 1% antibiótico. As placas foram mantidas em cultura em estufa a 37°C e 5%CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Na avaliação

periódica das condições da cultura celular realizadas por microscopia de imersão observou-se após 10 a 12 dias aproximadamente a presença de fibroblastos emergindo do fragmento tecidual inicial/primário. Com a migração e proliferação desses fibroblastos os fragmentos iniciais foram retirados e tratados com tripsina e transferidos para frascos de 75cm². Após a cultura atingir a confluência, o meio foi substituído por meio DMEM. As culturas de fibroblastos tiveram passagens congeladas em nitrogênio líquido para estudos posteriores. Todos os ensaios foram realizados entre as passagens 3^o e a 13^o.

3.4.2- Teste confirmatório de identidade das culturas de células utilizadas

Análise de DNA das células oriundas dos diferentes pacientes e mantidas em culturas celulares foi realizada para a confirmação da pureza e identidade das mesmas.

As grandes dificuldades encontradas no cultivo das linhagens celulares mutadas, justificou a realização deste estudo complementar, visando excluir possíveis contaminações cruzadas entre as linhagens celulares durante a manipulação para realização dos ensaios.

Dessa forma, os DNAs dos fibroblastos de pele das pacientes e dos controles masculino e feminino mantidos em culturas celulares foram extraídos utilizando o kit da Qiagen, Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, Estados Unidos). Após a extração foi usado o kit AmpF_l STR® Identifier KitPCR Reagent (Life Technologies, NY, EUA) para análise comparativa do DNA proveniente das culturas celulares e dos DNAs extraídos de sangue periférico dos doadores dos tecidos estudados.

O protocolo utilizado foi o padronizado pelo *kit* e está descrito a seguir: um ciclo inicial de temperatura inicial de 95°C durante 1 minuto, seguida por 28 ciclos de

94°C por 1 minuto, 59°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguido de 1 ciclo de 60°C durante 60 minutos, realizado em um termociclador (Veriti®ThermalCycler, Life Technologies, NY, EUA).

As amostras amplificadas foram submetidas a uma eletroforese capilar no sequenciador ABI Prism Genetic Analyzer 3130 automatic DNA sequencer (Life Technologies, Foster City, CA, EUA) e analisados pelo programa de análise de fragmentos GeneMapper (Life Technologies, Foster City, CA, EUA) que determina o tamanho de cada fragmento e sua correspondente altura e área do pico no eletroferograma. Uma amostra controle, com tamanho previamente conhecido, foi incluída em todas as eletroforeses, a fim de corrigir possíveis variações na análise do tamanho dos fragmentos.

3.4.3- Imunohistoquímica com anticorpos anti-Caspase-3 para detecção de apoptose celular em tecidos testiculares de pacientes portadoras de variantes alélicas nos genes MAP3K1 e FGFR2

As amostras dos tecidos gonadais das duas irmãs portadoras de DGP, nas quais foram identificadas as variantes alélicas nos genes *MAP3K1* e *FGFR2*, foram submetidas ao ensaio para detecção de apoptose celular utilizando anticorpos anti-Caspase-3 (ab13585 – Abcam, Reino Unido). Os ensaios também foram realizados em tecidos testiculares normais (tecido de paciente com 13 anos de idade) e tecidos gonadais de pacientes com DDS 46,XY de outras etiologias (paciente portador de mutação no gene *NR5A1* e paciente com insensibilidade parcial aos andrógenos) e os achados foram comparados.

Todos os tecidos testiculares, nos quais o ensaio com anticorpos anti-Caspase-3 foram realizados, também foram corados pela hematoxilina-eosina para revisão da histologia testicular.

As lâminas foram analisadas pela Profa Filomena Marino Carvalho da Disciplina de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, segundo os critérios descritos a seguir.

Cortes histológicos corados por Hematoxilina-Eosina

Os cortes histológicos das gônadas corados pela hematoxilina-eosina foram avaliados qualitativamente quanto às seguintes características, com critérios modificados para este estudo de McLachlan e colaboradores(48):

1. Tipo de gônada: Testículo de tipo adulto ou testículo de tipo infantil
 2. Homogeneidade vs. heterogeneidade da histologia
 3. Espessamento da membrana basal dos túbulos seminíferos (ausente, discreto, moderado ou intenso)
 4. Presença ou ausência de fibrose nos túbulos
 - a. Definição de hialinização de túbulo seminífero: Fibrose do túbulo com ausência de células de Sertoli e células germinativas
 5. Diâmetro dos túbulos seminíferos: habitual para o tipo de testículo, reduzido ou dilatado
 6. Densidade do epitélio germinativo dos túbulos: afilamento com presença de lumen ou preservada
 7. Avaliação da população celular nos túbulos
 - a. Sertoli
 - a.1- Síndrome Sertoli-only: sem nenhuma célula germinativa em nenhum dos túbulos da amostra
-

- b. Células germinativas: espermatogônias, espermatócitos, espermátides (espermatogênese) e espermatozoides (espermio gênese).

Hipoespermatogênese:

Redução leve, moderada ou intensa de células germinativas

Espermatogênese até espermátides menores, de núcleos condensados e alongadas

Parada de maturação: definida pela não progressão a partir do estágio visualizado em nenhum ducto da amostra

8. Tecido intertubular: Presença de células de Leydig, formação de agregados nodulares.

Preparação das lâminas para realização da técnica de imunoistoquímica

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo, com espessura de 3µm e distendidos em lâminas histológicas silanizadas

Protocolo do ensaio de imunoistoquímica com anticorpo anti-Caspase-3

A metodologia de imunohistoquímica com anticorpo anti-Caspase-3 foi realizada pelo prestador de serviço APC Laboratório de Anatomia, Patologia e Citologia, o qual já possui o ensaio de Caspase-3 padronizados conforme procedimento anexo (Anexo 1).

Os resultados foram comparados aos resultados previamente obtidos utilizando-se a técnica de TUNEL ("Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling") descritos na Dissertação de mestrado (49).

3.4.4- Critérios de Interpretação da imunoistoquímica

Para avaliação da reação foi utilizado como controle externo positivo corte histológico de intestino com folículos linfoides com centro germinativo evidente (Figura 8). Células da parede de vasos sanguíneos de pequeno calibre se mostraram positivas no padrão citoplasmático e foram utilizadas como controle interno da reação.

Figura 8. Imagens de microscopia de luz de corte histológico de um folículo linfoide (controle de reação) com marcação Caspase-3. Imagens do tecido com o aumento de 40X.

As reações foram realizadas em cortes inteiros da gônada. Toda a área era examinada ao menor aumento microscópico (40X, Zeiss KS 300, versão 3.0) para verificar homogeneidade ou não da coloração e seleção das áreas para avaliação da expressão da Caspase-3. Foram desconsideradas áreas de coloração negativa duvidosa (artefatos de fixação, controle interno negativo). Foram consideradas positivas as colorações citoplasmática, da membrana e nucleares. Foram avaliados pelo menos 50 túbulos seminíferos para os casos de coloração homogênea. A fração de células positivas foi determinada semi-quantitativamente nas células de interesse. Os resultados dos casos com padrão heterogêneo de coloração foram expressos por dois critérios:

- 1) média de células nos túbulos contados (50 a 80 túbulos) e
- 2) área de maior fração de células positivas (hotspot).

A intensidade de coloração não foi computada pela possível influência das condições técnicas nesta variável, já que o material foi colhido e processado em datas e condições diferentes.

3.4.5- Mensuração por método colorimétrico dos componentes não fosforilado e fosforilado das proteínas AKT e ERK1/2 em fibroblastos cultivados de pacientes portadores de variantes no gene *MAP3K1*

Para avaliar a atividade das principais vias de sinalização celular nas quais o MAP3K1 e o FGFR2 estão envolvidos foi utilizado um ensaio comercial em microplaca, que mensura por método colorimétrico os componentes não fosforilado e fosforilado das proteínas AKT e ERK1/2. Os elementos mensurados são componentes importantes das cascatas de sinalização da via P13K e da via RAS-MAPK respectivamente, em resposta ao estímulo de FGF9. Os experimentos foram realizados utilizando fibroblastos cultivados originários de pele de indivíduos portadores de DDS 46,XY com mutações identificadas nos genes e de indivíduos XY e XX controles.

Nestes estudos foram utilizados kits comerciais de detecção colorimétrica In-Cell ELISA (Thermo Scientific Pierce, Illinois, USA) com os anticorpos específicos para detecção de ERK1/2 e AKT, fosforilado e não fosforilado. Estes ensaios foram realizados em culturas celulares tratadas e não tratadas com a proteína FGF9 (ab50034 – Abcam, Reino Unido) que é um fator de crescimento estimulador das vias em avaliação. As vantagens do uso dessa metodologia de quantificação

intracelular de proteínas é que além de apresentar uma boa resolução, sua execução é mais simples do que a técnica tradicional de Western Blot, uma metodologia trabalhosa e semi-quantitativa.

As células foram cultivadas e plaqueadas em microplacas de 96 poços (10^4 células/ poço) incubadas “overnight” a 37°C e 5%CO₂. Após 24 horas foram lavadas com PBS e cultivadas com meio livre de soro fetal bovino e antibióticos por mais 24 hrs para redução de suas atividades para níveis basais. Após o período de “jejum” seguiu-se o tratamento dessas células com FGF9 25ng/ml por 20 min. Na sequência, as células foram tratadas com formaldeído 4% seguida das etapas do kit de permeabilização, marcação e bloqueio seguido de incubação “overnight” a 4°C com o primeiro anticorpo, que consistia em AKT fosforilado ou não fosforilado (Pierce- ThermoFischer Scientific, Estados Unidos) (ensaio A) e ERK1/2 fosforilado e não fosforilado (Pierce- ThermoFischer Scientific, Estados Unidos) (ensaio B). Os anticorpos fazem parte do kit. As etapas seguintes foram o tratamento com peroxidase (HRP conjugate – “horseradish peroxidase”), subtrato TMB e solução de parada para TMB. Em até meia hora foi feita a leitura da absorbância em comprimento de onda de 450nm na leitora de microplaca (HQR Bras Serum- Model BSII). Os ensaios foram realizados com amostras em triplicatas. Os controles internos da reação consistiram em poços sem a presença da proteína e sem a presença do anticorpo para exclusão de “background” na leitura de absorbância. Após a leitura calculou-se as médias das triplicatas para cada condição experimental. Depois dividiu-se pelo valor de “background” e foram elaborados os gráficos comparativos dos valores de absorbâncias.

Dois ensaios independentes (Ensaio 1 e Ensaio 2) foram realizados.

No **Ensaio 1** as culturas celulares utilizadas foram: os controles XX e XY e a cultura com as células oriundas da mãe das pacientes com DG 46,XY (Pacientes 18 e 19) e carreadora das mesmas alterações das filhas no gene *MAP3K1* e *FGFR2* (p.Leu639Pro e p.Ser453Leu, respectivamente) e da paciente portadora da variante alélica p.Thr657Arg do *MAP3K1* (Paciente 12).

No **Ensaio 2** as culturas celulares utilizadas foram: as mesmas utilizadas no Ensaio 1 mais a cultura celular da paciente portadora da variante p.Cys691Arg do *MAP3K1* (Paciente 10).

A análise estatística foi realizada com o teste *t*-Student com o cálculo do desvio padrão entre as triplicatas de cada ensaio para cada amostra. Foi considerado estatisticamente significativo quando o valor $p < 0,05$. Este é um teste independente de diferença de médias. O software utilizado foi o R (<http://www.R-project.org>).

3.4.6- Estudo “in vitro” em células linfoblastóides de pacientes portadores de variantes no gene *MAP3K1*.

Para avaliar a repercussão funcional das variantes identificadas no *MAP3K1* realizou-se a quantificação da fosforilação de p38 e ERK por ensaio de citometria nas células linfoblastóides mutadas, a mesma metodologia descrita no trabalho Loke e colaboradores (37).

