Mariza Augusta Gerdulo dos Santos

Pesquisa de mutações em genes envolvidos na diferenciação e manutenção das células germinativas em pacientes portadores de distúrbio do desenvolvimento gonadal 46,XX

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

Programa de: Ciências Médicas Área de concentração: Distúrbios Genéticos

de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Profa. Dra. Berenice Bilharinho

de Mendonça

SÃO PAULO

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Mariza Augusta Gerdulo dos

Pesquisa de mutações em genes envolvidos na diferenciação e manutenção das células germinativas em pacientes portadores de distúrbio do desenvolvimento gonadal 46,XX / Mariza Augusta Gerdulo dos Santos. -- São Paulo, 2010.

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

Orientadora: Berenice Bilharinho de Mendonça.

Descritores: 1.Determinação de sexo (genética) 2.Disgenesia gonadal 46 XX 3.Falência ovariana prematura 4.Amenorréia 5.Infetilidade 6.Células germinativas 7.Mutação

USP/FM/DBD-217/10

Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Ciências Médicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, pela valiosa orientação prestada com tanta sabedoria e sensibilidade, por seu exemplo como profissional dedicada e de inteligência ímpar que tanto acrescenta na área médica e de pesquisas científicas.

À Profa. Dra. Ana Claudia Latrônico, pela recepção entusiástica quando entrei para o grupo me proporcionando o espaço para desenvolver meus conhecimentos na área de genética humana.

Ao Prof. Dr. Ivo Arnhold por suas preciosas críticas, sempre construtivas e de grande valor científico que me motivaram durante todo o Doutorado.

À Dra. Sorahia Domenice e Dra. Miriam Nishi pelo auxílio indispensável durante o desenvolvimento desse estudo e pelas palavras amigas e gentis que tanto me incentivaram.

Á Dra. Elaine Costa, Camila Gomes e Maíra Pontual pelo acompanhamento médico dos pacientes recrutados para esse estudo.

Aos colaboradores da Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Dr. Gil Guerra-Júnior e Dra. Maricilda Palandi de Mello que tanto me auxiliaram na coleta dos dados de grande parte dos pacientes envolvidos nesse estudo.

Aos colaboradores da Clínica Huntington, em especial ao Dr. Paulo Serafine e ao Dr. André Monteiro da Rocha por proporcionarem a ampliação desse trabalho com tanta disponibilidade e gentileza.

Aos funcionários Ana Lúcia, Cidinha, Cristiane, Nilda, Cristina, Fran e Mariana pela boa vontade e competência que tanto facilitam nosso trabalho no laboratório.

Às funcionárias do laboratório de Hormônios Luciana Bussman. Luciana, Helena e Poline pela amizade.

À Dra. Letícia Gontijo Ferreira por ter me recebido no LIM/42 e ter me concedido à honra de trabalhar ao seu lado em sua tese de Doutorado. Por seu companheirismo e amizade.

Ao Dr. Antônio Lerário e Dra. Ericka Trabachi por suas orientações precisas, incentivo e acima de tudo pela amizade.

Às amigas Aline, Beatriz e Tamaya por toda ajuda que prestaram com tanto carinho e amizade. Tornando os momentos difíceis da "reta final" mais alegres e descontraídos no laboratório.

Aos colegas do LIM/42 pela convivência e por tornarem o ambiente de trabalho científico interessante e agradável.

Aos pacientes, o verdadeiro motivo dessa pesquisa científica, e seus pais pela boa vontade de participarem desse projeto.

À FAPESP pelo apoio financeiro desse estudo.

À minha mãe por sua eterna dedicação, amor, amizade que me deu bases sólidas para me tornar a pessoa que sou hoje e pelo incentivo incondicional na minha vida e carreira científica.

Ao meu pai pelo amor, admiração e incentivo durante meu desenvolvimento como pessoa e como cientista.

Ao Sr. José dos Anjos e Jurema, mestres sagrados, aos amigos Elaine, Eduardo, José Prudente, Glauco, Maria, João e todos do TUPTA pelo apoio, amizade e conhecimentos transformadores.

SUMÁRIO

Lista de figuras Lista de tabelas Resumo Summary

1	IN	TRODUÇÃO	1
	1.1	Determinação sexual	2
		1.1.2 A gônada primordial	2
		1.1.3 As células germinativas	3
		1.1.3.1 As células germinativas durante a	
		diferenciação ovariana	4
	1.2	Genes envolvidos na determinação ovariana	5
		1.2.1 <i>C-KIT</i>	5
		1.2.2 <i>SF1</i>	6
		1.2.3 <i>RSPO1</i> e <i>WNT4</i>	7
		1.2.4 <i>FOXL2</i>	8
	1.3	Genes envolvidos na diferenciação e manutenção das células	
		germinativas	8
		1.3.1 <i>NANOS3</i>	10
		1.3.2 <i>BMP15</i> e <i>GDF9</i>	11
		1.3.3 STRA8 e a meiose	15
	1.4	Distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) 46,XX	19
		1.4.1 Disgenesia gonadal 46,XX	
		1.4.2 DDS ovotesticular	
		1.4.3 DDS testicular	22
	15	Causas genéticas dos distúrbios do desenvolvimento gonadal	
	1.5	46,XX	23
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	25
2	OE	3JETIVOS	24

3	ΜÉ	TODO	s		26
	3.1	Casuística			27
		3.1.1	Avaliaçã	o clínica	28
			3.1.1.1	Avaliação clínica e hormonal em mulheres com	
				amenorréia primária e secundária	29
		3.1.2	DDS 46,	XX com desenvolvimento de tecido testicular	33
			3.1.2.1	DDS 46, XX ovotesticular	33
			3.1.2.2	DDS 46,XX testicular	34
	3.2	Pesqu	isa de Mı	utações	37
		3.2.1	Extração	de DNA a partir de sangue periférico	37
		3.2.2	Amplific	ação de DNA genômico por reação de	
			polimeri	zação em cadeia (PCR)	38
		3.2.3	Pesquisa	a da variante p.Q115X no grupo controle	43
		3.2.4	Seqüend	ciamento automático	44
4	Re	sultad	los		45
	4.1	Pesqu	isa de m	utações no <i>NANOS3</i>	46
	4.2	Pesqu	isa de m	utações no BMP15	48
	4.3	Pesqu	isa de m	utações no <i>STRA8</i>	53
5	DI	SCUSS	5ÃO		54
	5.1	Gene	NANOS3		56
	5.2	Gene	<i>BMP15</i>		57
	5.3	Gene	STRA8		59
6	CO	NCLU	SÕES		62
7	RE	FERÊN	NCIAS		64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Regulação da migração das células germinativas 4
Figura 2.	Eventos relacionados com a diferenciação e sobrevivência das células germinativas do ovário 9
Figura 3.	Modelo da diferença funcional do BMP15 e GDF9 em mamíferos. A. Camundongos; B. Ovelhas13
Figura 4.	Representação esquemática do gene <i>BMP15</i> , com os 2 exons e seu produto protéico
Figura 5.	Diferenciação das CGPs masculinas e femininas no tempo 14.5 dpc após a entrada na gônada16
Figura 6.	Modelo de repressão do <i>STRA8</i> através da expressão dos genes <i>Cyp26b1</i> e <i>Nanos2</i> pelas células germinativas XY18
Figura 7.	Eletroferograma mostrando a substituição da guanina 358 por uma adenina em homozigose no exon 1 do gene <i>NANOS3</i> (c.358G>A) em comparação com uma seqüência controle
Figura 8.	Localização da mutação p.E120K na proteína NANOS3 de 192 aa
Figura 9.	Eletroferograma mostrando a mostrando a substituição da citosina 392 por uma timina em homozigose no exon 1 do gene <i>BMP15</i> (c.392C>T)48
Figura 10.	Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR de controles digeridos com a enzima <i>A/wN</i> I
Figura 11.	Localização da mutação p.Q115X na proteína BMP1549
Figura 12.	Heredograma mostrando segregação mutação p.Q115X na família50
Figura 13.	Eletroferograma mostrando a substituição de uma adenina por uma citosina em heterozigose no exon 1 do gene <i>BMP15</i> (c.13A>C)
Figura 14.	Eletroferograma mostrando a substituição de uma adenina por uma guanina em heterozigose no exon 1 do gene <i>BMP15</i> (c.308A>G)52
Figura 15.	Eletroferograma mostrando a inserção de um códon TCT em heterozigose no exon 2 do gene <i>BMP15</i> (c.788insTCT)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Mutações no <i>BMP15</i> associadas ao fenótipo de amenorréia primária e secundária14
Tabela 2.	Avaliação clínica e hormonal das pacientes portadoras de amenorréia primária30
Tabela 3.	Avaliação clínica e hormonal das pacientes portadoras de amenorréia secundária32
Tabela 4.	Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes 46,XX com DDS ovotesticular e testicular35
Tabela 5.	Seqüências dos oligonucleotídeos específicos para amplificação dos exons do <i>NANOS3</i> 38
Tabela 6.	Seqüências dos oligonucleotídeos específicos para amplificação dos exons do <i>BMP15</i> 39
Tabela 7.	Seqüências dos oligonucleotídeos específicos para amplificação dos exons e da região promotora do <i>STRA8</i> 39
Tabela 8.	Protocolo das reações de polimerização em cadeia (PCR) para o <i>NANOS3</i> 40
Tabela 9.	Protocolo das reações de polimerização em cadeia (PCR) para o <i>BMP15</i> 41
Tabela 10.	Protocolo das reações de polimerização em cadeia (PCR) para o <i>STRA8</i> 42

RESUMO

Santos MAG. Pesquisa de mutações em genes envolvidos na diferenciação e manutenção das células germinativas em pacientes portadores de distúrbio do desenvolvimento gonadal 46,XX [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 75p.