Vinte mililitros de sangue periférico de 4 indivíduos portadores de variantes no *MAP3K1* deletérias no estudo em sites de predição *in silico* foram coletados em tubos específicos contendo aditivos ACD (ácido citrico- citrato de sódio-dextrose). A separação das células foi realizada por gradiente de ficoll e as células

mononucleares presentes no sangue periférico (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) foram isoladas e colocadas em meio RPMI (ThermoFisher Scientific, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino, sem antibióticos e conservadas em estufa a 37°C e 5%CO₂. A cultura celular foi mantida até a confluência de 2 milhões de células.

A quantificação da fosforilação de p38 e ERK nas células linfoblastóides mutadas foi realizada por ensaio de citometria de fluxo. A amostra "setup" foi utilizada para medir a autofluorescência interna durante a citometria de fluxo. Um controle normal foi utilizado em todas as experiências, HG02277 LCL obtido a partir do biorrepositório Coriell, linhagem celular previamente estabelecida a partir do Projeto 1000 Genome, com o genótipo normal com base em todo o sequenciamento do genoma. Ensaio de citometria das variantes com a quantificação da fosforilação de p38 e ERK foram normalizadas para expressão total de p38 e ERK, respectivamente (eixo Y representa fluorescência normalizada) e comparadas de uma forma emparelhada pelo teste *t*-Student. A fosforilação das proteínas p38 e ERK1/2 foram aumentadas para as culturas mutantes em comparação com controle positivo HG0227 como observado sendo esse resultado estatisticamente significativo com *p* <0,001. Este método é altamente sensível, permitindo calcular a expressão das proteínas mesmo em pouca quantidade de células.

As pacientes que participaram desse estudos foram: as pacientes 12 e 10 com DG completa portadoras das variantes p.Thr657Arg, p.Cys691Arg respectivamente, a paciente de etiologia não conhecida (Paciente 47) portadora da variante c.384+1G>T em região de "splicing" do gene *MAP3K1* e a mãe das pacientes com DG parcial portadoras das variantes nos genes *MAP3K1* e *FGFR2* (p.Leu639Pro e p.Ser453Leu, respectivamente) (Pacientes 18 e 19). A paciente 35 portadora da

variante p.Leu447Trp no gene *MAP3K1* não estava disponível para participar do estudo.

Este estudo foi realizado em colaboração e desenvolvido pelo grupo do Dr. Harry Ostrer e Dr. John Loke no Departamento de Patologia e Genética e Pediatria do Albert Einstein College of Medicine em Nova Iorque nos Estados Unidos, grupo de pesquisa responsável pelos principais trabalhos publicados sobre o gene *MAP3K1*.

4 – Resultados

4.1- Resultados Avaliação Molecular

4.1.1- Resultados do estudo molecular do gene *MAP3K1*

A pesquisa de mutações no gene *MAP3K1* pela técnica de Sanger no grupo de 46 pacientes portadores de DDS 46,XY por anormalidades do desenvolvimento gonadal, constituído por 3 casos familiares e 43 esporádicos, identificou 21 variantes alélicas (Tabela 4).

Tabela 3. Variantes alélicas encontradas no gene *MAP3K1* pelo método de Sanger

Posição das Variantes alélicas c.DNA	Alteração na proteína	Referência das Variantes	Frequência Alélica (ExAC Browser)
c.81 C>T	p.Gly27Gly (p.G27G)	rs185050655	0.001742
c.482+45C>T	-	rs7731700	0.5000
c.351 G>C	p.Ala117Ala (p. A117A)	rs28710284	0.7955
c.482+37A>T	-	Alteração não descrita	-
c.483-11C>A	-	rs832567	0.6132
c.764 A>G	p.Asn255Ser (p.N255S)	rs 56069227	0.02033
c.1284 G>A	p.Thr428Thr-	rs832575	0.8479
c.1340 T>G	p.Leu447Trp (p.L447W)	Alteração não descrita	-
c.1566 C>T	p.Thr522Thr (p.T522T)	rs2229882	0.04744
c.1916 T>C	p.Leu639Pro (p.L639P)	Alteração não descrita	-
c.1970 C>G	p.Thr657Arg (p.T657R)	Alteração não descrita	-
c.2072 T>C	p.Cys691Arg (p.C691R)	Alteração não descrita	-
c.2369+49A>G	-	rs895380	0.1496
c.2416 G>A	p.Asp806Asn (p.D806N)	rs702689	0.5984
c.2716 G>A	p.Val906Ile (p.V906I)	rs832582	0.7648
c.2832_2834delAAC	p.Thr949del	rs67794501	0.7393
c.2816 C>G	p.Ser939Cys (p.S939C)	rs45556841	0.01515
c.3084 A>G	p.Gln1280Gln (p.Q1280Q)	rs3822625	0.07206
c.3190 A>C	p.Arg1064Arg (p.R1064R)	rs832583	0.7653
c.3667-13G>A	-	rs16886463	0.1492
c.3983-83 A>G	-	Alteração não descrita	-

Sequência referência do transcrito NM_005921.1/ ENST00000399503 (www.ncbi.nlm.nih.gov/ / www.ensembl.org/).ExAC Browser (exac.broadinstitute.org/transcript/ENST00000399503)

O estudo de mutações no gene *MAP3K1* identificou oito variantes alélicas não sinônimas sendo quatro variantes novas não descritas na literatura todas em heterozigose (Figura 9). Cinco variantes sinônimas foram identificadas, todas previamente descritas na literatura. O transcrito ENST00000399503 (www.ensembl.org) foi utilizado como sequência referência para esta avaliação. As demais variantes (n=8) foram variantes intrônicas das quais apenas duas não foram descritas na literatura.

Figura 9. Localização das variantes alélicas deletérias do MAP3K1. As variantes já descritas na literatura foram identificadas na parte superior da proteína e as descritas neste trabalho na parte inferior (28, 31, 37, 50). Neste trabalho também foi identificada uma variante na região de *splice* da proteína (c.834+1G>T) que foi representada na parte inferior a nível de DNA e foi identificada pela técnica de sequenciamento em painel que será relatado posteriormente.

No exon 7 do gene, foi identificada uma nova variante alélica em heterozigose em uma paciente portadora de DGP 46,XY esporádica (Paciente 35). A troca de base c.1340 T>G corresponde à substituição UUG (leucina, Leu ou L) na posição 447 da proteína, pelo códon UGG (triptofano, Trp ou W) (Figura 10- A). Não foi possível fazer a análise da família desta paciente.

No exon 10 do gene, foi identificada uma nova variante alélica em heterozigose em 2 irmãs portadoras de DGP 46,XY (Pacientes 18 e 19). A troca de base c.1916 T>C corresponde à substituição CUG (leucina, Leu ou L) na posição 639 da proteína, pelo códon CCG (prolina, Pro ou P) (Figura 10-B). A análise do DNA dos pais dessas pacientes identificou a presença da mesma variante em heterozigose na mãe.

A variante p.Leu447Trp está localizada no domínio estrutural RING (“Really Interesting New Gene”) da proteína MAP3K1. O domínio RING, constitui um domínio tipo “zinc finger” que é encontrado em várias E3 ubiquitina ligases. De modo semelhante às outras proteínas que contem este domínio, responsável pela ubiquitilação de proteínas, a MAP3K1 cataliza a poliubiquitilação da c-Jun e da ERK1/2, resultando na degradação dessas proteínas em proteossomas (29, 51, 52)

Essas pacientes apresentam heterozigose digênica, com a presença uma variante no gene *FGFR2* (p.Ser453Leu), que foi identificada em estudo anterior (49).

No exon 11 do gene, foram identificadas duas novas variantes alélicas em heterozigose em duas pacientes portadoras de DGC 46,XY esporádica. A troca de base c.1970 C>G corresponde à substituição ACA (treonina, Thr ou T) na posição 657 da proteína, pelo códon AGA (arginina, Arg ou R) (Paciente 12) (Figura 10-C). A troca de base c.2072 T>C corresponde a substituição UGU (cisteína, Cys ou C) na

posição 691 da proteína, pelo códon CGU (arginina, Arg ou R) (Paciente 10) (Figura 10-D). Não foi possível analisar a família dessas pacientes.

As 3 novas variantes p.Leu639Pro, p.Thr657Arg e p.Cys691Arg identificadas no gene *MAP3K1* estão localizadas no domínio funcional “Armadillo- type fold” ou “ARM-fold like” representado na Figura 9. Este domínio estrutural consiste em uma sequência característica e repetitiva de aminoácidos, que dá origem a uma “superhelix”, caracterizada por uma ampla superfície carregada positivamente, e que interage com as superfícies ácidas de proteínas e ácidos nucleicos (InterPro-www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR016024).

Estudos em sites de predição “in silico”: “Polyphen”, “SIFT” e “Mutation Taster” sugerem que as variantes alélicas p.Leu639Pro, p.Thr657Arg, p.Cys691Arg possam ter efeitos deletérios para a proteína, enquanto os estudos para as variante alélicas p.Asn255Ser, p.Asp806Asn, p.Val906Ile, p.Ser939Cys, sugerem que constituem alterações benignas apesar de promoverem troca de aminoácidos. Essas alterações estão descritas em banco de dados como “Ensembl” (www.ensembl.org) como polimorfismos (Tabela 4). Assim, não foram feitos os estudos em controles normais dessas variantes alélicas.

Tabela 4. Variantes alélicas e seus scores potenciais para alteração deletéria na proteína

Paciente	Variante Alélica (nível proteico)	Gene	Polyphen Score	Mutation Taster Probabilidade- Score
35	p.Leu447Trp	MAP3K1	1.00 (sensibilidade 0.00, especificidade 1.00)	0.9999 -61
18 e 19	p.Leu639Pro +	MAP3K1	0.999 (sensibilidade 0.14; especificidade 0.99)	0.9999- 98
	p.Ser453Leu	FGFR2	0.951 (sensibilidade: 0.79; especificidade: 0.95)	0.9999- 145
12	p.Thr657Arg	MAP3K1	0.996 (sensibilidade 0.55 especificidade 0.98)	0.9999- 71
10	p.Cys691Arg	MAP3K1	0.998 (sensitivity: 0.27; specificity: 0.99)	0.999-112

As frequências das variantes alélicas: p.Leu447Trp, p.Leu639Pro, p.Thr657Arg e p.Cys691Arg foram avaliadas em uma amostra de controles com 147 indivíduos normais pela técnica de PCR seguida de sequenciamento automático. Não foram identificadas essas variantes em nenhum dos 294 alelos analisados. As variantes sinônimas foram avaliadas em sites de predição que demonstraram ser polimorfismos (frequência alélica descrita na Tabela 4). Já as variantes intrônicas não descritas na literatura foram testadas no site de predição Mutation Taster e mostram ser benignas a proteína.

Figura 10. Eletroferograma das novas variantes alélicas não sinônimas encontradas no gene *MAP3K1*. Todas as variantes foram identificadas em heterozigose.

4.1.2- Resultado do Exoma da família portadora das variantes alélicas nos genes *FGFR2* e *MAP3K1*

No estudo do exoma dessa família, a corrida do sequenciamento de nova geração no aparelho Illumina resultou em uma corrida de boa qualidade, porém houve um problema durante a corrida na fase do PCR em ponte (“bridge PCR”) o que resultou em resultados parciais, mas com boa qualidade para análise.

Dessa forma, foi possível analisar a corrida e a partir dos passos de filtragem descritos no diagrama abaixo conseguimos obter 8 variantes alélicas resultantes em distintos genes:

Figura 11. Diagrama com a descrição dos passos de filtragem na análise do exoma e a quantidade de variantes alélicas resultantes

Os oito genes e as respectivas variantes alélicas identificadas na etapa final do processo de filtragem da análise do exoma da família estão descritas nas tabelas abaixo (Tabela 5 e 6). A técnica confirmou as variantes alélicas nos genes *FGFR2* e *MAP3K1* previamente encontradas utilizando-se a técnica de Sanger:

Tabela 5. Descrição dos genes encontrados na análise final do exoma

Gene	Descrição
H6PD	É um gene de codificação de proteína. Doenças associadas com H6PD incluem deficiência de reductase cortisona 1 e hiperandrogenismo devido à deficiência de reductase cortisona. Estão envolvidos o metabolismo de carbono e glicose -6 -fosfato desidrogenase. Um parálogo importante deste gene é G6PD
MACF1	Desempenha um papel importante na estabilização -ErbB2 dependente de microtúbulos em células do córtex. Atua como um regulador positivo da via de sinalização Wnt e receptor e está envolvida na translocação de AXIN1 e o seu complexo associado (composto de APC, e CTNNB1 GSK3B) a partir do citoplasma para a membrana da célula .
PDE4DIP	Pode funcionar como componentes sequestrantes de ancoragem da via dependente de cAMP de Golgi e/ou os centríolos
ZNF661	A proteína codificada por este gene pertence à família de proteínas de dedo de zinco C2H2 - tipo. A função exata deste gene não é conhecida, no entanto, as proteínas de dedo de zinco são conhecidas por interagir com o DNA e funcionam como reguladores de transcrição
ENPP6	Atividade diester fosforico hidrolase e atividade glicerofosfolina colinephosphodiesterase. Um paralogo importante do gene é o ENPP3
MAP3K1	Doenças associadas com MAP3K1 incluem DDS,46XY parcial e completa. Está relacionado com a cascata de sinalização de PI- 3K e MAPK e vias da ERK, JNK.
FGFR2	Membro da família de receptores do fator de crescimento de fibroblastos, sequência de aminoácidos é altamente conservada entre os membros e ao longo da evolução. Membros da família de FGFR diferem nas suas afinidades de ligantes e distribuição nos tecidos. É constituído por uma região extracelular, composto por três domínios do tipo imunoglobulina, um único segmento que atravessa a membrana e um domínio hidrofóbico de tirosina quinase citoplásmico. A porção extracelular da proteína interage com fatores de crescimento de fibroblastos, pondo em movimento uma cascata de sinais, em última análise, influenciando a mitogênese e a diferenciação. Mutações nesse gene estão associadas à síndrome de Crouzon, Síndrome de Pfeiffer, Craniosynostosis, síndrome de Apert, síndrome de Jackson-Weiss, Beare-Stevenson cutis, síndrome Saethre-Chotzen, e craniossinostoses sindrômicas.
GDPGP1	Específica e altamente eficiente GDP-D-glucose fosforilase regulando os níveis de GD-D-glucose nas células.

Tabela 6. Descrição das variantes alélicas encontradas no exoma

Gene	Variante alélica	Frequência	SIFT	Polyphen	Mutation Taster	Mutation Assessor
<i>H6PD</i>	p.Arg396Trp	0,00001657	D	D	D	L
<i>MACF1</i>	p.Val816Ile	0,0003	D	D	D	L
<i>PDE4DIP</i>	p.Thr23Arg	0	D	D	D	L
<i>ZNF661</i>	p.His130Leu	0	D	D	D	H
<i>ENPP6</i>	p.Arg82His	0,00004164	D	D	D	M
<i>MAP3K1</i>	p.Leu639Pro	0	D	D	D	L
<i>FGFR2</i>	p.Ser453Leu	0	D	D	D	M
<i>GDPGP1</i>	p.Gly90Asp	0,0000659	D	D	D	M

Legenda: D- deletéria, T- tolerada, L- low risk (baixo risco), M- medium risk (médio risco), H- high risk (alto risco) de acordo com os sites de predição.

Analisando a tabela 6, que apresenta a descrição dos genes e respectivas variantes alélicas identificadas no sequenciamento exômico, verificamos que as variantes alélicas no *MAP3K1* e *FGFR2* previamente identificadas pela técnica de Sanger não estão descritas nos sites populacionais (frequência zero na população mundial) e são deletérias nos quatro sites de predição *in silico* avaliados (SIFT, Polyphen, MutationTaster e Mutation Assessor). No site Mutation Assessor a variante do gene *MAP3K1* apareceu como baixo risco e a variante do gene *FGFR2* médio risco.

Dentre as demais variantes alélicas encontradas não parecem relacionadas com o fenótipo da doença, pois a descrição da função gene (Tabela 5) não parece interferir na cascata de sinalização do desenvolvimento gonadal. Porém, a variante alélica no gene *ZNF661* é bem interessante por ser uma proteína dedo de zinco que interage e regula transcrição gênica com resultados de sites de predição indicando seu potencial risco deletério.

4.1.3- Resultados do Painel Genômico Customizado

O sequenciamento utilizando o painel de genes customizado para DDS identificou a variante alélica c.834+1G>T no *MAP3K1* na paciente 47. Nesta paciente, a suspeita diagnóstica inicial baseada no perfil hormonal era de DDS 46,XY por deficiência da 5 α redutase 2, porém o estudo pelo método de Sanger do gene *SRD5A2* identificou apenas uma mutação em heterozigose, não estabelecendo o diagnóstico molecular da doença. No sequenciamento pelo painel de genes para DDS foram encontradas duas variantes alélicas novas em heterozigose: a variante nova c.834+1G>T no gene *MAP3K1* causadora de uma mudança no “splice” do RNA (Human Splice Finder, Mutation taster) e da variante já encontrada previamente pela técnica de Sanger no gene *SRD5A2* (p.Leu112Val).

O DNA das pacientes portadoras das variantes alélicas p.Leu447Trp, p.Leu639Pro, pThr647Arg, p.Cys691Arg no *MAP3K1* foram reestudadas pela metodologia sequenciamento por painel de genes customizado para DDS na busca de outras possíveis variantes alélicas em genes reconhecidamente relacionados aos DDS. Nenhuma outra variante alélica potencialmente deletéria além da variante no *MAP3K1* já identificada por Sanger foi encontrada nestas pacientes.

4.1.4- Estudo de segregação familiar das variantes alélicas identificadas

A análise de segregação familiar foi possível apenas para as variantes p.Leu639Pro e c.834+1G>T no *MAP3K1*.

Segregação familiar da variante p.Leu639Pro

A variante p.Leu639Pro no gene *MAP3K1* foi identificada em heterozigose na mãe das duas irmãs portadoras de DG parcial (pacientes 18 e 19) e não foi

identificada no pai. O mesmo padrão de segregação em heterozigose ocorreu para a variante p.Ser453Leu no *FGFR2*, presente na mãe e ausente no pai (Figura 12).

Figura 12. Heredograma da família das pacientes 18 e 19 portadoras das variantes alélicas nos genes *FGFR2* e *MAP3K1*

Segregação familiar da variante c.834+1G>T

A variante c.834+1G>T no gene *MAP3K1* não foi identificada no pai, mãe e irmão normal da paciente 47, indicando a ocorrência de uma mutação de novo nessa paciente, já a variante p.Leu112Val no gene *SRD5A2* foi identificada em heterozigose no pai e ausente na mãe e no irmão (Figura 13).

Figura 13. Heredrograma da família da Paciente 47 portadora das variantes nos genes *MAP3K1* e *SRD5A2*.

4.2.- Estudos Funcionais

4.2.1- Estudo funcional *in vitro* por quantificação dos componentes fosforilado e não fosforilado das proteínas AKT e ERK1/2 em células de pacientes portadores de variantes no gene *MAP3K1* mantidas em cultura

O estudo realizado em culturas primárias de fibroblastos de quatro indivíduos portadores de variantes no *MAP3K1* e de indivíduos controles, utilizando o *kit* comercial “In-Cell ELISA Colorimetric Detection Kit” (Thermo Fisher Scientific), que emprega um método colorimétrico, não permitiu estabelecer diferenças no estado de fosforilação das proteínas AKT e ERK1/2 entre as células mutadas e as células de indivíduos normais.

As grandes dificuldades encontradas na manutenção e na replicação das linhagens celulares mutadas inviabilizou a repetição dos ensaios. O número

reduzido de ensaios realizados, apenas dois, limitou a análise dos resultados obtidos.

Nos dois ensaios independentes realizados foram avaliados os valores das relações de absorbância (AKT fosforilado/AKT não fosforilado) e (ERK1/2 fosforilado/ERK não fosforilado) de amostras em triplicatas, correspondentes às culturas celulares de um controle XX e de um controle XY, e das amostras de culturas celulares com as variantes identificadas no *MAP3K1*. No ensaio 1 foram avaliadas as duas variantes p.Thr657Arg no *MAP3K1*, e p.Leu639Pro no *MAP3K1* associada a p.Ser453Leu no *FGFR2* e no segundo ensaio, a variante p.Cys691Arg no *MAP3K1* foi adicionada as amostras estudadas no primeiro ensaio.

Embora os resultados das amostras em triplicatas tenham tido uma variação inter-ensaio satisfatória, a comparação entre os resultados obtidos nos dois ensaios não mostrou diferença nas relações de absorbância entre os compostos fosforilados (AKT fosforilado e ERK1/2 fosforilado) e os compostos não fosforilados correspondentes entre as células controles e as células mutadas mantidas em cultura conforme representado nos gráficos abaixo.

A

B

Grafico 1. Valores de média de absorbancia para AKT fosforilado e não fosforilado para cada diferente linhagem mutada. A- Ensaio 1. B-Ensaio 2. Eixo X-Culturas de fibroblastos oriundos da pele de indivíduos controles (CN) XY e XX e de pacientes portadores de variantes no *MAP3K1* e da mãe das pacientes carreadora das mesmas variantes das filhas, variantes no *FGFR2*(**) e na *MAP3K1* após estimulação com FGF9. Eixo-Y-médias de absorbancias comparado de forma pareada pelo teste t- Student's. *p valor< 0,05 estatisticamente significativo em relação ao CNXY.

A

B

Grafico 2. Valores de média de absorbância para ERK fosforilado e não fosforilado para cada diferente linhagem mutada. A- Ensaio 1. **B-**Ensaio 2. Eixo X-Culturas de fibroblastos oriundos da pele de indivíduos controles (CN) XY e XX e de pacientes portadores de variantes no *MAP3K1* e da mãe das pacientes carreadora das mesmas variantes das filhas, variantes no *FGFR2*(**) e na *MAP3K1* após estimulação com FGF9. Eixo-Y-médias de absorbâncias comparado de forma pareada pelo teste t- Student's. *p valor< 0,05 estatisticamente significante em relação ao CNXY.

4.2.2- Estudo funcional *in vitro* em células linfoblastóides

Neste estudo funcional realizado em linhagens de células linfoblastóides foi mensurada por citometria de fluxo a fosforilação das proteínas p38 e ERK1/2 nas células de 4 indivíduos portadores de mutações no *MAP3K1*; três pacientes com as respectivas variantes: p.Thr657Arg, p.Cys691Arg, c.834+1G>T e a mãe das pacientes 18 e 19, todas portadoras da variante p.Leu639Pro (associada à variante no *FGFR2*) e comparada com os resultados do estudo das mutações no *MAP3K1* p.Leu189Pro, c.634-8T> A e c.2180-2A> G, previamente descritas pelo grupo de pesquisadores colaboradores (37). Estas últimas amostras representam controles positivos do estudo.

Aumento da fosforilação das proteínas p38 e ERK1/2 foi verificado em todas as linhagens linfoblastoides mutantes avaliadas quando comparadas com a linhagem selvagem de células linfoblastoides (HG0227), resultado semelhante ao observado nos controles positivos constituído pelas linhagens mutantes previamente descritas (p.Leu189Pro, c.634-8T>A e c.2180-2A>G) e incluídas no ensaio. A análise pareada pelo teste t de Student's mostrou que o aumento da fosforilação das proteínas p38 e ERK1/2 nas linhagens celulares mutadas foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (Grafico 3).

Esses resultados corroboram com os dados descritos na literatura, que evidenciam um aumento de fosforilação de proteínas quinases da via MAP em células de pacientes portadores de DDS 46,XY com mutações identificadas na *MAP3K1*.

Grafico 3. Valores de fluorescência normalizados para as taxas de ERK fosforilado (pERK) e p38 fosforilado (pp38) para cada diferente linhagem linfoblastóide mutada. HG02277- linhagem celular controle. As linhagem p.L189P, c.634-8T>A e c.2180-2A>G são variantes alélicas de pacientes com DDS já descritas em trabalho anterior (37). Amostra "setup" foi utilizada para mensurar a fluorescência interna do ensaio de citometria de fluxo. Quantificações de fosforilação de p38 e ERK foram normalizados com a expressão total de p38 e ERK respectivamente (Eixo -Y-axis são as fluorescências normalizadas) e comparado de forma pareada pelo teste t- Student's, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$. Legenda "Ratio" = taxa.