Diversos genes expressos durante a diferenciação das células germinativas atuam no desenvolvimento ovariano. A diferenciação das células somáticas ovarianas depende do número de células germinativas pré-meióticas que migram para a fenda gonadal. A expressão espaço-temporal de genes envolvidos na diferenciação dessas células e a posterior sobrevivência dos oócitos meióticos são de interesse no estudo dos distúrbios desenvolvimento sexual (DDS) 46,XX. Entre os genes envolvidos nesses processos estão o NANOS3, BMP15 e STRA8. O NANOS3, uma molécula de ligação ao RNA que bloqueia a via apoptótica, assegura a sobrevivência das células germinativas durante sua migração para o interior da gônada. O STRA8 atua no início da meiose das células germinativas na gônada de embriões XX, sendo o primeiro sinal de dimorfismo gonadal. Por outro lado a subsequente sobrevivência dos oócitos é controlada por fatores de transformação e crescimento como o BMP15, que promove a diferenciação das células da granulosa que por sua vez participam indiretamente da diferenciação dos oócitos e das células da teca. Neste trabalho pesquisamos a presença de mutações inativadoras nos genes NANOS3 e BMP15 em 45 pacientes com disgenesia gonadal (DG) 46,XX (10 casos familiais) e 40 pacientes com amenorréia secundária sem mutação nos genes FSHR e SF1. Também pesquisamos mutações nas regiões promotora proximal e codificadora do gene STRA8 de 45 pacientes com DG 46,XX, 16 pacientes com DDS ovotesticular 46,XX e 5 pacientes com DDS testicular 46,XX todos SRY negativo nos quais foram afastados defeitos moleculares nos genes DAX1, WNT4 e SOX9. No NANOS3 identificamos a mutação p.E120K em homozigose, a primeira associada ao fenótipo de DG 46,XX. Esta mutação missense foi identificada em duas irmãs com DG 46, XX e está localizada no domínio de ligação do tipo dedo de zinco da proteína. A nova mutação não foi identificada em 200 alelos controles pesquisados. No BMP15, uma nova mutação nonsense p.O115X foi identificada em homozigose em duas irmãs com DG 46XX e em heterozigose em uma paciente com amenorréia secundária não familial. O códon de parada prematuro está localizado na região do pré-peptídeo da proteína. A nova mutação não foi identificada em 200 alelos controles pesquisados. No gene STRA8, um único polimorfismo previamente descrito na literatura (rs7805859) foi identificado na região codificadora e nenhuma alteração na região promotora proximal foi identificada. Em conclusão, identificamos pela primeira vez uma mutação no gene NANOS3 associado á DG 46,XX e confirmamos a participação do BMP15 neste fenótipo. Distúrbios do desenvolvimento gonadal 46, XX podem ser causados por mutações em genes envolvidos tanto na diferenciação quanto manutenção das células germinativas ovarianas.

Descritores: 1.Determinação sexual (genética) 2.Disgenesia gonadal 46,XX 3.Falência ovariana prematura 4.Amenorréia primária 5.Infertilidade 6.Células germinativas 7.Mutação

SUMMARY

Santos MAG. Mutation analysis of genes involved in differentiation and maintenance of germ cells in patients with 46,XX disorders of gonadal development [thesis]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 75p.

Several genes expressing during the germ cell differentiation act in ovary development. The differentiation of somatic ovary cells depends of a pool of pre meiotic germ cells migration into the gonad. The space and temporal expression pattern of some genes involved with germ cell differentiation and the subsequently oocyte survival should investigated in the disorders of sexual development (DSD) 46,XX. Some key genes involved with these processes are: NANOS3, BMP15 and STRA8. The NANOS3, a RNA binding molecule that blocks the apoptotic pathway, ensures the survival during migration into genital ridge. The STRA8 acts in the bigining of germ cells meioses in XX embryos and mark the first sexual gonadal dimorphism. In other hand the subsequently oocyte survival is controlled through transforming growth factor member BMP15, that guarantees granulose cells differentiation that acts indirectly in meiotic oocyte and theca cells differentiation. In this work we searched for the presence of inactivating mutations in NANOS3 and BMP15 in 45 patients with 46XX gonadal dysgenesis (10 familial cases) and 40 patients with secondary amenorrhea without FSHR and SF1 mutation. We also searched for inactivating mutations in coding and proximal promoter region of STRA8 in 45 patients with 46XX gonadal dysgenesis, 16 ovotesticular disorder of sex development (DSD) patients and five 46XX testicular DSD patients all SRY negative and molecular defects in DAX1, WNT4 and SOX9 gene. In NANOS3 we identified the mutation p.E120K in homozygous state, the first associated with DG 46,XX phenotype. This missense mutation was identified in two sisters with 46XX GD and affects a zinc finger domain of the protein. The new variant was absent in 200 control alleles. In BMP15, a new nonsense mutation p.Q115X was identified two sisters in homozygous state and in one sporadic case of secondary amenorrhea in heterozygous state. The premature codon STOP affects the pro-peptide domain of the protein. The new variant was absent in 200 control alleles. In STRA8, only a previously described polymorphism (rs7805859) was identified without any other variation in coding or proximal promoter region. In conclusion, we identified for the fist time mutation in NANOS3 associated with DG 46XX and corroborate the role of BMP15 in this phenotype. Disorders of gonadal development 46,XX may be involved with differentiation and maintenance of ovarian germ cells.

Descriptors: 1.Sex determination (genetics) 2.46,XX gonadal dysgenesis 3.Premature ovarian failure 4.Primary amenorrhea 5.Infertility 6.Germ cells 7.Mutation

1 INTRODUÇÃO

1.1 Determinação sexual

A determinação sexual nos mamíferos é um processo dinâmico e complexo que requer a interação de múltiplos fatores. Durante o desenvolvimento da gônada bipotencial fetal, tanto as células germinativas quanto as células somáticas adquirem características sexoespecíficas. Genes dos cromossomos sexuais e também genes autossômicos são responsáveis por sinalizar e controlar a diferenciação da gônada primordial em ovário ou testículo. Entretanto, muitos dos eventos que participam do processo de diferenciação sexual não foram ainda completamente elucidados (Matzuk e Lamb, 2008).

1.1.2 A gônada primordial

Em embriões humanos, a gônada primordial ou gônada bipotencial se desenvolve aproximadamente 32 dias após a fertilização, na superfície ventral dos mesonéfrons craniais, derivados do mesoderma intermediário, é do mesoderma intermediário que também surgirão a glândula adrenal e o sistema urinário. A gônada primordial inicialmente é formada exclusivamente por células somáticas: células mesenquimais provenientes do folheto mesodérmico e células do epitélio celômico, de origem endodérmica, que cobrem a superfície celômica da fenda genital.

1.1.3 As células germinativas

Inicialmente formada apenas por células somáticas, as gônadas são subseqüentemente colonizadas pelas células germinativas, também chamadas de células germinativas primordiais (CGPs). Na quarta semana da vida embrionária as células próximas a base do alantóide, derivadas do folheto epiblástico, se diferenciam em CGPs e se movem para o interior da gônada primitiva (Figura 1A). Estas CPGs darão origem às células germinativas da gônada e também às células mesodérmicas do embrião. Nesse período, é possível a detecção de dois fatores importantes, o *OCT4* (Octamer-binding transcription factor – 4) e o *C-KIT* (proto-oncogene tyrosine-protein kinase Kit), característicos deste tipo celular. Neste momento, as células ganham mobilidade e migram pelo mesentério dorsal até alcançar a fenda gonadal na quinta semana (Figura 1B).

A partir desse estágio, o desenvolvimento gonadal depende da interação de múltiplos fatores, como proteínas de matrix extracelular expressos pelas células somáticas e genes anti-apoptótocos expressos pelas próprias células germinativas para controlar a migração, proliferação e a sobrevivência das CGPs tanto nos embriões XX quanto nos XY (Matzuk e Lamb, 2008).

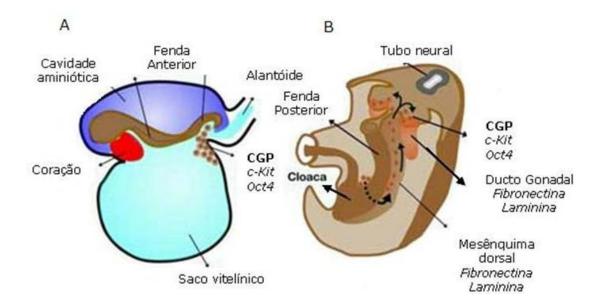


Figura 1. Regulação da migração das células germinativas. **A.** Embrião de 4 semanas: diferenciação das células germinativas primordiais ocorre das células derivadas do epiblasto presentes no saco vitelino próximo a base do alantóide. As CGPs expressam fosfatase alcalina, *OCT4* e *C-kIT*. Proteínas de células não diferenciadas, como a fibronectina e laminina, são expressas ao longo da via de diferenciação destas células. **B.** Embrião de 5 semanas: CGPs migram ao longo do mesentério dorsal e entram pela fenda gonadal para o interior da gônada

1.1.3.1 As células germinativas durante a diferenciação ovariana

A partir da sétima semana, as células germinativas proliferativas se diferenciam em oogônia que por sua vez são envolvidas por uma camada de células foliculares, derivadas das células de suporte precursoras do epitélio celômico. Uma vez iniciada a meiose, as oogônias se diferenciam em oócitos e formam o folículo primordial. No final da sétima semana a atividade proliferativa cessa e a maioria das células já estão em estágio de prófase meiótica. Os oócitos então, progridem até a fase de diplóteno e permanecem neste estágio até o período ovulatório na vida adulta (Kocer A *et al*, 2009).