4.3- Resultados Avaliação Molecular Tecidual

4.3.1- Resultados dos ensaios para detecção de apoptose nos tecidos gonadais parafinados das pacientes portadoras das variantes alélicas nos genes *FGFR2* e *MAP3K1* utilizando a técnica de imunohistoquímica com anticorpos anti-Caspase-3

Para esse estudo foram utilizados tecidos parafinados das duas irmãs com disgenesia gonadal parcial (Pacientes 18 e 19) e tecidos testiculares controles constituídos por tecido testicular normal, tecidos testiculares de uma paciente portadora de mutações no gene *NR5A1* e tecidos testiculares de uma paciente portadora de insensibilidade parcial aos andrógenos (PAIS). Uma comparação do aspecto estrutural dessas gônadas e das marcações de apoptose foi realizada.

A reação mostrou coloração citoplasmática e de membrana em espermatogônias e espermatócitos. Células de Sertoli foram negativas em todos os casos. Nos casos de células de Leydig positivas, estas apresentaram fraca expressão citoplasmática.

Tabela 7. Comparação dos achados nas reações de imunohistoquímica com anticorpos anti-Caspase-3 em testículos de pacientes portadores de variantes alélicas no MAP3K1 e de outras etiologias de DDS 46,XY

Paciente	Idade da cirurgia (a)	Posição dos testículos	Tipo de padrão histológico testicular	Células identificadas nos túbulos seminíferos	Porcentagem de células germinativas coradas	Outras células coradas
DGP MAP3K1 e FGFR2 (Paciente18)	10	pélvica	Adulto	Sertoli (componente principal), espermatogônia, espermatócitos e raras espermátides	100%	Leydig
-DGP MAP3K1 e FGFR2 (Paciente 19)	1	pélvica	Infantil	Sertoli e espermatogônias	10-90% Média 40% Máximo: 90%	Leydig
DGP NR5A1	5	tópica	Adulto	Sertoli (imaturas e normais), espermatogônia, espermatócitos e raras espermátides	20%	-
PAIS AR	1	inguinal	Infantil	Sertoli e espermatogônias	0-90% Média: 40% Máximo: 90%	-
Tecido testicular normal**	13	tópica	Adulto	Sertoli, espermatogônias espermatócitos, espermátides e espermatozoides	0	-

** Paciente submetido a gonadectomia em cirurgia oncológica para remoção de rabdomiossarcoma embrionário paratesticular

- Paciente com disgenesia gonadal parcial 46,XY portadora das mutações nos genes *FGFR2* e *MAP3K1* (Paciente 18)

O tecido gonadal foi retirado no procedimento cirúrgico realizado aos dez anos de idade cronológica e apresentou testículo bem formado, tipo adulto, com

número e tamanho de túbulos seminíferos preservados. Discreto espessamento da membrana basal. Epitélio germinativo com moderado afilamento, predomínio de células de Sertoli esinais de espermatogênese até espermatíde de núcleos redondos, não alongadas. Células de Leydig presentes, dentro da normalidade. A Caspase-3 foi positiva em praticamente 100% das células germinativas (morfologia de gônias e espermatócitos), padrão citoplasmático, com raras células espermatocíticas com fraca positividade nuclear. Presença de raras espermatídes maiores com o mesmo padrão de positividade. Fraca positividade citoplasmática em células de Leydig. Reação negativa em células de Sertoli (Figura 14).

Figura 14. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo disgenético da Paciente 18. Imagens do tecido gonadal com o aumento de 40X. **A** - Imagem do testículo obtida com coloração de hematoxilina e eosina. **B** - Imagem do testículo obtida com a reação da técnica de TUNEL. **C**- Imagem do testículo com reação da Caspase.

- Paciente com disgenesia gonadal parcial 46,XY portadora das mutações nos genes *FGFR2* e *MAP3K1* (Paciente 19)

O tecido gonadal retirado no procedimento cirúrgico realizado com um ano de idade cronológica. Na lâmina corada por Hematoxilina e Eosina verificou-se testículo bem formado, padrão pré-puberal, com numerosos túbulos seminíferos presentes, diâmetro pequeno (infantil). Presença de células de Leydig. Túbulos tem epitélio

germinativo que ocupa toda a luz composto por numerosas células de Sertoli e espermatogônias sem sinais de espermatogênese. A Caspase-3 foi positiva em espermatogônias, em um padrão predominantemente citoplasmático com alguns núcleos corados. A distribuição de células positivas é irregular (suspeita de problemas técnicos), com média de 40% das células coradas. Fraca positividade foi observada nas células de Leydig e as células de Sertoli não apresentaram marcação (Figura 15).

Figura 15. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo disgenético da Paciente 19. Imagens do tecido gonadal com o aumento de 40X. **A** - Imagem do testículo obtida com coloração de hematoxilina e eosina. **B** - Imagem do testículo obtida com a reação da técnica de TUNEL. **C**- Imagem do testículo com reação da Caspase.

- Paciente com disgenesia gonadal parcial 46,XY com mutação identificada no gene *NR5A1* (p.Trp302Cys e p.Gly146Ala). O tecido gonadal retirado por

procedimento cirúrgico aos cinco anos de idade cronológica apresentou na lâmina de Hematoxilina e Eosina tecido testicular com presença de túbulos seminíferos com padrão infantil e adulto (sem imagens). Na lâmina com marcação anti-Caspase-3 foi identificado no tecido infantil reação negativa (ausência de marcação amarronzada) e no tecido adulto foi presente coloração amarronzada em 20% das espermatogônias (Figura 16). Não há resultados prévios da técnica de TUNEL em tecido gonadal desta paciente para comparação de resultados.

Figura 16.Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo disgenético da Paciente com mutação no gene *NR5A1*. Imagens do tecido gonadal com o aumento de 40X.

- Paciente com insensibilidade parcial aos andrógenos (PAIS) com a mutação p.Arg586Cys identificada no gene do receptor androgênico (AR). O tecido gonadal retirado no procedimento cirúrgico realizado com 1 ano de idade cronológica apresentou na lamina corada por Hematoxilina e Eosina testículo de tipo infantil. Tubulos com espermatogonias sem sinais de espermatogênese e células de Sertoli com morfologia habitual foram visualizados. As células estromais não apresentavam morfologia de células de Leydig. A presença de marcação pela Caspase-3 foi fraca a

moderada, com distribuição extremamente irregular, em até 90% das gônias, mas com algumas áreas, mas com média de 40% na amostra tecidual toda (Figura 17).

Figura 17. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo de um paciente com insensibilidade parcial aos andrógenos. Imagens do tecido gonadal com o aumento de 40X. **A** - Imagem do tecido obtida com coloração de hematoxilina e eosina. **B** - Imagem do tecido obtida com a reação da técnica de TUNEL. **C**- Imagem do tecido com reação da Caspase.

- Tecido testicular normal. O testículo de um paciente portador de rabdomiossarcoma embrionário paratesticular foi retirado no procedimento cirúrgico oncológico realizado aos treze anos de idade cronológica. O testículo apresentava padrão histológico de testículo adulto com células de Leydig em área focal e agregados de células de Sertoli (nódulos de Sertoli). Túbulos com afilamento do

epitélio germinativo, muitos aparentemente compostos somente por células de Sertoli e alguns raros com gônias e diferenciação até espermátides. Raríssimos túbulos tem espermiogênese. A marcação com Caspase-3 foi negativa em toda a amostra (Figura18).

Figura 18. Imagens de microscopia de luz de corte histológico do testículo controle normal. Imagens do tecido gonadal com o aumento de 40X. **A** - Imagem do tecido obtida com coloração de hematoxilina e eosina. **B** - Imagem do tecido com reação da Caspase

5 – Discussão

O grande avanço nos conhecimentos das vias gênicas envolvidas nos processos de determinação e diferenciação sexual tem ratificado a alta complexidade deste processo e a cada dia novas interações entre diferentes vias de sinalização e entre novos genes e genes já conhecidos estão sendo adicionadas neste processo. A via MAPK também participa do processo de desenvolvimento gonadal embora, os mecanismos envolvidos ainda não estejam completamente esclarecidos.

Em camundongos, foi demonstrado que o gene *Map3k4* é essencial para determinação testicular, uma vez que a falta de atividade desta proteína acarreta a falha do desenvolvimento dos cordões testiculares e a desorganização do tecido gonadal em formação. Por outro lado, os estudos com animais *knockin* para o gene *Map3k1* demonstraram uma menor repercussão no tecido testicular, que apresenta uma redução do número de células de Leydig.

Porém, em pacientes com disgenesia gonadal 46,XY foram identificadas diferentes variantes alélicas não sinônimas no gene *MAP3K1*, (28, 31, 37, 49) cujos estudos funcionais confirmaram uma atividade alterada das proteínas MAP3K1 mutadas comparadas com a proteína MAP3K1 selvagem. Estes achados sugerem fortemente a participação destas mutações na etiologia das anormalidades do desenvolvimento testicular observadas nestes pacientes.

Com o objetivo de pesquisar a presença de mutações no gene *MAP3K1* numa coorte de pacientes brasileiros portadores de disgenesia gonadal 46,XY este estudo foi iniciado. Nesse momento, a técnica utilizada

na pesquisa de variantes alélicas nos genes alvo em DDS no nosso laboratório era a técnica de Sanger, trabalhosa e demorada. Nesse contexto, os 20 exons do gene *MAP3K1* foram estudados em 46 dos 47 pacientes pertencentes ao grupo selecionado para o estudo e a grande maioria dos resultados obtidos, como as 21 variantes alélicas identificadas no *MAP3K1*, das quais 4 variantes não sinônimas provavelmente deletérias, formam baseados nesta metodologia. No decorrer do estudo, tornaram-se disponíveis o sequenciamento de genes por estudo do painel customizado para DDS e do exoma. Pela técnica de painel customizado, uma nova variante no *MAP3K1* foi identificada em uma paciente não inicialmente selecionada para o estudo e que foi incorporada à casuística, a partir do achado dessa nova variante. As técnicas de sequenciamento por painel customizado e do exoma foram também utilizadas no estudo, como adjuvantes buscando informações complementares às previamente identificadas no estudo por Sanger.

Baseados nos resultados obtidos, confirmamos que o gene *MAP3K1* é um gene polimórfico. Na coorte de pacientes portadores de DDS 46,XY que estudamos, 21 variantes alélicas no *MAP3K1* foram encontradas, a maioria polimorfismos já descritos. Seis novas variantes alélicas (c.482+37A>T, p.Leu447Trp, p.Leu639Pro, p.Thr657Arg, p.Cys691Arg e c.3983-83A>G) foram identificadas nos pacientes com disgenesia gonadal 46,XY e a nova variante c.834+1G>T em uma paciente com DDS 46,XY sem causa esclarecida. Das 3 novas variantes alélicas intrônicas identificadas no estudo (c.482+37A>T, c.834+1G> T e c.3983-83A>G), apenas a variante

c.834+1G>T foi classificada como deletéria à proteína MAP3K1 na análise no site de predição para alteração de “splicing”, “Human Splice Finder”.

As cinco variantes exônicas sinônimas (p. Ala117Ala, p.Gly27Gly, p.Thr428Thr, p.Thr522Thr, p.Arg1064Arg) identificadas no *MAP3K1* consistiam em polimorfismos previamente descritos. Das e colaboradores identificaram a variante alélica p.Asp806Asn em quatro pacientes com hipospádia associada com anormalidades gonadais e sugeriram que este polimorfismo poderia ser deletério para a proteína, baseado na análise “in silico” da proteína modificada em sites de predição e análise da conservação do aminoácido (37). Na nossa casuística, essa variante alélica foi identificada em 37 dos 44 pacientes estudados, e em 15 dos 37 pacientes foi encontrada em homozigose. Dados do site 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org>) e Ensembl (www.ensembl.org) mostram que na população em geral a frequência da variante alélica “modificada” em heterozigose é de 45% e em homozigose de 25%. A frequência da variante alélica “modificada” no grupo de pacientes brasileiros estudados foi de 16% em heterozigose e de 34% em homozigose. Dessa forma, consideramos que essa variante foi um polimorfismo frequente em nossa casuística, aparentemente sem relação com a etiologia da doença. Por se tratar de um polimorfismo, essa variante não foi pesquisada em indivíduos normais da nossa população.