1.2 Genes envolvidos na determinação ovariana

A identificação de fatores essenciais para o desenvolvimento ovariano, como *C-KIT*, *SF1*, *DAX1*, *WNT4*, *RSPO1*, *FOXL2* e outros, tornou-se possível a partir de estudos em animais. Além disso, a identificação de mutações nesses genes em humanos foi de extrema utilidade para a compreensão do papel desempenhado por cada um deles na determinação sexual e organogênese ovariana (Matzuk e Lamb, 2008).

Alguns genes são essencialmente expressos durante os primeiros estágios de desenvolvimento da gônada bipotencial em ambos os sexos, como é o caso do *C-KIT* e do *SF1*, e podem ser diferentemente modulados no período de determinação sexual, desempenhando diferentes funções dependendo da gônada a ser formada. Devido à complexidade de suas funções, a inativação desses genes pode resultar em fenótipos variáveis (Matzuk e Lamb, 2008).

1.2.1 *C-KIT*

O proto-oncogene tyrosine-protein kinase Kit (C-KIT) é responsável por direcionar a migração das CGPs para o interior da gônada bipotencial e sua expressão perdura nas espermatogônias e também nos oócitos primários até a foliculogênese. Nesse estágio, o montante celular é fundamental para a formação gamética. Os modelos animais nos quais não há expressão do *c-Kit* apresentam um fenótipo de infertilidade devido ao decréscimo substancial de células germinativas na

gônada (80% nas fêmeas e 70% nos machos (Besmer *et al*, 1993). No entanto, em humanos a inativação do *C-KIT* foi descrita associada a um raro distúrbio na melanogênese (Spritz *et al*, 1992; Richards *et al*, 2001). Há apenas uma descrição de mutação no *C-KIT* em uma paciente com falência ovariana prematura isolada (Shibanuma *et al*, 2002).

1.2.2 *SF1*

O gene nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1 (ND5A1) ou SF1 codifica um receptor nuclear órfão expresso no córtex adrenal, hipotálamo e gonadotrofos durante o desenvolvimento embrionário (Parker et al, 1997). O SF1 regula a transcrição de vários genes envolvidos na esteroidogênese e diferenciação sexual (Wong et al, 1996; Parker et al, 1997). Os camundongos machos que não expressam o Sf1 apresentam agenesia adrenal e gonadal, resultando em insuficiência adrenocortical e reversão sexual tanto da genitália interna quanto da externa, além de bloqueio na produção de gonadotrofinas (Parker et al, 1997).

Em humanos, mutações *missense* no *SF1* foram identificadas em pacientes 46,XY portadores de disgenesia gonadal completa ou parcial associado ou não ao quadro de insuficiência adrenal (Achermann *et al*, 1999; Ito, *et al*, 2000; Correa *et al*, 2001; Hasegawa *et al*, 2004; Mallet *et al*, 2004; Lin e Achermann, 2008). Recentemente, mutações inativadoras no *SF1* foram descritas em pacientes 46,XX, portadoras de falência ovariana isolada, familiar ou esporádica (Lourenço *et al*, 2009).

1.2.3 RSPO1 e WNT4

O gene *R-spondin homolog Xenopus laevis (RSPO1)*, precursor do *wingless-type MMTV integration site family, member 4 (WNT4)* regula uma via essencial (WNT-β catenina) para o desenvolvimento ovariano. Esse gene é expresso nas células somáticas ovarianas e estabiliza a atividade nuclear da β-catenina, essencial na determinação do ovário (Capel, 2006; Wilhelm, *et al*, 2007). Em contraste, no embrião XY, a via de sinalização *SRY/SOX9* desempenha um papel supressor da via Wnt-β-catenina ovariana (Kocer *et al*, 2008).

Camundongos que não expressam o *Rspo1*, não expressam o *Wnt4* e o fenótipo gonadal dos camundongos que não expressam cada um desses genes é semelhante (Chassot *et al*, 2008). As fêmeas que apresentam bloqueio nessa via de sinalização possuem ovotestes, com a presença de cordões testiculares e de células de Leydig (Vainio, *et al*, 1999; Heikkila *et al*, 2005).

Mutações no *RSPO1* em humanos estão associadas a reversão sexual em indivíduos 46,XX com hiperqueratose palmoplantar e predisposição para o desenvolvimento de carcinoma de pele. Até o momento nenhuma mutação foi identificada em casos de DDS ovotesticular 46,XX isolado (Parma *et al*, 2006).

Em humanos, a duplicação do cromossomo 1, compreendendo o *locus* do *WNT4*, resulta em genitália ambígua em indivíduos 46,XY, confirmando sua função na determinação ovariana (Jordan *et al*, 2001).

Mutações inativadoras do *WNT4* foram descritas em mulheres com virilização e ausência de derivados müllerianos, fenótipo distinto da

síndrome de *Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser* clássica, e muito semelhante ao fenótipo de camundongos fêmeas nocaute para o *Wnt4* (Biason-Lauber *et al*, 2004; Biason-Lauber *et al*, 2007; Philibert *et al*, 2008).

1.2.4 FOXL2

Camundongos fêmeas que não expressam o gene *Forkhead Transcription Factor 2 (Foxl2)* apresentam falta de diferenciação das células da granulosa, com consequente ausência de foliculogênese e falência ovariana (Uda *et al*, 2004).

Mutações no gene *FOXL2* estão associadas à síndrome de *blepharophimosis—ptosis—epicanthus tipo 1 (BPES)*, caracterizada por mal-formações dos olhos associada a falência ovariana (Crisponi *et al*, 2001). Em pacientes com falência ovariana isolada mutações no *FOXL2* foram identificadas em cerca de 3% dos casos estudados (De Baere *et al*,2001; Harris *et al*, 2002, Walkins *et al*, 2006).

1.3 Genes envolvidos na diferenciação e manutenção das células germinativas

A diferenciação das células somáticas do ovário depende da presença de células germinativas na gônada (McLaren, 2000). Assim, genes envolvidos na diferenciação dessas células, bem como sua

posterior manutenção são de interesse no estudo dos distúrbios do desenvolvimento gonadal.

A sobrevivência dos oócitos depende de duas vias sinalizadoras: uma autócrina, proporcionada geralmente por genes anti-apoptóticos, e outra parácrina, na qual algumas moléculas ativam a proliferação e diferenciação de células de suporte da formação do folículo primordial até a ovulação (Figura 2. adaptada de Moreli e Cohen, 2005).

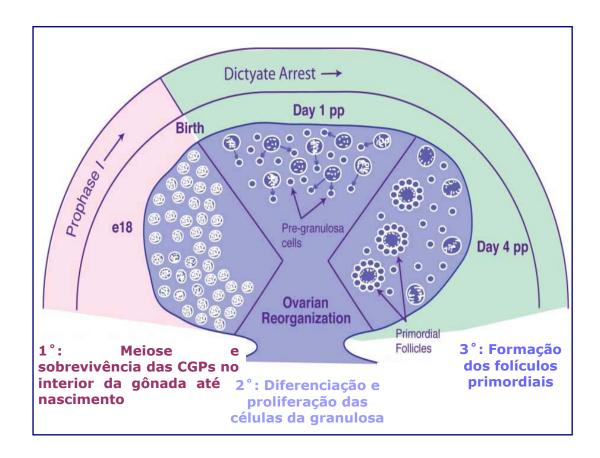


Figura 2. Eventos relacionados com a diferenciação e sobrevivência das células germinativas do ovário

1.3.1 *NANOS3*

O gene nanos homolog 3 (Drosophila) (NANOS3) é expresso pelas CGPs e é considerado um gene anti-apoptótico durante o estágio de migração das CPGs para o interior da gônada (Suzuki H et al, 2008). Moléculas de ligação ao RNA (NANOS) modulam a expressão gênica impedindo a tradução de transcritos durante o desenvolvimento gonadal e estão envolvidos com a diferenciação das células germinativas tanto em invertebrados quanto em vertebrados (Lehmann and Nusslein-Volhard, 1991; Pilon and Weisblat, 1997; Asaoka et al, 1998; Subramaniam and Seydoux, 1999; MacArthur et al, 1999; Koprunner et al, 2001; Tsuda et al, 2003; Fujii et al, 2006). Camundongos machos e fêmeas que não expressam o Nanos3 perdem completamente as células germinativas durante o desenvolvimento gonadal (Tsuda et al, 2003). O gene NANOS3 nos humanos está localizado na região 13.13 do braço curto do cromossomo 19 e possui 2 exons. O estudo desse gene foi realizado em 88 mulheres caucasianas e 88 chinesas portadoras de falência ovariana prematura, porém nenhuma mutação foi identificada (Qin et al, 2003).

Tendo em vista a importância do *NANOS3* para a sobrevivência das células germinativas, o presente estudo concentra-se na busca de mutações inativadoras nesse gene em pacientes portadoras de amenorréia primária e secundária.

1.3.2 *BMP15* e *GDF9*

Dentre os genes de sinalização parácrina nas células do ovário estão o *Bone Morfogenic Protein 5 (BMP15)* e o *Growth Diferentiation Factor 9 (GDF9*).

O GDF9 é um fator de diferenciação e crescimento secretado pelos oócitos que atua nas células somáticas do ovário. Estudos *in vivo* demonstram a ação do Gdf9 nas células da granulosa que por sua vez participam indiretamente da diferenciação dos oócitos meióticos e também das células da teca (Dong, *et al*, 1996; Carabatsos *et al*, 1998; Elvin *et al*, 1999). O GDF9 regula a expressão de alguns genes e processos durante o período pré-ovulatório. A indução da hialuronidase sintetase 2, ciloxigenase 2 e do receptor E2/EP2 bem como a inibição do receptor de LH e do ativador plasminogênico urokinase que são necessárias para a expansão do *cumulus* que sustenta o oócito (Elvin *et al*, 1999 e Elvin *et al*, 2000). Estudos de expressão do gene *Gdf9* em ratas mostram seu papel no estímulo do crescimento do folículo pré-antral e também na produção basal de estradiol pelas células da granulosa, demonstrando sua múltipla função durante os primeiros estágios da foliculogenese até o período pré-ovulatório (Hayashi *et al*,1999; Vitt et al, 2000).

Em humanos, o *GDF9* está localizado no cromossomo 5 e é constituído por 3 exons. Mutações no *GDF9* foram associadas a casos de amenorréia primária e secundária (Dixit *et al*, 2005; Laissue *et al*, 2006).

Assim como o *GDF9*, o *BMP15* também pertence à família de fatores de transformação e crescimento do tipo β (TGF- β), expressos pelas

células germinativas durante a foliculogênese (Di Pasquale *et al*, 2004). O *Bmp15* foi primeiramente estudado em ovelhas. Em algumas linhagens com mutações em heterozigose no *Bmp15* (*Inverdale e Hanna; FecX^I/FecX^H*), há o aumento na freqüência ovulatória e no nascimento de gêmeos ou trigêmeos (Galloway, *et al*, 2000). Surpreendentemente mutações em homozigose no *Bmp15* levam a um fenótipo de infertilidade nesses animais, muito semelhante aos camundongos que não expressam o *Gdf9* (Yan *et al*, 2001).

A expressão do *Bmp15* acompanha o padrão de expressão do gene *Gdf9* nos oócitos (Dube *et al*, 1998; Elvin *et al*, 2000). A estrutura molecular dos dois peptídeos é semelhante, o que propicia formação de heterodímeros. O papel desses dois peptídeos tanto na forma de homodímeros quanto na forma de heterodímeros é imprescindível durante o desenvolvimento ovariano nos mamíferos (Yan *et al*, 2001).

Em camundongos os homodímeros de Gdf9 parecem desempenhar um papel prioritário na sinalização de sua via, enquanto os homodímeros de Bmp15 e heterodímeros de Bmp15/Gdf9 provavelmente possuem um papel sinérgico no ovário (figura 3A). Já em ovelhas os homodímeros de Bmp15 são mais potentes na sinalização do receptor embora as outras formas de dimerização possam também desempenhar um papel significativo (Figura 3B).

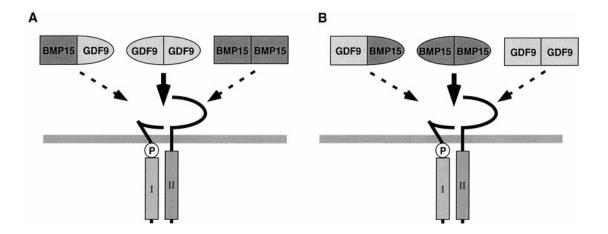


Figura 3. Modelo da diferença funcional do BMP15 e GDF9 em mamíferos. **A.** Em camundongos a sinalização do receptor é realizada preferencialmente por dímeros de GDF9; **B.** Em ovelhas a sinalização do receptor é realizada preferencialmente por dímeros de BMP15

Em humanos, o gene *BMP15* está localizado no braço curto do cromossomo X e é constituído por 2 exons. Os peptídeos formados são subseqüentemente clivados em um pró-peptídeo e um peptídeo maduro (Figura 4).

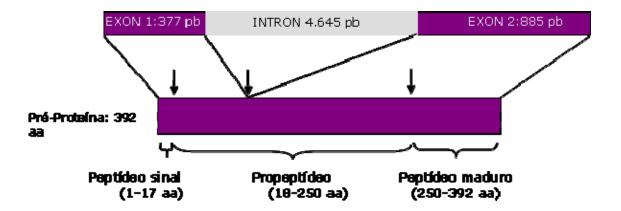


Figura 4. Representação esquemática do gene *BMP15*, com os 2 exons e seu produto protéico (as setas mostram a localização dos sítios de clivagem)

A primeira mutação no *BMP15* foi identificada na região do própeptídeo em duas irmãs com amenorréia primária. O estudo funcional mostrou que mutações no *BMP15* em heterozigose apresentam um efeito dominante negativo. Apenas um alelo mutado é suficiente para impedir a função do peptídeo formado a partir do alelo normal. Os pró-peptídeos com alterações nos sítios de dimerização formam homo e heterodímeros instáveis de rápida degradação, impedindo a sinalização de seu receptor e a proliferação das células da granulosa *in vitro* (Di Pasquale *et al*, 2004).

Os trabalhos subseqüentes de pesquisas de mutações no gene *BMP15* foram realizados em pacientes que apresentavam amenorréia primária e secundária. As variantes encontradas estão descritas na Tabela 1 com base na recente revisão feita por Lassuie e colaboradores (2008).

Tabela 1. Mutações no *BMP15* associadas ao fenótipo de amenorréia primária e secundária

Estado da Mutação	Mutação	Fenótipo	Referência
Heterozigose	p.Y235C	АР	Di Pasquale <i>et al</i> (2004, 2006); Laissue <i>et al</i> (2006)
Heterozigose	p.L148P	AS	Rossetti et al (2008);
Heterozigose	p.R68W	AS	Di Pasquale <i>et al</i> (2004); Laissue <i>et al</i> (2006); Rossetti <i>et al</i> (2008)
Heterozigose	p.R61W	AS	Dixit <i>et al</i> (2006)
Homozigose	p.E211X	AP	Dixit <i>et al</i> (2006)
Heterozigose	p.R138H	AP	Rossetti et al (2008)

AP; amenorréia primária; AS: amenorréia secundária

Até o momento foram descritas 5 mutações em heterozigoze no *BMP15* por 5 grupos distintos. Segundo o estudo de Dixit e colaboradores, 21 de 133 (15.8%) mulheres com falência ovariana prematura apresentaram mutações *missense* tanto no *BMP15* quanto no *GDF9*. (Dixit *et al* 2005). Um recente estudo de mutações no *BMP15* em 300 mulheres com falência ovariana prematura (45 com amenorréia primária e 255 com amenorréia secundária) identificou 1 mutação em amenorréia primária e 5 mutações em amenorréia secundária acompanhadas do estudo *in vitro* comprovando que essas mutações em heterozigose afetam a função da proteína (Rossetti *et al*, 2008).

Neste estudo nos concentramos na análise do *BMP15* em pacientes portadoras de amenorréia primária e secundária.

1.3.3 STRA8 e a meiose

Embora muitos genes já tenham sido estudados tanto em modelos animais quanto em pesquisas de mutações em humanos no identificar genéticas intuito de as causas dos distúrbios de desenvolvimento gonadal, sabe-se que o controle da meiose das células germinativas XX durante a embriogênese através da expressão do Stimulated by retinoic acid 8 (STRA8) é o grande marco da determinação ovariana. Já as células germinativas XY mantêm a meiose suprimida até o nascimento. (Figura 5).

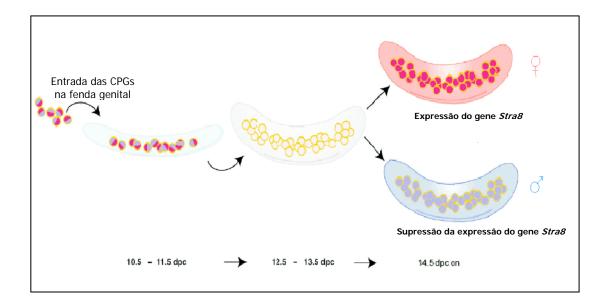


Figura 5. Diferenciação das CGPs masculinas e femininas no tempo 14.5 dpc após a entrada na gônada. A expressão do gene *Stra8* marca o primeiro sinal de dimorfismo sexual gonadal

Uma vez que a meiose é a primeira característica exclusiva das gônadas embrionárias XX, a criação de uma "janela" temporal e espacial durante a meiose das células germinativas tornaria regiões distais da gônada vulneráveis ao processo de reversão sexual. Estudos utilizando co-culturas de gônadas embrionárias demonstraram que as células germinativas meióticas das gônadas XX são capazes de bloquear a via de diferenciação masculina, inibindo a formação dos cordões testiculares em gônadas XY (Humphrey, et al, 2003).

Dessa forma, é possível que a expressão do gene *STRA8* na gônada XX module outros fatores inibidores da via masculina e impeça a diferenciação das células somáticas em células de Sertoli e, assim, a formação dos cordões testiculares. Se tais inibidores não forem expressos, é possível que o desenvolvimento testicular ocorra em

indivíduos com o cariótipo XX mesmo na ausência do gene *SRY*. Como já foi descrito anteriormente, a presença dos oócitos (células meióticas) se torna imprescindível durante o processo de diferenciação ovariana, já que no caso dessas células morrerem ou serem eliminadas, as células da granulosa são capazes de diferenciar-se em células de Sertoli na gônada primitiva (McLaren, 2000).