As quatro novas variantes alélicas exônicas e não sinônimas identificadas em heterozigose, p.Leu639Pro, p.Leu447Trp, p.Thr657Arg e p.Cys691Arg, foram todas classificadas como deletérias para a proteína nos

estudos de predição “in silico”, não foram identificadas em indivíduos controles brasileiros estudados e não estão descritas nos bancos de dados populacionais. Estas características sugerem fortemente um papel dessas variantes no fenótipo dos pacientes.

A utilização da técnica de rastreamento genético por painel customizado nas 5 pacientes com variantes identificadas no *MAP3K1* por Sanger e a análise do exoma na família portadora das variantes alélicas digênicas (genes *FGFR2* e *MAP3K1*) demonstraram a ausência de variantes deletérias em outros genes, que reconhecidamente participam da cascata de desenvolvimento sexual masculino.

As 4 novas variantes exônicas identificadas no gene *MAP3K1* neste estudo estão localizadas em domínios funcionais importantes da proteína, p.Leu447Trp no domínio RING e p.Leu639Pro, p.Thr657Arg e p.Cys691Arg no domínio “Armadillo- type fold” ou “ARM-fold like”

Na região do domínio N-terminal do *MAP3K1*, entre os resíduos 370-559, localiza-se uma região de ligação ao ERK, que contém o domínio RING. A mutação p.Leu447Trp localiza-se neste domínio. O domínio RING é responsável pela atividade E3 ubiquitina-ligase do *MAP3K1*, que realiza a ubiquitinação do ERK e sua posterior degradação pelo proteossoma. (29, 51, 52). Desta forma, mutações na região RING do *MAP3K1* poderiam interferir na atividade de ubiquitinação e degradação do ERK. As variantes p.Leu639Pro, p.Thr657Arg e p.Cys691Arg identificadas no *MAP3K1* estão localizadas no domínio funcional “Armadillo- type fold” ou “ARM-fold like” situado entre os resíduos 566 e 783. Este domínio é encontrado na β -

catenina e é o tipo de domínio proteico importante para transdução de sinal de WNT durante o desenvolvimento embrionário.(53)

A maioria das variantes alélicas descritas na literatura no gene *MAP3K1* não estão localizadas em nenhum domínio específico da proteína, exceto duas (p.Gly616Arg e p.G727_1761del) que se encontram no domínio “Armadillo- type fold” como as descritas neste trabalho. Porém essas variantes não tiveram estudos funcionais realizados pois não estava disponível a linhagem celular das pacientes (28). Especulamos, se a presença de modificações estruturais nessas regiões da proteína poderia interferir na ligação de fatores importantes para a atividade normal do MAP3K1 na via de masculinização gonadal.

A análise de segregação familiar foi possível para as variantes c.834+1G>T e p.Leu639Pro. O estudo da variante intrônica revelou que ela não estava presente em nenhum membro da família estudado. A variante p.Leu639Pro presente nas duas irmãs portadoras de DGP foi identificada em heterozigose na mãe das pacientes e não foi encontrada no pai. Estas pacientes também apresentam uma variante alélica (p.Ser453Leu) deletéria em heterozigose no gene *FGFR2*, cuja segregação familiar é idêntica à da variante no *MAP3K1*.

A segregação das variantes alélicas c.834+1G>T e p.Leu639Pro nas respectivas famílias reforçaram o provável envolvimento dessas variantes no fenótipo dos pacientes. A presença das variantes nos genes *MAP3K1* e *FGFR2* em heterozigose na mãe das duas pacientes com DG parcial familiar

não compromete esta indicação, pois nenhum papel desses genes no desenvolvimento e/ou função ovariana foram reconhecidos até o momento.

A identificação da associação de variantes alélicas em diferentes genes envolvidos na diferenciação masculina como observado nas duas pacientes em que o estudo de segregação foi possível, indica que os DDS possam não ser doenças exclusivamente monogênicas.

A identificação de variantes alélicas nos genes *NR5A1* (p.Arg313Cys) e *MAP3K1* (p.Gln237Arg) foi descrita por Mazen e colaboradores em uma paciente 46,XY, que apresentava genitália externa atípica, gônadas palpáveis em região inguinal, ausência de derivados Mullerianos e um incremento discreto nos níveis de testosterona após estímulo com hCG. Esta mesma mutação no gene *NR5A1* foi também descrita em um paciente 46,XY com genitália externa masculina normal e infertilidade. Embora a variante alélica no gene *MAP3K1* não tenha características fortemente deletérias nos sites de predição *in silico*, os autores consideraram que esta associação de variantes poderia ser a responsável pela diversidade do fenótipo dos pacientes portadores da mesma mutação no *NR5A1*, sugerindo uma doença de origem digênica (54)

Como comentado anteriormente, uma variabilidade na apresentação fenotípica dos pacientes portadores de DDS por anormalidades do desenvolvimento gonadal pode ser observada entre os membros afetados de uma família e portadores da mesma mutação gênica. Esta variabilidade pode ser explicada pela presença de fatores “moduladores” que interfeririam nos efeitos de uma anormalidade gênica.

Um estudo detalhado da família composta por duas irmãs com disgenesia gonadal parcial, não portadoras de anormalidades ósseas e com variantes deletérias nos genes *FGFR2* (p.Ser453Leu) e *MAP3K1* (p.Leu639Pro) foi realizado pelas características inéditas desta condição.

Embora os estudos com modelos animais sejam fortemente indicativos da participação do gene *FGF9* e seu receptor *FGFR2* no desenvolvimento testicular, em humanos a presença de mutações nesses genes não foram ainda relacionadas à etiologia dos DDS (49)

Mutações “missense” no *FGFR2* com ganho de função e hiperativação deste receptor são amplamente reconhecidas como a causa etiológica de diferentes síndromes: Crouzon, Pfeiffer, Jackson-Weiss e Apert que apresentam anormalidades congênitas esqueléticas, classicamente não acompanhadas por anormalidades genitais (55, 56).

Bagheri-Fam e colaboradores descreveram uma paciente alemã portadora de craniossinostose e disgenesia gonadal 46,XY, na qual uma mutação no gene *FGFR2* c.1025G>C (p.Cys342Ser) foi identificada (57). Para justificar o fenótipo da paciente, os autores consideraram que a expressão e função do *FGFR2* é diferente nos tecidos gonadais e ósseos.

Com o uso frequente de técnicas de sequenciamento de alto rendimento, exoma e genoma, estes achados de anormalidade em múltiplos genes da cascata de determinação gonadal tornar-se-ão comuns. Frente a esta nova situação, o impacto da cada mutação de diferentes genes na etiologia da disgenesia gonadal deverá ser avaliado. Para esclarecer se a ação combinada de proteínas modificadas por defeitos gênicos contribui

para a anormalidade do desenvolvimento testicular estudos funcionais complexos deverão ser realizados.

Estudos anteriores utilizando ensaios de imunohistoquímica (TUNEL e Ki-67) nos tecidos gonadais parafinados dessas pacientes foram realizadas para avaliação da proliferação e apoptose celular nestes tecidos. Os resultados iniciais obtidos utilizando a técnica de TUNEL indicaram um aumento do nível de apoptose nas células testiculares (Sertoli e germinativas) (49). Porém, o uso desta técnica em tecidos parafinados tem algumas restrições, especialmente pela possibilidade de resultados falsos positivos. Por isso, novos ensaios de imunohistoquímica com anticorpos anti-Caspase-3 foram realizadas nos tecidos gonadais das pacientes e de controles. A análise evidenciou um maior número de células germinativas coradas (apoptóticas) nos tecidos testiculares das duas irmãs com disgenesia gonadal parcial portadoras das variantes digênicas (*FGFR2* e *MAP3K1*) quando comparado com as células dos tecidos testiculares normais. Porém, a presença de células germinativas apoptóticas foi identificada também nos tecidos testiculares controle da paciente portadora da variante alélica no gene *NR5A1* e da paciente com insensibilidade parcial aos andrógenos.

Não foi possível a realização da técnica de imunohistoquímica com anticorpos anti-Caspase-3 nas outras pacientes com mutações identificadas no gene *MAP3K1*, devido à ausência de tecido gonadal para análise (pacientes portadoras das variantes alélicas p.Thr657Arg e p.Cys691Arg

apresentavam gônadas fibrosas) ou pela falta de acesso ao material histológico (pacientes portadoras das variantes p.Leu447Trp e c.834+1G).

Os estudos para avaliação funcional da proteína MAP3K1 modificada são complexos e difíceis, pois ela está presente em diversos tipos celulares e é ativada por diferentes receptores. O estudo utilizando kits comerciais de detecção colorimétrica com os anticorpos específicos para detecção de ERK1/2 e AKT, fosforilado e não fosforilado foi escolhido por ser uma metodologia de execução simples e com potencial para resultados elucidativos, uma vez que as vias ERK e AKT, são componentes das vias de sinalização da *MAP3K1* e também do *FGFR2*. A utilização de amostras de células oriundas de cultura celular de fibroblastos obtidos por biopsia de pele das pacientes portadoras das variantes alélicas nos estudos *in vitro* permitiria a obtenção de linhagens celulares contendo as alterações alélicas em avaliação, principalmente a das pacientes que possuem as variantes em ambos os genes, *MAP3K1* e *FGFR2*.

Porem, dados consistentes não foram obtidos nos resultados dos dois ensaios independentes realizados. A falta de reprodutibilidade entre os dois ensaios impediu o uso desta metodologia na avaliação da atividade de sinalização dessas vias e as possíveis repercussões funcionais das proteínas MAP3K1 modificadas

O motivo para o insucesso deste estudo pode ter sido o fato dessas vias de sinalização serem estimuladas por diversos receptores celulares. No trabalho de Lin e colaboradores, os autores discutem sobre a capacidade do Fgf9 de ativar uma variedade de vias de sinalização através de diferentes

Fgfrs nas células de Leydig e que a presença de isoformas dos receptores, bem como as diferentes atividades de ligação do ligante poderia contribuir para uma grande diversidade de sinalização intracelular (58). Outro trabalho desse mesmo grupo, também demonstra que a ligação do FGF ao FGFR pode iniciar sinais variados de vias sinalizadoras em diferentes tipos celulares e ainda ressaltam que a ativação de p38/MAPK participa do processo de apoptose em células epiteliais através de um processo de eliminação celular desconhecido (20, 59). Os autores, Pearson e colaboradores, também enfatizam que os fibroblastos podem ter a via do MAPK ativada por diversos fatores como soro utilizado em cultura celular, fatores de crescimento, citocinas, estresse, ligantes de receptores acoplados a proteína G e agentes transformantes (6). Assim, o fato dessas vias serem ativadas por diversas moléculas e por apresentarem respostas distintas aos diferentes estímulos torna o estudo dos genes envolvidos nestas vias muito complexo.

Outra dificuldade em nosso estudo foi a manutenção da viabilidade das células das pacientes portadoras das variantes alélicas em cultura. No processo de conservação das células, o procedimento habitual de congelamento após confluência das células cultivadas foi realizado igualmente para as células obtidas das pacientes e de controles. No processo de descongelamento das células para cultivo observamos a não viabilidade das células das pacientes portadoras das variantes alélicas no *MAP3K1*, comportamento diferente do observado nas células obtidas de indivíduos controles femininos e masculinos submetidas ao mesmo

processo. Assim, estabelecer a cultura e manter as células viáveis para a elaboração dos ensaios foi difícil e pode ter interferido na reprodutibilidade dos resultados, já que essas células não estavam em cultivo de forma estável.

O teste confirmatório de identidade das culturas de células utilizadas comprovou que as células usadas nos ensaios não estavam contaminadas com outras linhagens, apesar das dificuldades no manuseio dessas culturas celulares.

Como os resultados de análise de fosforilação das proteínas ERK e AKT pelos ensaios colorimétricos “in Cell ELISA” não foram elucidativos, a quantificação da fosforilação de p38 e ERK por ensaio de citometria nas células linfoblastóides mutadas foi realizada em colaboração com o Dr. Harry Ostrer e Dr. John Loke. Esses estudos mostraram a presença de uma maior taxa de fosforilação das proteínas p38 e ERK1/2 nas culturas celulares mutantes dos quatro indivíduos portadores de variantes no *MAP3K1* estudados, resultado estatisticamente significativo ($p < 0,001$) e que corrobora com os dados já previamente publicados por Loke e colaboradores (37). Esses autores demonstraram que mutações com ganho de função no gene *MAP3K1* acarreta num desenvolvimento testicular anormal por uma diminuição na expressão de SOX9 mediada pela proteína RHOA e pela retroalimentação negativa da beta catenina (37). O aumento da fosforilação de ERK1/2, p38 e AXIN1 conduz a estabilização e um aumento da regulação da β -catenina (Figura 4)(37).

Em camundongos, Map3k4 é essencial para determinação testicular sendo que a presença de alelos com perda de função em homozigose determinam uma falha no desenvolvimento dos cordões testiculares. Não são conhecidas as repercussões dessas mutações inativadoras no Map3k4 nos animais com fenótipo de reversão sexual em relação ao estado de fosforilação das proteínas da via MAP, para compararmos com os dados encontrados nos estudos com humanos portadores de variantes alélicas descritos previamente e neste trabalho no MAP3K1.

Os achados sugerem fortemente a participação das mutações identificadas no MAP3K1 na etiologia dos distúrbios do desenvolvimento sexual dos pacientes estudados. Porém, uma melhor compreensão dos mecanismos de participação da via MAPK nas redes gênicas de regulação do processo de determinação testicular humano ainda é necessário.

6 – *Conclusões*

- Os achados sugerem fortemente a participação das mutações identificadas no *MAP3K1* na etiologia dos distúrbios do desenvolvimento sexual dos pacientes estudados. Porém, uma melhor compreensão dos mecanismos de participação da via MAPK nas redes gênicas de regulação do processo de determinação testicular humano ainda é necessário.

-A identificação da associação de variantes alélicas em diferentes genes envolvidos na diferenciação masculina como observado nas duas pacientes em que o estudo de segregação foi possível, indica que os DDS possam não ser doenças exclusivamente monogênicas. Dessa forma, com o uso das técnicas de sequenciamento de alto rendimento, exoma e genoma, anormalidades em múltiplos genes da cascata de determinação gonadal tornar-se-ão comuns e para comprovar a repercussão fenotípica estudos funcionais complexos deverão ser realizados.

-Dados consistentes não foram obtidos com uso da técnica colorimétrica in cell ELISA nos fibroblastos das pacientes portadoras de variantes alélicas no *MAP3K1*. A falta de reprodutibilidade entre os ensaios impediu o uso desta metodologia na avaliação da atividade de sinalização dessas vias e as possíveis repercussões funcionais das proteínas MAP3K1 modificadas.

-Os estudos de avaliação dos níveis de fosforilação de p38 e ERK em células linfoblastóides trouxeram resultados positivos demonstrando que houve uma maior fosforilação nas culturas celulares mutantes para o *MAP3K1*, resultado estatisticamente significativo ($p < 0,001$) que corrobora com os dados já previamente publicados na literatura, evidenciando que as

mutações no gene *MAP3K1* interferem na via de sinalização do desenvolvimento testicular.

- A análise da imunohistoquímica com anticorpo anti Caspas-3 evidenciou um maior número de células germinativas coradas (apoptóticas) nos tecidos testiculares das duas irmãs com disgenesia gonadal parcial portadoras das variantes digênicas (*FGFR2* e *MAP3K1*) quando comparado com as células dos tecidos testiculares normais. Porém, a presença de células germinativas apoptóticas foi identificada também nos tecidos testiculares controles da paciente portadora da variante alélica no gene *NR5A1* e da paciente com insensibilidade parcial aos andrógenos

7 – Anexos

Anexos

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

Caso	Sexo social ^b	Quadro clínico inicial ^{c,d}	Idade 1ª avaliação ^e	Pais consanguíneos	Genitália externa ^b	LH ^f	FSH ^f	T basal ^f	T após hCG ^f
						UI/L	UI/L	ng/dL	ng/dL
1	F	Ausência do desenvolvimento puberal	24	Não	F	23*	65*	22	22
2	F	Ausência do desenvolvimento puberal	24	Sim	F	9	41	<10	NR ^o
3	F	Ausência do desenvolvimento puberal	23	Não	F	21	76	35	NR ^o
4	F	Ausência do desenvolvimento puberal	22	Não	F	18	75	<10	NR ^o
5	F	Ausência do desenvolvimento puberal	19	Sim	F	14	75	14	NR ^o
6 ^a	F	Ausência do desenvolvimento puberal	15,8	Não	F	27	5	<10	NR ^o
7 ^a	F	Ausência do desenvolvimento puberal	11,1	Não	F	2	3	<10	NR ^o
8	F	Ausência do desenvolvimento puberal	45	Sim	F	14*	56*	34	<10
9	F	Ausência do desenvolvimento puberal	25	Não	F	32	47	55	NR ^o
10	F	Ausência do desenvolvimento puberal	32	NR	F	13	44	NR	NR
Valores		Normais	IFME*	Crianças	0,6-1,3*	1,0-3,1*			
				Adultos	1,4-9,2*	1,0-12*			
			RIE	Crianças	1,0-10	1,0-10	<10	391±129	
				Adultos	1,0-10	1,0-10	441-925	1306±577	

^a casos familiares; ^b manipulação cirúrgica prévia; F-feminino; ^{c,d} T-Telarca, M-menarca; ^e anos; ^f exames hormonais pré-operatórios; * IFME- método imunofluorométrico; RIE- método radioimunoensaio;

NR^o - exame não realizado; ND- Não detectado

Tabela 9. Continuação da tabela de dados clínicos e hormonais dos pacientes com disgenesia gonadal completa 46,XY

Caso	Sexo social ^b	Quadro clínico inicial ^{c,d}	Idade 1ª avaliação ^e	Pais consanguíneos	Genitália externa ^b	LH ^f	FSH ^f	T basal ^f	T após hCG ^f
11	F	Ausência do desenvolvimento puberal	21	Não	F	36	68	51	NR ^o
12	F	Ausência do desenvolvimento puberal	20	não	F	70	80	66	NR
13 ^b	F	Ausência do desenvolvimento puberal	44a	Não	F	ND	ND	ND	ND
14 ^b	F	Ausência do desenvolvimento puberal	21	Não	F	ND	ND	ND	ND
15	F	Ausência do desenvolvimento puberal	15	Sim	F	34	159	22	NR ^o
16	F	Ausência do desenvolvimento puberal	21	Sim (avós primos)	F	16	60	<10	NR ^o
17	F	Ausência do desenvolvimento puberal	16.5	não	F	20	81	<10	NR
		Valores	Normais	IFME*	Crianças	0,6-1,3*	1,0-3,1*		
					Adultos	1,4-9,2*	1,0-12*		
				RIE	Crianças	1,0-10	1,0-10	<10	391±129
					Adultos	1,0-10	1,0-10	441-925	1306±577

^a casos familiares; ^b manipulação cirúrgica prévia; F-feminino; ^{c,d} T-Telarca, M-menarca; ^e anos; ^f exames hormonais pré-operatórios; * IFME- método imunofluorométrico; RIE- método radioimunoensaio;

NR^o - exame não realizado; ND- Não detectado

Tabela 10. Genitais internos e exame anátomo-patológico dos pacientes com disgenesia gonadal completa 46,XY

Caso	US pélvico útero	AP: Gônadas^b	AP: Derivados Mullerianos^b	AP: Derivados Wolffianos^b
1	Presente	Disgenéticas Bilaterais	Tubas uterinas bilaterais	Ausentes
2	Presente	Disgenéticas Bilaterais ^c	Tubas uterinas bilaterais	E ^e bilaterais
3	Presente	Disgenéticas Bilaterais	Tubas uterinas bilaterais	Ausentes
4	Presente	Disgenéticas Bilaterais	Tubas uterinas bilaterais	Ausentes
5	Presente	Disgenéticas Bilaterais	Tubas uterinas bilaterais	Presentes ^d
6 ^a	Presente	ND [#]	ND [#]	ND [#]
7 ^a	Presente	ND [#]	ND [#]	ND [#]
8	Presente	Disgenéticas Bilaterais	Tubas uterinas bilaterais	Presentes ^d
9	Presente	Disgenéticas Bilaterais	ND [#]	ND [#]
10	Presente	Disgenéticas Bilaterais	Tubas uterinas bilaterais	E ^e direita
11	Presente	ND [#]	Tubas uterinas bilaterais	ND [#]
12	presente	Disgenéticas Bilaterais	Tubas uterinas bilaterais	Ausentes
13	Presente	ND [#]	ND [#]	ND [#]
14 ^a	Presente	Disgenéticas bilaterais/disgerminoma a D	ND [#]	ND [#]
15 ^a	Presente	Disgenéticas Bilaterais	Tubas uterinas bilaterais	E ^e bilaterais
16 ^a	Presente	ND [#]	ND [#]	ND [#]
17 ^a	Presente	Disgenéticas Bilaterais	Tubas uterinas bilaterais	Ausentes

^a casos familiares; ^b AP- Anátomo Patológico; ^c Presença de gonadoblastoma; ^d remanescentes wolffianos não diferenciados; E^e – epidídimo;

ND[#] - material não disponível

Anexos

Tabela 11. Dados clínicos e hormonais dos pacientes com disgenesia gonadal parcial 46,XY

Caso	Sexo social ^c	Quadro clínico inicial	Idade 1ª avaliação ^d	Pais consanguíneos	Genitália externa	LH ^e U/L	FSH ^e U/L	T basal ^e ng/dL	T após hCG ^e ng/dL
18 ^a	F	Genitália ambígua ao nascimento	10	Não	Ambígua	5,1*	50*	116	NR ^o
19 ^a	F	Genitália ambígua ao nascimento	0,2	Não	Ambígua	0,6	<1,0	98	574
20	F	Genitália ambígua ao nascimento	2	Não	Ambígua	27	98	25,1	15
21	M	Genitália ambígua ao nascimento	5	Não	Ambígua	<0,6*	<1*	<10*	494
22 ^b	M	Genitália ambígua ao nascimento	0,9	Não	Ambígua	<0,6	<1	<10	800
23	M	Genitália ambígua ao nascimento	23	Não	Ambígua	11	29	420	468
24 ^b	M	Genitália ambígua ao nascimento	34	Sim	Ambígua	10	78	75	NR ^o
25 ^b	M	Genitália ambígua ao nascimento	16	Não informado	Ambígua	NR ^o	NR ^o	NR ^o	NR ^o
26	F	Genitália ambígua ao nascimento	1,7	Não	Ambígua	<0,6*	3*	11	107
27 ^b	M	Genitália ambígua ao nascimento	7,3	Não	Ambígua	NR ^o	NR ^o	<10	<10
28	M	Genitália ambígua ao nascimento	0,8	Sim	Ambígua	NR ^o	NR ^o	NR ^o	310
29	M	Genitália ambígua ao nascimento	21	Não	Ambígua	16	49	<10	<10

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

Anexos

Tabela 12. Continuação da tabela de dados clínicos e hormonais dos pacientes com disgenesia gonadal parcial 46,XY