O gene *STRA8* em humanos está localizado no cromossomo 7, possui 9 éxons e codifica um RNAm de 993 pares de bases e uma proteína de 330 aminoácidos. A proteína STRA8 humana apresenta sítios de fosforilação para proteína Kinase A e C, caseína Kinase 2 e kinases dependentes de prolina, com homologia de 55% com o stra8 do camundongo (Miyamoto *et al*, 2002). A região do promotor proximal murino foi definida em estudos funcionais como a região de 400 pares de base a montante do gene *Stra8*, após análise *in vivo* da expressão da luciferase em linhagens de camundongo transgênico (Giuli *et al*, 2002). Essa seqüência possui um sítio transcricional inicial, incluindo uma seqüência TATA-box *like* e duas seqüências de ligação para receptores do ácido retinóico (Chambon, 1996).

O STRA8 é um fator de transcrição induzido por ácido retinóico que consiste em uma proteína citoplasmática fosforilada solúvel (Oulaud-Abdelghani *el al*, 1996). Em células germinativas do ovário embrionário, o aumento dos níveis de ácido retinóico promove a meiose. Em testículos embrionários essa ação é retardada inicialmente pela enzima Cyp26b1, expressa especificamente pelas células de Sertoli nos cordões testiculares nascentes e posteriormente pela expressão do

NANOS2 (proteína caracterizada por sua capacidade de ligação ao RNA). Assim, a regulação precisa dos níveis de ácido retinóico provém de um mecanismo de controle essencial da diferenciação das células germinativas nas gônadas XX e XY (Figura 6) (Suzuki et al, 2008; Koubowa *et al*, 2006).

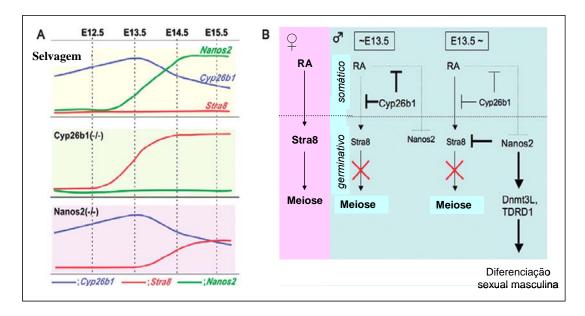


Figura 6. Modelo de repressão do *STRA8* através da expressão dos genes *Cyp26b1* e *Nanos2* pelas células germinativas XY (Suzuki e Saga, 2008)

Os camundongos que não expressam o *Stra8* apresentam uma redução significativa do tamanho dos ovários, com ausência de células germinativas e infertilidade (Koubowa *et al*, 2006).

Considerando-se a importância do gene *STRA8* na diferenciação ovariana é possível que alterações nesse gene possam estar associados aos distúrbios do desenvolvimento gonadal. Além disso, assim como outros genes envolvidos no desenvolvimento ovariano, o *Stra8* foi extensivamente estudado em modelos animais, porém nunca foi

pesquisado em humanos com distúrbios do desenvolvimento gonadal (Menck et al, 2003; Koubova et al, 2006; Baltus et al, 2006).

No presente trabalho, estudamos a presença de mutações inativadoras no gene *STRA8* nos distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XX.

1.4 Distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) 46,XX

O termo distúrbio do desenvolvimento sexual (DDS) e sua definição foram estabelecidos em 2006, por um consenso internacional formado por membros da *Lawsson Wilkings Pediatric Endocrine Society* e pela *European Society for Pediatric Endocrinology* (Lee *et al*, 2006). O conceito proposto neste consenso emergiu da evolução dos conhecimentos sobre as bases genéticas das anomalias do desenvolvimento sexual bem como da necessidade de se referir a essas patologias de forma mais apropriada.

O termo distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) engloba as condições congênitas nas quais o desenvolvimento do sexo cromossômico, sexo gonadal ou o fenótipo genital é atípico. Segundo a nova nomenclatura proposta pelo consenso, os distúrbios de desenvolvimento sexual 46,XX foram agrupados em 3 grandes grupos:

- (A) Distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) 46,XX:
 - 1. Disgenesia gonadal: forma completa e parcial
 - 2. DDS ovotesticular (previamente hermafrodita verdadeiro)
 - 3. DDS testicular (previamente homem XX)

- (B) DDS por excesso de andrógenos de origem:
 - Fetal (hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase, 3β-hidroxiesteróide desidrogenase e 11β-hidroxilase e resistência aos glicocorticóides)
 - Fetoplacentária (deficiência de aromatase e deficiência da P450 oxidoredutase)
 - 3. Materna (tumores virilizantes maternos, luteoma, exógeno)
- (C) Outros (ex. extrofia cloacal, atresia vaginal e outras síndromes)

Os distúrbios do desenvolvimento gonadal (DDG) reúnem as condições relacionadas a anormalidades do desenvolvimento sexual por anormalidades do desenvolvimento ovariano (DDS 46,XX). A descrição de pacientes com DDS ovotesticular e testicular na mesma família reforça a hipótese de que esses fenótipos sejam manifestações alternativas do mesmo defeito genético (Skordis *et al*, 1987; Maciel Guerra *et al*, 2008). Nesse estudo daremos enfoque apenas aos distúrbios do desenvolvimento gonadal em pacientes 46,XX.

1.4.1 Disgenesia gonadal 46,XX

A disgenesia gonadal 46,XX caracteriza-se por ausência do desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e amenorréia primária, associado a gônadas em fita, níveis elevados de gonadotrofinas e cariótipo 46,XX. A disgenesia gonadal é uma das causas de falência

ovariana prematura que pode ser causada por alterações cromossômicas ou por defeitos nos genes ligados ao cromossomo X ou autossômas, doenças autoimunes e alterações tóxicas. Com relativa freqüência, a causa etiológica não é conhecida, sendo então denominada de idiopática (Vilodre et al, 2007 1.4.1 - Distúrbios do desenvolvimento gonadal

1.4.2 DDS ovotesticular

Dentre os distúrbios do desenvolvimento sexual, DDS ovotesticular responde por cerca de 10% dos casos. O diagnóstico é histológico, identificando-se a coexistência de tecido testicular e ovariano no mesmo indivíduo. Para o diagnóstico histológico é necessária a caracterização de folículos ovarianos ou corpora albicans, que definem a estrutura ovariana e de túbulos seminíferos ou espermatozóides, que definem a existência de tecido testicular. A presença de células de Leydig ou células hílares e de estroma ovariano não define uma estrutura testicular ou ovariana, respectivamente (Damiani et al, 2005). O ovário e o testículo podem existir separadamente como estruturas laterais pareadas, ou ambos os elementos podem estar combinados em uma mesma gônada, o ovotestes. Segundo os estudos de casos envolvendo DDS ovotesticular 46,XX, a gônada mais comum é o ovotestes, seguido pelo ovário e, menos comumente, pelo testículo (van Niererk e Retief, 1981; Krob, et al. 1994; Damiani et al, 2005). A posição das gônadas varia de intra-abdominal a labioescrotal. As apresentações clínicas variam, porém a grande maioria apresenta ambigüidade genital. O desenvolvimento mamário é comum no DDS ovotesticular. A virilização progressiva na puberdade usualmente acompanha o desenvolvimento das mamas e muitas vezes de sangramento vaginal em forma de hematuria.

1.4.3 DDS testicular

Os pacientes portadores de DDS testicular são usualmente descritos como indivíduos que apresentam aspectos clínicos e hormonais muito semelhantes ao dos pacientes com síndrome de Klinefelter diferindo destes basicamente por possuírem cariótipo 46,XX e de normalmente não apresentarem alta estatura e hábito eunucóide (de la Chapelle,1981). Pacientes com DDS testicular são classificados em duas categorias de acordo com sua apresentação clínica: a primeira é caracterizada por genitália externa masculina normal e é geralmente diagnosticada em idade póspuberal em geral por ginecomastia ou infertilidade; e a segunda, caracterizada por ambigüidade dos genitais externos, que correspondem a aproximadamente 10% dos casos. Quanto à genitália interna, nos pacientes com a forma clássica geralmente ocorre o desenvolvimento normal dos ductos de Wolff e involução das estruturas müllerianas, enquanto aqueles com ambigüidade genital externa possuem um misto de derivados müllerianos e wolffianos. O aspecto gonadal revela testículos imaturos ou disgenéticos com aplasia germinativa e células de Sertoli normais ou hiperplásicas (Boucekkine et al, 1994).

1.5 Causas genéticas dos distúrbios do desenvolvimento gonadal 46,XX

Os distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) por anormalidades do desenvolvimento gonadal são causados durante a embriogênese, geralmente por aberrações cromossômicas como translocações, mosaicismos, mutações ou deleções de genes envolvidos na cascata da determinação sexual. A maioria dos pacientes apresenta constituição cromossômica 46,XX (60% dos casos), sendo o restante composto por pacientes com translocações do gene *SRY* para o cromossomo X (10%) e mosaicismos variados ou quimeras (46,XX/46,XY) que correspondem aos restantes 30% dos casos (Krob *et al*,1994; Damiani *et al*, 2005).

Uma vez que a maioria dos casos de DDS apresenta cariótipo 46,XX sem aberração cromossômica, a busca de mutações inativadoras em genes envolvidos no desenvolvimento ovariano, que possam esclarecer o fenótipo, consiste em uma importante estratégia para melhor entendimento desses distúrbios.

2 OBJETIVOS

- Pesquisar a presença de mutações inativadoras no gene NANOS3 em mulheres portadoras de amenorréia primária e secundária
- 2. Pesquisar a presença de mutações inativadoras no gene *BMP15* em mulheres portadoras de amenorréia primária e secundária
- Pesquisar a presença de mutações inativadoras na região promotora e codificadora do gene STRA8 em pacientes portadores de distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) 46,XX (disgenesia gonadal, ovotesticular, testicular).

3 MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo, em 07/04/2008, protocolo nº 1226/07. Todos os pacientes ou seus responsáveis assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para participação nos protocolos clínicos, coleta das amostras de sangue e análise de DNA segundo as normas do Comitê de Ética.

3.1 Casuística

Estudamos 45 pacientes com quadro de amenorréia primária e ausência de desenvolvimento de mamas associado a níveis elevados de gonadotrofinas com predomínio dos níveis de FSH, sugerindo 40 quadro de disgenesia gonadal completa; pacientes apresentavam amenorréia secundária também com níveis elevados de gonadotrofina FSH>LH; 16 pacientes portadores de DDS ovotesticular, caracterizado pela presença de tecido ovariano e testicular no mesmo indivíduo; 5 pacientes portadores de DDS 46,XX testicular. Os pacientes portadores distúrbios do desenvolvimento gonadal são provenientes do ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP - São Paulo (HCFMUSP) e do Departamento de Pediatria; Departamento de Genética Médica - Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) - Campinas (SP).

As dosagens hormonais e os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM 42 do HCFMUSP e pelo Departamento de Genética Médica - Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) - Campinas (SP).

3.1.1 Avaliação clínica

Todos os pacientes foram submetidos a um exame clínico geral com avaliação cuidadosa da genitália externa. A presença de estigmas somáticos encontrados na síndrome de Turner foi afastada. No levantamento dos antecedentes familiares pesquisou-se consangüinidade e presença de outros afetados na família. Todos os pacientes com tecido testicular eram *SRY* negativo (em DNA extraído de leucócitos periféricos e ou tecido gonadal). Nos pacientes portadores de DDG 46,XX ovotesticular e testicular foi excluída a presença de mutações inativadoras nos genes *DAX1* e *WNT4* (Domenice *et al*, 2004) e do excesso de número de cópias do gene *SOX*9, genes estes potencialmente responsáveis por distúrbios da determinação sexual.

3.1.1.1 Avaliação clínica e hormonal em mulheres com amenorréia primária e secundária

Foram realizadas dosagens basais das gonadotrofinas (LH e FSH) e do estradiol. No período do estudo foram utilizados dois métodos de dosagens para as gonadotrofinas séricas: o radioimunoensaio (RIE) com duplo anticorpo (*Wallac, Turku, Finlândia*) ou o ensaio imunofluorométrico (IFMA) (*Perkin Elmer, Wallac, Finlândia*).

pacientes portadoras de disgenesia gonadal 46,XX apresentavam queixa principal amenorréia primária. como ultrassonografia pélvica demonstrou útero de volume reduzido e ovários pequenos ou não visualizados. Os valores de FSH variaram de 28 a 117 U/L e os de LH variaram de 8 a 50 U/L. Os valores de E2 variaram de <13 18 pg/mL (Tabela 2). Nenhuma paciente apresentava doenças autoimunes ou mutações no gene SF1. A média da idade de diagnóstico foi de 24 anos. Das doenças associadas relatas nessas pacientes apenas a paciente 6 (eflúvio telógeno crônico); 7 (Doença de Wilson e ceratocone); 15 (atraso do desenvolvimento psicomotor). Apenas as pacientes da família 2 (F2) e família 4 (F4) relataram consangüinidade na família. Ao todo 10 casos familiais e 26 esporádicos foram estudados (Tabela 2).

Nas 40 mulheres com amenorréia secundária os valores de FSH variaram de 32 a 157 U/L e os de LH variaram de 14 a 89 U/L. Os valores de E2 variaram de 5 a 20 pg/mL. A média da idade de diagnóstico foi de 29 anos. Todos os casos estudados foram esporádicos e nenhuma paciente relatava consangüinidade na família. Das doenças associadas apenas a paciente 24 apresentou câncer de mama invasivo após

desenvolver amenorréia secundária e a paciente 34 que apresentava endometriose (Tabela 3).

Tabela 2. Avaliação clínica e hormonal das pacientes portadoras de amenorréia primária

Paciente	IC* (anos)	LH U/L	FSH U/L	E2 pg/mL
1 (F1)#	19	31	74	65**
2 (F1)	19	46	117	59**
3 (F2)	20	20	41	<13
4 (F3)	19	24	95	ND
5 (F3)	22	39	111	ND
6	14	51	87	<13
7 (F4)	15	50	52	<13
8 (F4)	18	25	94	18
9 (F2)	13	11	32	<13
10	27	47	138	<13
11 (F5)	29	17	31	<13
12	14	29	100	<13
13	36	24	38	22
14	22	55	119	<13
15	11	17	48	59**
16 (F5)	32	21	44	<13
17	26	<0,6	<1,0	<13
18 (F6)	22	<0,6	1,5	<13
19 (F6)	24	8	10	20
20	17	15	27	<13
21	16	17	18	39**
22 (F7)	31	14	30	17
23 (F7)	28	19	60	30
24	15	10	68	ND
25	18	10	48	ND

continua

Tabela 2 (conclusão). Avaliação clínica e hormonal das pacientes portadoras de amenorréia primária

Paciente	IC* (anos)	LH U/L	FSH U/L	E2 pg/mL
26	14	34	114	30
27	13	11	68	ND
28	24	ND	ND	ND
29	28	ND	ND	ND
30	25	ND	ND	ND
31	31	ND	ND	ND
32	21	ND	ND	ND
33	31	ND	ND	ND
34	15	ND	ND	ND
35	29	ND	ND	ND
36	37	ND	ND	ND
37 (F8)	18	28	64	52**
39 (F9)	12	63	>150	42**
40 (F9)	16	61	21	<13
41	26	45	61	<13
42	16	47	134	<13
43	15	16	47	<13
44 (F10)	14	14,	64	<13
45 (F10)	14	25	56	<13

[#] casos familiais; IC* idade cronológia ao diagnóstico; ** em uso de estrógeno; S: sim, N: não; ND não disponível

Tabela 3. Avaliação clínica e hormonal das pacientes portadoras de amenorréia secundária

Paciente	IC* (anos)	LH UI/L	FSH UI/L	E2 pg/mL
1	28	21	71	ND
2	36	40	99	ND
3	40	38	32	ND
4	30	18	34	ND
5	28	36	59	13
6	19	68	110	10
7	20	34	76	9
8	25	27	80	15
9	31	46	92	5
10	39	35	89	15
11	31	31	50	10
12	24	25	76	5
13	34	89	158	5
14	30	29	46	17
15	28	33	88	13
16	36	20	80	13
17	34	31	49	18
18	32	29	52	11
19	35	35	110	5
20	35	26	50	18
21	35	30	71	19
22	24	39	61	15
23	28	15	52	20
24	25	33	99	15
25	31	38	69	12
26	33	28	91	5
27	18	45	56	16
28	31	30	48	5
29	18	18	58	15
30	18	23	113	9,5
31	25	60	98	16
32	28	46	71	10
33	20	27	98	9
34	35	14	37	18
35	35	29	77	10
36	28	35	82	19
37	29	65	132	5
38	35	56	84	5
39	34	48	150	12
40	25	33	58	7,5

IC* idade cronológia ao diagnóstico; S: sim, N: não; ND: não disponível

3.1.2 DDS 46, XX com desenvolvimento de tecido testicular

Dos cinco casos estudados neste grupo quatro eram esporádicos e um familial e negavam consangüinidade. Foram estudados 16 pacientes com DDS 46, XX ovotesticular e 5 pacientes com DDS 46, XX testicular.

3.1.2.1 DDS 46, XX ovotesticular

Todos os 16 pacientes apresentavam na avaliação clínica inicial genitália ambígua. O estudo histológico das gônadas revelou a presença de ovotestes bilateral em 9 casos. Sete pacientes apresentavam ovotestes unilateral e a gônada contralateral foi ovário em quatro casos e testículo nos outros três.

A avaliação hormonal inicial destes pacientes não foi possível em 7 pacientes que haviam sofrido manipulação cirúrgica prévia. Assim 9 pacientes foram avaliados quanto aos níveis basais de gonadotrofinas que se apresentaram normais para a faixa etária. Todos os pacientes avaliados apresentavam valores de testosterona basal inferiores aos valores normais. Dos 9 pacientes pré-púberes submetidos ao teste de estímulo com hCG apenas o paciente 8, avaliado aos 2 anos de idade, apresentou incremento normal dos níveis de testosterona.

Os dados clínicos e histopatológicos estão sumarizados na Tabela 4.

3.1.2.2 DDS 46,XX testicular

Dos 5 pacientes deste grupo, 2 apresentavam genitália externa masculina normal e 3 apresentavam genitália externa ambígua sendo que o paciente 3 relatava correção cirúrgica de criptorquidia unilateral na infância.