Caso	Sexo social ^c	Quadro clínico inicial	Idade 1ª avaliação ^d	Pais consanguíneos	Genitália externa	LH ^e UI/L	FSH ^e UI/L	T basal ^e ng/dL	T após hCG ^e ng/dL
30 ^a	M→F	Genitália ambígua ao nascimento	1,8	Não	Ambígua	NR ^o	NR ^o	<10	<10
31	M	Criptorquidia e micropênis	1,8	Não	Ambígua	12	115	9	9
32 ^b	F	Genitália ambígua ao nascimento	38	Não	Ambígua	42	8	24	NR ^o
33 ^b	F	Genitália ambígua ao nascimento	43	Não	Ambígua	32	52	324	NR ^o
34 ^b	M	Criptorquidia e micropênis	3,5	Não	Ambígua	3*	88*	<10	29
35	F	Amenorréia primária	15	Não	Clitoromegalia	74	96	36	40
36	M	Genitália ambígua ao nascimento	11,5	Não	Ambígua	20	41	<10	NR ^o
37 ^a	F	Genitália ambígua ao nascimento	18	Não	Feminina	43	97	14	NR ^o
38	M→F	Genitália ambígua ao nascimento	4	Sim	Ambígua	3	87	30	<10
39	M	Genitália ambígua ao nascimento	34	Não	Ambígua	20	42	163	NR
40	M	Genitália ambígua ao nascimento	13	Não	Ambígua	13	40	475	NR ^o
41	F	Genitália ambígua ao nascimento	31	Não	Ambígua	22	57	35	38
42	F	Amenorréia primária	18,5	não	Clitoromegalia	25	41	22	135
43	M	Genitália ambígua ao nascimento	12	não	Ambígua	NR ^o	NR ^o	NR ^o	NR ^o
44	M	Genitália ambígua ao nascimento	47	não	Ambígua	16	57	25	NR ^o
45	M	Criptorquidia e micropênis	1,4	não	micropenis e criptorquidia	7	109	<10	NR ^o
46	M	Genitália ambígua ao nascimento	1,2	SIM	Ambígua	0.6*	3	<10	<10

^a casos familiares; ^b manipulação cirúrgica prévia; ^c F-Feminino, M-Masculino, M→F- mudança de sexo social de masculino para feminino; ^d anos;

^e exames hormonais pré-operatórios; * IFME- método imunofluorométrico; RIE- método radioimunoensaio; NR^o - exame não realizado

Anexos

Tabela 13. Genitais internos e exame anátomo-patológico dos pacientes com disgenesia gonadal parcial 46,XY

UCGR ^c						
Caso US pélvico útero		Seio urogenital	AP: Gônadas ^d	AP: Derivados Mullerianos ^d	AP: Derivados Wolffianos ^d	
18 ^a	Presente	Presente	T ^e à esquerda + T ^e à direita	U ^h e T ⁱ bilaterais	Ausentes	
19 ^a	Ausente	Presente	T ^e à esquerda + T ^e à direita	T ⁱ bilaterais	E ^j e V ^k bilaterais	
20	Ausente	Presente	D ^f à esquerda + D ^f à direita	T ⁱ bilaterais	E ^j e V ^k bilaterais	
21	NR ^o	Presente	*	U ^h rudimentar	Ausentes	
22 ^b	NR ^o	Presente	D ^f à direita**	U ^h e T ⁱ bilaterais	Ausentes	
23	Ausente	NR ^o	G ^g à esquerda + T ^e à direita	U ^h e T ⁱ esquerda	Presentes bilaterais ^l	
24 ^b	NR ^o	Ausente	ND [#]	U ^h e T ⁱ bilaterais	E ^j e V ^k bilaterais	
25 ^b	Presente	NR ^o	ND [#]	U ^h	ND [#]	
26	Presente	NR ^o	T ^e à esquerda + T ^e à direita	Ausentes	E ^j e V ^k bilaterais	
27 ^b	NR ^o	NR ^o	T ^e à esquerda + T ^e à direita	Ausentes	E ^j à direita	
28	Presente	Ausente	T ^e à esquerda + T ^e à direita	U ⁱ e T ^j bilaterais	Ausentes	
29	Ausente	NR ^o	ND [#]	ND [#]	ND [#]	
30 ^a	Presente	Presente	A ^h à esquerda + D ^f à direita	T ^j à direita	E ^k e V ^l à direita	

^a casos familiares; ^b manipulação cirúrgica prévia; ^c UCGR ^d AP- Anátomo Patológico; T^e Testículo disgenético;

D^f- gônada indiferenciada disgenética; G^g- gonadoblastoma; A^h- Gônada ausente; Uⁱ- útero; T^j- tuba uterina; E^k- epidídimo; V^l- vaso deferente;

NR^o- exame não realizado; ND[#]- material não disponível; ¥ Gonadas preservadas- realizado orquipexia

Anexos

Tabela 14. Continuação da tabela de genitais internos e exame anátomo-patológico dos pacientes com disgenesia gonadal parcial 46,XY

Caso	UCGR ^c				
	US pélvico útero	Seio urogenital	AP: Gônadas ^d	AP: Derivados Mullerianos ^d	AP: Derivados Wolffianos ^d
31	Ausente	NR ^o	A ^h à esquerda + A ^h à direita	Restos mullerianos	E ^k bilaterais
32 ^b	NR ^o	Ausente	ND [#]	ND [#]	ND [#]
33 ^b	Presente	NR ^o	A ^h à esquerda + T ^e à direita	T ^j à direita	E ^k à esquerda
34 ^b	Ausente	Ausente	A ^h à esquerda + A ^h à direita	Ausente	Ausentes
35	Presente	Presente	A ^h à esquerda + T ^e à direita.	T ^j bilaterais	E ^k à direita
36 ^a	Ausente	Presente	A ^h à esquerda + A ^h à direita	Ausentes	E ^k bilaterais
37 ^a	NR ^o	Presente	T ^e à esquerda + A ^h à direita	Ausentes	E ^k bilaterais
38	Ausente	Presente	D ^f à esquerda + A ^h à direita	U ⁱ e T ^j bilaterais	Ausentes
39 ^b	Presente	NR	T ^e à esquerda + D ^f à direita	ND [#]	ND [#]
40	Ausente	Presente	G ^g bilateral	ND [#]	ND [#]
41	Ausente	NR	A ^h à esquerda + A ^h à direita	Ausentes	V à direita
42	Presente	Ausente	T ^e à esquerda + D ^f à direita	T ^j bilaterais	ND [#]
43	NR ^o	?	A ^h à esquerda + D ^f à direita	Ausentes	E ^k à direita
44	Presente	Presente	Ausentes	U ⁱ e T ^j bilaterais	ND [#]
45	Ausente	Ausente	Ausentes	Ausentes	E ^k bilaterais
46	Presente	Presente	¥ Gonadas preservadas	Ausentes	ND [#]

^a casos familiares; ^b manipulação cirúrgica prévia; ^c UCGR ^d AP- Anátomo Patológico; T^e Testículo disgenético;

D^f- gônada indiferenciada disgenética; G^g- gonadoblastoma; A^h- Gônada ausente; Uⁱ- útero; T^j- tuba uterina; E^k- epidídimo; V^l- vaso deferente;

NR^o- exame não realizado; ND[#]- material não disponível; ¥ Gonadas preservadas- realizado orquipexia

Tabela 15. Dados clínicos e hormonais e genitais internos e exame anátomo-patológico da paciente com DDS46,XY de origem indeterminada

Caso	Sexo social ^b	Quadro clínico inicial ^{c,d}	Idade 1ª avaliação ^e	Pais consanguíneos	Genitália externa ^b	LH ^f UI/L	FSH ^f UI/L	T basal ^f ng/dL	DHT ^f ng/dL
47	F	Genitália ambígua ao nascimento	12	Não	Clitoromegalia	13,1*	40,4*	378	8,5

^a casos familiares; ^b manipulação cirúrgica prévia; ^c F-Feminino, M-Masculino, M→F- mudança de sexo social de masculino para feminino; ^d anos; Relação T/DHT= 44
^e exames hormonais pré-operatórios; * IFME- método imunofluorométrico; RIE- método radioimunoensaio; NR^o - exame não realizado

UCGR ^c				
US pélvico útero	Seio urogenital	AP: Gônadas ^d	AP: Derivados Mullerianos ^d	AP: Derivados Wolffianos ^d
Ausente	NR ^o	Testículos infantis	Ausentes	Ausentes

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

^a casos familiares; ^b manipulação cirúrgica prévia; ^c UCGR ^d AP- Anátomo Patológico; ^e Testículo disgenético;

D^f- gônada indiferenciada disgenética; G^g- gonadoblastoma; A^h- Gônada ausente; Uⁱ- útero; T^j- tuba uterina; E^k- epidídimo; V^l- vaso deferente;

Anexo 1. Protocolos de Imunohistoquímica, Laboratório APC – POP 005**IMUNOHISTOQUÍMICA****REAGENTES**

Os reagentes são armazenados em local apropriado e conforme as especificações técnicas e compatibilidade química.

Água deionizada

Álcool 100%

Anticorpos primários monoclonais ou policlonais (conforme bulas)

Hematoxilina de Harris – Queel

Kit de imunohistoquímica ENVISION FLEX da marca DAKO

Xilol

Meio de Montagem - *Coversleeper*

EQUIPAMENTOS

PT LINK (desparafinização e hidratação das lâminas) – marca: DAKO

COVERSLEEPER (montador de lâminas com lamínulas) – marca: DAKO

REAÇÃO IMUNO- HISTOQUÍMICA – PROCEDIMENTO PASSO A PASSO**Cortes**

- Os blocos foram entregues à área de histotécnica após a triagem (identificação), e colocados no freezer para gelar;
 - Após resfriamento do bloco, foram realizados cortes de 2 micras em micrótomo manual;
 - Os cortes foram colocados em banho-maria à +/-65°C e “pescados” nas lâminas já identificadas com o número do caso;
 - Estas lâminas foram colocadas em estufa à 60°C por 40 minutos para o início da desparafinização.
-

Preparação

Período noturno:

- As lâminas foram colocadas em berços de coloração devidamente numeradas para serem distribuídas nos tanques dos ptLink (equipamento em comodato DAKO) e de acordo com o PH determinado.
- Fecharam-se os ptLink, fez-se a programação na tela do Menu de cada equipamento, verificou-se horário, dia da semana, temperatura e programação de início do processo.
- Finalmente verificamos se o NO-BREAK estava ativo corretamente, a fim de garantirmos **o início do processo no período da manhã**.

Processo da imunohistoquímica - Período da manhã

- O processo de desparafinização e re-hidratação das lâminas ocorrem nas máquinas ptLink com água deionizada e soluções prontas de ph baixo e ph alto que atingirão uma temperatura de aprox. 180°C num período de 72 minutos a partir das 4:00AM em soluções de phs ALTO e BAIXO.
- A continuidade do processo se dá com uso de todo o kit Envision Flex da Dako para a realização da reação imunohistoquímica, juntamente com uso de anticorpos concentrados (a serem diluídos) e *flex* (já diluídos) de acordo com seus respectivos ph's.

Vide protocolo resumido do uso do Kit Envision Flex, conforme figura abaixo:

Protocolo EnVision™ FLEX

Etapa	Tempo
1. EnVision™ FLEX Peroxidase Block	5 minutos
Solução de Lavagem	5 minutos
2. Anticorpo primário FLEX RTU	20 minutos
Solução de Lavagem	5 minutos
3. EnVision™ FLEX /HRP	20 minutos
Solução de Lavagem	2 x 5 minutos
4. EnVision™ FLEX Substrate Working Solution	2 x 5 minutos
Solução de Lavagem	
5. EnVision™ FLEX Hematoxylin	5 minutos
Água destilada ou deionizada	
Solução de Lavagem	5 minutos
Água destilada ou deionizada	

Obs.: Quando realizados os dois protocolos simultaneamente, após a etapa 2 deixar as lâminas em solução de lavagem enquanto se incuba o "Linker" do protocolo EnVision™ FLEX+. Após isto, todas as etapas serão semelhantes para ambos os protocolos.