Todos os pacientes apresentaram hipogonadismo hipergonadotrófico com predomínio dos níveis de FSH em relação aos de LH e níveis basais de testosterona reduzidos. Os dados clínicos e histopatológicos destes pacientes estão sumarizados na Tabela 4.

Método

Tabela 4. Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes 46,XX com DDS ovotesticular e testicular

	Tecido Gonadal						Derivados	de Muller	Derivados de Wolff	
Paciente	Diagnóstico	Idade (anos)*	Direito	Esquerdo	Genitália externa	Seio UG	Útero	Trompas	Epidídimo	Vaso deferente
1	DDS T	4	Т	Т	Ambígua	-	Ausente	Bilateral	Bilateral	Ausente
2	DDS T	18	Т	Т	Masculina	-	Ausente	ND	ND	ND
3#	DDS T	37	Т	Т	Ambigua		Ausente	ND	ND	ND
4 (F1)	DDS T	1m	Т	Т	Ambígua	-	Ausente	Ausente	Bilateral	Bilateral
5	DDS T	5	Т	Т	Masculina	-	Ausente	Ausente	Bilateral	Bilateral
6	DDS OT	3	Т	0	Ambígua	-	Presente	Presente	ND	ND
7#	DDS OT	38	ОТ	ОТ	Ambígua	-	Presente	ND	ND	ND
8	DDS OT	2	ОТ	ОТ	Ambígua	+	Ausente	ND	ND	ND
9	DDS OT	6	0	ОТ	Ambígua	+	Presente	Esquerdo	Esquerdo	Esquerdo
10	DDS OT	19	ОТ	ОТ	Ambígua	+	Presente	Bilateral	Bilateral	ND
11#	DDS OT	26	ОТ	ОТ	Ambígua	+	Presente	Bilateral	Ausente	Ausente
12#	DDS OT	20	ОТ	ОТ	Ambígua	-	Ausente	Esquerdo	Bilateral	Ausente
13#	DDS OT	39	ОТ	ОТ	Ambígua	-	Presente	ND	ND	ND

Métodos

Tabela 4 (conclusão). Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes 46,XX com DDS ovotesticular e testicular

	Tecido Gonadal						Derivados	de Muller	Derivados de Wolff	
Paciente	Diagnóstico	Idade (anos)*	Direito	Esquerdo	Genitália externa	Seio UG	Útero	Trompas	Epidídimo	Vaso deferente
14	DDS OT	3	ОТ	Т	Ambígua	+	Ausente	Direito	Direito	Direito
15#	DDS OT	11	ОТ	0	Ambígua	+	Presente	ND	Direito	ND
16#	DDS OT	12	ОТ	0	Ambígua	+	Presente	ND	Direito	ND
17	DDS OT	16	ОТ	ОТ	Ambígua	+	Ausente	ND	ND	ND
18 (F1)	DDS OT	1m	Т	ОТ	Ambígua	+	Presente	Esquerdo	Bilateral	ND
19	DDS OT	1m	Т	ОТ	Ambígua	-	Ausente	Esquerdo	ND	ND
20	DDS OT	1m	ОТ	0	Ambígua	+	Presente	Bilateral	ND	ND
21	DDS OT	4	Т	0	Ambígua	+	Presente	Esquerdo	Bilateral	ND

O- ovário; OT- ovotestes; T-testículo; UG: urogenital; ND-não disponível. I Cr* idade cronológica da primeira avaliação, # manipulação cirúrgica prévia.

3.2 Pesquisa de Mutações

3.2.1 Extração de DNA a partir de sangue periférico

Foram colhidos 15 mL de sangue venoso ácido etileno em diaminotetracético (EDTA pH8). Obteve-se o botão leucocitário a partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando-se a solução de lise (114 mM de NH₄Cl, 1 mM de NH₄HCO₃) com incubação a 4°C por 30 minutos. Centrifugou-se o material a 4°C por 15 minutos a 3000 rpm desprezandose o sobrenadante, estes procedimentos foram repetidos por 2 vezes. O botão de células foi então suspenso em solução tampão PK (100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH8, 1 mM de EDTA pH8) com 1/10 do volume de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) e 100 μg/mL de sangue de proteinase K e mantido a 37°C por uma noite. No dia seguinte o material foi submetido à extração com fenol saturado (pH 7,8): clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) duas vezes e uma vez com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). No processo de extração, após centrifugação a 4°C por 5 minutos a 2500 rpm, o sobrenadante foi utilizado na fase seguinte. O DNA foi então precipitado com 1/10 de volume de acetato de sódio (3M pH7) e 2 volumes de etanol absoluto gelado. O DNA obtido foi lavado 2 vezes com etanol 70% gelado e uma vez com etanol absoluto gelado sendo então "Speed Vac" (Integrated seco em Speed System/Savant, ISS 100) e ressuspenso em 500 a 1000 mL de solução de TE 10:0,1 (10 mM de Tris-HCI pH8, 0,1 mM de EDTA pH8). A concentração do DNA foi medida em espectrofotômetro (Ultrospec III - Pharmacia Biotech) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A relação 260/280 igual a 1,8 foi utilizada para caracterizar a pureza do material. As amostras ficaram armazenadas a 4°C até sua utilização.

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

As amostras de DNA genômico obtidas foram utilizadas na análise mutacional dos genes *STRA8* (de todos os pacientes DDS 46,XX), *NANOS3 e BMP15* (pacientes com amenorréia primária e amenorréia secundária), através de amplificação por PCR e seqüenciamento direto, utilizando-se pares de oligonucleotídeos específicos localizados em regiões intrônicas dos respectivos genes (Tabelas 5,6,7).

Tabela 5. Seqüências dos oligonucleotídeos específicos para amplificação dos exons do *NANOS3*

Exon	Oligonucleotídeos
1	5' CTG CTC CCT CTT CAC AC 3' 5' GTC TTC CCC TAA CCC TTG GA3`
2	5' GTC ACG GGG TCG CTG TCT 3' 5' AGT GGG GGC AGT CGT CAT AG3'

Tabela 6. Seqüências dos oligonucleotídeos específicos para amplificação dos exons do *BMP15*

Exon	Oligonucleotídeos
1	5' AGT GAC GTC CCT TGG GCT TG 3' 5' ACA AAC CTG ACA GTA AAC CC 3'
2.1	5' CTA TCA GTC TAT ATC AAG ACA G 3' 5' GCT CAA GAC CAC CAC TAT CT 3'
2.2	5' GGT TCT GGA ATA ACA AGG GAC 3' 5' CCA CCA ACT GAT TGA TAA GG 3'
2.3	5' ACT GTA AAG GAA CTT GTC TCC 3' 5' AAC CTA CAG ATT GGT ACA GGA T 3'

Tabela 7. Seqüências dos oligonucleotídeos específicos para amplificação dos exons e da região promotora do *STRA8*

	Oligonucleotídeos
Exon 1	STRA8 1-f 5'- TGTGGGTGTTACCAGGGATA -3' STRA8 1-r 5'- CCAACCACTGCCACACAC -3'
Exon 2	STRA8 2-f 5'- AATTTGGGGCCTTTACTTGG -3' STRA8 2-r 5'- AGTCCCTCCACCTGTGAAAA -3'
Exon 3	STRA8 3-f 5'- AGCCCTGGGAAGGGATTC -3' STRA8 3 -r 5'- TTGTAACCCAACTTCTGTTTTCA -3'
Exon 4	STRA8 4-f 5'- CCCTAATGCTGACCCTGGAG -3' STRA8 4r 5'- TGGAGAGGAAGGGTGAGTTG -3'
Exon 5	STRA8 5-f 5'- AAGCTCATTTGGTCATGATGTG -3' STRA8 5-r 5'- CCTTCCTGACTGCCTCAGTT -3'
Exon 6	STRA8 6-f 5'- GAGAAGTCTCAGCCCTGGTG -3' STRA8 6-r 5'- AAATGCAAAGCCCTGGTGT -3'
Exon 7	STRA8 7-f 5'- AAAGAGAGAGCCTTTCCACTCA-3' STRA8 7-r 5' ATACACACCTGCGCACACAC -3'
Exon 8	STRA8 8-f 5'- GAATTTACATGTGCTTGGTTCA -3' STRA8 8-r 5'-TGCCCTTAAGAGCCCTTTTT -3'
Exon 9	STRA8 9-f 5'- GAGATGCAGGAGCCTTCCTA -3' STRA8 9-r 5'- CAACCTTAGCTGCCAGCATT -3'
Promotor	Strapro-f 5'- TGG ATG GAC ACT AAC AAG GAG A - 3' Strapro-r 5'- CTG CCA CAG CCT GAT TTC TT - 3'

As reações foram realizadas em um volume final de 50 μL utilizando-se 100-200 ng de DNA genômico, 200 μmol de dNTPs, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, 5 μL tampão de PCR 1x e 1,25 U de enzima *Taq polimerase*, as padronizações detalhadas para cada gene e seus respectivos exons estão descritas nas tabelas 8, 9 e 10 seguidas de seus respectivos programas de amplificação. A amplificação foi realizada em um aparelho GeneAmp PCR System 2400 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta.