Protocolo EnVision™ FLEX +

Etapa	Tempo
1. EnVision™ FLEX Peroxidase Block	5 minutos
Solução de Lavagem	5 minutos
2. Anticorpo primário FLEX RTU	20 minutos
Solução de Lavagem	5 minutos
3. EnVision™ FLEX+ (Linker)	15 minutos
Solução de Lavagem	5 minutos
4. EnVision™ FLEX /HRP	20 minutos
Solução de Lavagem	2 x 5 minutos
5. EnVision™ FLEX Substrate Working Solution	2 x 5 minutos
Solução de Lavagem	
6. EnVision™ FLEX Hematoxylin	5 minutos
Água destilada ou deionizada	
Solução de Lavagem	5 minutos
Água destilada ou deionizada	

Caso necessite de Suporte Técnico, entre em contato através do fone:
(11) 5070-8300

Abaixo segue também a descrição detalhada do processo resumido na figura 1:

- Abrir as tampas do PT LINK e deixar esfriar por 30 minutos para que não haja choque térmico nas lâminas.
 - Retirar os carrinhos do PTLINK;
 - Mergulhar 10 vezes em solução tampão e deixar descansar por 5 minutos.
 - Trocar o tampão, repetir o procedimento e deixar mais 5 minutos em descanso;
 - Retirar os carrinhos com as lâminas da solução, tirar dos carrinhos uma a uma, secar nos arredores do fragmento com campo cirúrgico, fazer um círculo com a caneta hidrofóbica DAKO PEN ao redor do fragmento delimitando-o, e distribuir as mesmas nas caixas acrílicas lado a lado. Em seguida pipeta-se 100ul de peroxidase block e deixar por 5 minutos em descanso;
 - Em seguida lavar com solução tampão (WASH) as lâminas e deixar também por 5 minutos em descanso;
 - Retirar o excesso de solução tampão, levantando uma lâmina por vez, devolver na caixa novamente para pipetar o anticorpo primário já diluído, conforme designado nas lâminas previamente etiquetadas. O processo de incubação os anticorpos deve seguir as instruções abaixo:

INCUBAÇÃO COM ANTICORPO PRIMÁRIO

- ✓ Utilizamos anticorpos que já vem pré-diluídos (FLEX).
 - ✓ Enxugou-se as lâminas que estavam na água deionizada com campo cirúrgico ou papel toalha, tomando o cuidado de não estragar fragmento.
 - ✓ Delimitou-se a área do corte com caneta Dako Pen.
 - ✓ Pingou-se 100µl do anticorpo primário em cima do corte.
 - ✓ Colocaram as lâminas dentro de uma caixa de acrílico ou recipiente plástico, e incubamos por 30 minutos em temperatura ambiente.
 - ✓ Lavamos com tampão Dako na própria cuba, utilizando pissete.
-
- Após a reação com os anticorpos primários, lavar novamente as lâminas nas caixas acrílicas com solução tampão (WASH) e deixar novamente em solução tampão por 5 minutos;
 - Retirar o tampão levantando as lâminas, levantando uma lâmina por vez, devolver na caixa novamente e pipetar o polímero HRP e deixar incubar por 20 minutos;
 - Após, entrar novamente em processo de lavagem com a solução tampão por 2 vezes e descansar de 5 minutos em cada etapa;
 - No caso de anticorpos (anti mouse ou anti rabbit) incubar o linker por 15 minutos e depois lavar com tampão;
 - Na próxima etapa entrar em processo de revelação com o cromógeno Substrate Working Solution (equivalente ao DAB), onde pipeta-se 2 vezes e fica em reação por 7 minutos em cada uma das vezes;
 - Depois, lavar as lâminas com solução de lavagem (tampão wash) e colocá-las em carrinhos que serão levados às cubas de hematoxilina por 30 segundos em descanso, para depois serem lavadas em água corrente;
 - Em seguida, cada carrinho é mergulhado na bateria de 4 cubas de álcool absoluto e 8 cubas de xilol, até serem trocadas de carrinhos e levadas à máquina de montagem de Lâminas (COVERSLEEP – DAKO).
-

8 – Referências

1. Duplessis S, Cuomo CA, Lin YC, Aerts A, Tisserant E, Veneault-Fourrey C, et al. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(22):9166-71.
2. Jost A. A new look at the mechanisms controlling sex differentiation in mammals. *Johns Hopkins Med J*. 1972;130(1):38-53.
3. Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA. Consensus statement on management of intersex disorders. *J Pediatr Urol*. 2006;2(3):148-62.
4. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA. Consensus statement on management of intersex disorders. *International Consensus Conference on Intersex. Pediatrics*. 2006;118(2):e488-500.
5. Ono M, Harley VR. Disorders of sex development: new genes, new concepts. *Nat Rev Endocrinol*. 2013.
6. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 2001;22(2):153-83.
7. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002;298(5600):1911-2.
8. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Signal transduction by MAP kinases: regulation by phosphorylation-dependent switches. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 1999;1999(1):PE1.
9. Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol*. 2010;661:3-38.
10. Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res*. 2000;256(1):34-41.
11. Yue J, Mulder KM. Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a Smad-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2000;275(40):30765-73.
12. Araujo EG, Bianchi C, Faro R, Sellke FW. Oscillation in the activities of MEK/ERK1/2 during cardiopulmonary bypass in pigs. *Surgery*. 2001;130(2):182-91.
13. Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):509-21.

14. Swain A, Lovell-Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev.* 1999;13(7):755-67.
 15. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends Genet.* 2009;25(1):19-29.
 16. Larney C, Bailey TL, Koopman P. Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene *Sry*. *Development.* 2014;141(11):2195-205.
 17. 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(19):4627-34.
 18. Warr N, Carre GA, Siggers P, Faleato JV, Brixey R, Pope M, et al. *Gadd45gamma* and *Map3k4* interactions regulate mouse testis determination via p38 MAPK-mediated control of *Sry* expression. *Dev Cell.* 2012;23(5):1020-31.
 19. Bogani D, Siggers P, Brixey R, Warr N, Beddow S, Edwards J, et al. Loss of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (*MAP3K4*) reveals a requirement for MAPK signalling in mouse sex determination. *PLoS Biol.* 2009;7(9):e1000196.
 20. Lai MS, Cheng YS, Chen PR, Tsai SJ, Huang BM. Fibroblast growth factor 9 activates akt and MAPK pathways to stimulate steroidogenesis in mouse leydig cells. *PLoS One.* 2014;9(3):e90243.
 21. Nakamura T, Hamada F, Ishidate T, Anai K, Kawahara K, Toyoshima K, et al. Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, interacts with beta-catenin, GSK-3beta and APC and reduces the beta-catenin level. *Genes Cells.* 1998;3(6):395-403.
 22. Sue Ng S, Mahmoudi T, Li VS, Hatzis P, Boersema PJ, Mohammed S, et al. MAP3K1 functionally interacts with Axin1 in the canonical Wnt signalling pathway. *Biol Chem.* 391(2-3):171-80.
 23. Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet.* 2008;17(19):2949-55.
 24. Warr N, Siggers P, Carre GA, Wells S, Greenfield A. Genetic Analyses Reveal Functions for MAP2K3 and MAP2K6 in Mouse Testis Determination. *Biol Reprod.* 2016;94(5):103.
 25. Warr N, Bogani D, Siggers P, Brixey R, Tateossian H, Dopplapudi A, et al. Minor abnormalities of testis development in mice lacking the gene
-

- encoding the MAPK signalling component, MAP3K1. *PLoS One*. 2011;6(5):e19572.
26. Bonnesen B, Orskov C, Rasmussen S, Holst PJ, Christensen JP, Eriksen KW, et al. MEK kinase 1 activity is required for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Blood*. 2005;106(10):3396-404.
27. Charlaftis N, Suddason T, Wu X, Anwar S, Karin M, Gallagher E. The MEKK1 PHD ubiquitinates TAB1 to activate MAPKs in response to cytokines. *EMBO J*. 2014;33(21):2581-96.
28. Pearlman A, Loke J, Le Caignec C, White S, Chin L, Friedman A, et al. Mutations in MAP3K1 cause 46,XY disorders of sex development and implicate a common signal transduction pathway in human testis determination. *Am J Hum Genet*. 2010;87(6):898-904.
29. Pham TT, Angus SP, Johnson GL. MAP3K1: Genomic Alterations in Cancer and Function in Promoting Cell Survival or Apoptosis. *Genes & cancer*. 2013;4(11-12):419-26.
30. Gallagher ED, Gutowski S, Sternweis PC, Cobb MH. RhoA binds to the amino terminus of MEKK1 and regulates its kinase activity. *J Biol Chem*. 2004;279(3):1872-7.
31. Loke J, Ostrer H. Rapidly screening variants of uncertain significance in the MAP3K1 gene for phenotypic effects. *Clin Genet*. 81(3):272-7.
32. Tew SR, Hardingham TE. Regulation of SOX9 mRNA in human articular chondrocytes involving p38 MAPK activation and mRNA stabilization. *J Biol Chem*. 2006;281(51):39471-9.
33. Woods A, Wang G, Beier F. RhoA/ROCK signaling regulates Sox9 expression and actin organization during chondrogenesis. *J Biol Chem*. 2005;280(12):11626-34.
34. Kumar D, Lassar AB. The transcriptional activity of Sox9 in chondrocytes is regulated by RhoA signaling and actin polymerization. *Mol Cell Biol*. 2009;29(15):4262-73.
35. Murakami S, Kan M, McKeehan WL, de Crombrughe B. Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(3):1113-8.
36. Cool J, Capel B. Mixed signals: development of the testis. *Semin Reprod Med*. 2009;27(1):5-13.
-

-
37. Loke J, Pearlman A, Radi O, Zuffardi O, Giussani U, Pallotta R, et al. Mutations in MAP3K1 tilt the balance from SOX9/FGF9 to WNT/beta-catenin signaling. *Hum Mol Genet.* 2013;23(4):1073-83.
 38. Das DK, Rahate SG, Mehta BP, Gawde HM, Tamhankar PM. Mutation analysis of mitogen activated protein kinase 1 gene in Indian cases of 46,XY disorder of sex development. *Indian J Hum Genet.* 2014;19(4):437-42.
 39. Cotton LM, O'Bryan MK, Hinton BT. Cellular signaling by fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) in male reproduction. *Endocr Rev.* 2008;29(2):193-216.
 40. Thisse B, Thisse C. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol.* 2005;287(2):390-402.
 41. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer.* 10(2):116-29.
 42. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001;2(3):REVIEWS3005.
 43. Coutu DL, Galipeau J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging.* 2011;3(10):920-33.
 44. Li QR, Xing XB, Chen TT, Li RX, Dai J, Sheng QH, et al. Large-scale phosphoproteome profiles comprehensive features of mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Proteomics.*
 45. Sambrook J, Gething MJ. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature.* 1989;342(6247):224-5.
 46. Sambrook J, Fritsch, E.F., Maniats, T., editor. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. *Molecular cloning: A laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor; 1989.
 47. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.
 48. McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Hoei-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis--approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. *Hum Reprod.* 2007;22(1):2-16.
 49. Machado AZ. Pesquisa de mutações nos genes FGF9 e FGFR2 em pacientes portadores de distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XY por
-

anormalidades no desenvolvimento gonadal. São Paulo: Universidade de São Paulo;Dissertacao de Mestrado 2012.

50. Bashamboo A, McElreavey K. Human sex-determination and disorders of sex-development (DSD). *Semin Cell Dev Biol.* 2015;45:77-83.

51. Hashizume R, Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, Yabuki Y, et al. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem.* 2001;276(18):14537-40.

52. Christensen DE, Brzovic PS, Klevit RE. E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(10):941-8.

53. Huber AH, Nelson WJ, Weis WI. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell.* 1997;90(5):871-82.

54. Mazen I, Abdel-Hamid M, Mekkawy M, Bignon-Topalovic J, Boudjenah R, El Gammal M, et al. Identification of NR5A1 Mutations and Possible Digenic Inheritance in 46,XY Gonadal Dysgenesis. *Sex Dev.* 2016;10(3):147-51.

55. Stefan Bagheri-Fam MO, Gerd Scherer, Oliver Bartsch, Veraragavan Eswarakumar and Vincent R Harley. Human FGFR2 Mutation in 46,XY Gonadal Dysgenesis. The Endocrine Society Meeting San Francisco2013.

56. Xu X, Weinstein M, Li C, Naski M, Cohen RI, Ornitz DM, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development.* 1998;125(4):753-65.

57. Bagheri-Fam S, Ono M, Li L, Zhao L, Ryan J, Lai R, et al. FGFR2 mutation in 46,XY sex reversal with craniosynostosis. *Hum Mol Genet.* 2015;24(23):6699-710.

58. Lin YM, Tsai CC, Chung CL, Chen PR, Sun HS, Tsai SJ, et al. Fibroblast growth factor 9 stimulates steroidogenesis in postnatal Leydig cells. *Int J Androl.* 2010;33(3):545-53.

59. Norman M, Wisniewska KA, Lawrenson K, Garcia-Miranda P, Tada M, Kajita M, et al. Loss of Scribble causes cell competition in mammalian cells. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 1):59-66.