As reações de amplificação para o gene *NANOS3* foram então padronizadas segundo o protocolo descrito na Tabela 8:

Tabela 8. Protocolo das reações de polimerização em cadeia (PCR) para o *NANOS3*

Exon	H2O (μl)	Tampão (µl)	Dntp (mM)	Primer foward (pmol)	Primer reverse (pmol)	Taq polimerase (U)
1	18,75	2,5	1,5	5	5	2,5
2	18,75	2,5	1,5	5	5	2,5

Os programas de amplificação para os 2 exons do gene *NANOS3* foram realizados de acordo com o seguinte protocolo:

Exon 1: tamanho do amplificado (960 pb): (94°C 5 min) x1+(94°C 30s; 58°C 30s; 72°C 45s)x35 +(72°C 10 min)x1

Exon 2: tamanho do amplificado (540 pb): $(94^{\circ}C 5 \text{ min}) \times 1 + (94^{\circ}C 30s; 57^{\circ}C 30s; 72^{\circ}C 45s) \times 35 + (72^{\circ}C 10 \text{ min}) \times 1$

As reações padronizadas para a amplificação dos exons que compõem o gene *BMP15* estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9. Protocolo das reações de polimerização em cadeia (PCR) para o *BMP15*

Exon	H2O (μΙ)	Tampão (µl)	Dntp (mM)	foward	Primer reverse (pmol)	<i>Taq</i> polimerase (U)	Formamida (µl)
1	18,125	2,5	1,5	10	10	2,5	0,625
2.1	18,75	2,5	1,5	10	10	2,5	-
2.2	18,75	2,5	1,5	10	10	2,5	-
2.3	18,75	2,5	1,5	5	5	2,5	-

Os programas de amplificação para os exons do gene *BMP15* foram realizados de acordo com o seguinte protocolo:

Exon 1: tamanho do amplificado=550 pb: (94°C 5 min) x1 + (94°C 30s; 55°C 30s; 72°C 45s) x35 + (72°C 10 min)x1

Exon 2.1: tamanho do amplificado=400 pb: (94°C 5 min) x1+(94°C 30s; 55°C 30s; 72°C 45s) x35 +(72°C 10 min)x1

Exon 2.2: tamanho do amplificado =450 pb: $(94^{\circ}\text{C 5 min}) \times 1 + (94^{\circ}\text{C 30s}; 55^{\circ}\text{C 30s}; 72^{\circ}\text{C 45s}) \times 35 + (72^{\circ}\text{C 10 min}) \times 1$

Exon 2.3: tamanho do amplificado =250 pb: $(94^{\circ}\text{C 5 min}) \times 1 + (94^{\circ}\text{C 30s}; 56^{\circ}\text{C 30s}; 72^{\circ}\text{C 1 min}) \times 35 + (72^{\circ}\text{C 10 min}) \times 1$

Para as amplificações dos exons 3, 4, 5, 7, 8, 9 do *STRA8* utilizamos alguns produtos denaturantes (DMSO e formamida) comumente utilizados para otimizar reações de amplificação em cadeia (Tabela 10). Os fragmentos amplificados foram posteriormente visualizados em gel de agarose 1%.

Tabela 10. Protocolo das reações de polimerização em cadeia (PCR) para o *STRA8*

EXON	H2O (µl)	Tampão (µl)	Dntp (mM)	Primer foward (pmol)	Primer reverse (pmol)	Taq polimerase (U)	MgCl ₂ (mM)	Fomamid (µl)	DMS O(µI)
1	18,75	2,5	1,5	5	5	2,5	1,5	-	-
2	18,75	2,5	1,5	5	5	2,5	1,5	-	-
3	15,25	2,5	1,5	10	10	2,5	4	-	1,25
4	15,75	2,5	1,5	10	10	2,5	3	-	1,25
5	17,125	2,5	1,5	10	10	2,5	1,5	0,625	-
6	18,75	2,5	1,5	5	5	2,5	1,5	-	-
7	15,75	2,5	1,5	10	10	2,5	1,5	2,0	-
8	15,25	2,5	1,5	10	10	2,5	1,5	-	1,25
9	15,25	2,5	1,5	10	10	2,5	1,5	0,625	-
Promotor	15,25	2,5	1,5	10	10	2,5	1,5	-	-

Os programas de amplificação do gene *STRA8* foram realizados de acordo com o seguinte protocolo:

Exon 1: tamanho do amplificado = 240 pb: $(95^{\circ}\text{C 5 min}) \times 1 + (95^{\circ}\text{C 30s}; 54^{\circ}\text{C 30s}; 72^{\circ}\text{C 45s}) \times 35 + (72^{\circ}\text{C 10 min}) \times 1$

Exon 2: tamanho do amplificado = 391 pb: $(95^{\circ}\text{C 5 min}) \times 1 + (95^{\circ}\text{C 30s}; 54^{\circ}\text{C 30s}; 72^{\circ}\text{C 45s}) \times 35 + (72^{\circ}\text{C 10 min}) \times 1$

Exon 3: tamanho do amplificado = 248 pb: $(94^{\circ}\text{C 5 min}) \times 1 + (94^{\circ}\text{C 30s}; 55^{\circ}\text{C 30s}; 72^{\circ}\text{C 45s}) \times 35 + (72^{\circ}\text{C 10 min}) \times 1$

Exon 4: tamanho do amplificado = 299 pb: $(94^{\circ}C 5 \text{ min}) \times 1 + (94^{\circ}C 30s; 55^{\circ}C 30s; 72^{\circ}C 45s) \times 35 + (72^{\circ}C 10 \text{ min}) \times 1$

Exon 5: tamanho do amplificado = 242 pb: $(94^{\circ}\text{C 5 min}) \times 1 + (94^{\circ}\text{C 30s}; 57^{\circ}\text{C 30s}; 72^{\circ}\text{C 45s}) \times 35 + (72^{\circ}\text{C 10 min}) \times 1$

Exon 6: tamanho do amplificado = 594 pb: $(98^{\circ}\text{C 5 min}) \times 1 + (98^{\circ}\text{C 40s}; 54^{\circ}\text{C 30s}; 72^{\circ}\text{C 1 min}) \times 35 + (72^{\circ}\text{C 10 min}) \times 1$

Exon 7: tamanho do amplificado = 247 pb: $(94^{\circ}\text{C 5 min}) \times 1 + (94^{\circ}\text{C 30s}; 58^{\circ}\text{C 30s}; 72^{\circ}\text{C 45s}) \times 35 + (72^{\circ}\text{C 10 min}) \times 1$

Exon 8: tamanho do amplificado = 298 pb: $(94^{\circ}\text{C 5 min}) \times 1 + (94^{\circ}\text{C 30s}; 58^{\circ}\text{C 30s}; 72^{\circ}\text{C 45s}) \times 35 + (72^{\circ}\text{C 10 min}) \times 1$

Exon 9: tamanho do amplificado = 233 pb: $(94^{\circ}\text{C 5 min}) \times 1 + (94^{\circ}\text{C 30s};$ 55°C 30s; 72°C 45s)×35 + $(72^{\circ}\text{C 10 min})\times 1$

Promotor: tamanho do amplificado = 600 pb: $(94^{\circ}\text{C 5 min}) \times 1 + (94^{\circ}\text{C 30s}; 55^{\circ}\text{C 30s}; 72^{\circ}\text{C 45s}) \times 35 + (72^{\circ}\text{C 10 min}) \times 1$

3.2.3 Pesquisa da variante p.Q115X no grupo controle

A troca nucleotídica C>T que leva a mutação p.Q115X promove a perda de um sítio enzimático (ctggcatata C>TAG_ATCCTG ggctttcctc) para a enzima *AlwN*I (*New England BioLabs*). Sendo assim, o DNA genômico de 100 mulheres controles foi amplificado segundo o protocolo de amplificação do exon 2.1 (Tabela 9) utilizando os oligonucleotídeos

específicos para o início do exon 2 do gene *BMP15* (Tabela 6) e este fragmento foi então submetido a digestão enzimática com a enzima *AlwN*I. As reações foram realizadas segundo o protocolo recomendado pelo fabricante.

3.2.4 Sequenciamento automático

Após a amplificação os produtos foram purificados com a enzima EXO-SAP (Amersham Science, USB, Cleveland, Ohio, EUA) seguido da reação de sequenciamento utilizando o kit comercial ABI Prism TM Big Dye terminator Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) as reações foram submetidas ao sequenciamento em um aparelho ABI Prism Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

4 Resultados

4.1 Pesquisa de mutações no NANOS3

Dois polimorfismos previamente descritos foram identificados no *NANOS3*. O primeiro polimorfismo (rs897790), foi identificado na região 5′ não traduzida e resultou na troca de uma citosina por uma timina na posição -23 (5′UTR -23C>T). Esse polimorfismo foi identificado em 17 pacientes com amenorréia (15 pacientes em heterozigose e em duas pacientes em homozigose) e em 18 pacientes com amenorréia secundária (em 12 em heterozigose e em 6 em homozigose). Já o segundo polimorfismo (rs2016163) foi identificado do exon 1 e resultou na troca de uma adenina por uma guanina na posição 294 (c.294A>G). Esse polimorfismo foi identificado em 17 pacientes com amenorréia primária (15 pacientes em heterozigose e em duas em homozigose) e em 4 pacientes com amenorréia secundária.

Identificamos a troca de uma guanina na posição 358 por uma adenina em homozigose no exon 1 do gene *NANOS3* (c.358G>A). Essa troca nucleotídica resultou na variante p.E120K. Essa variante foi identificada em homozigose em duas irmãs, pacientes 39 e 40, F9 (Tabela 2), portadoras de DDS 46,XX por disgenesia gonadal (Figura 7).

Nenhuma das 100 mulheres do grupo controle apresentou a alteração, confirmando não se tratar de um polimorfismo.

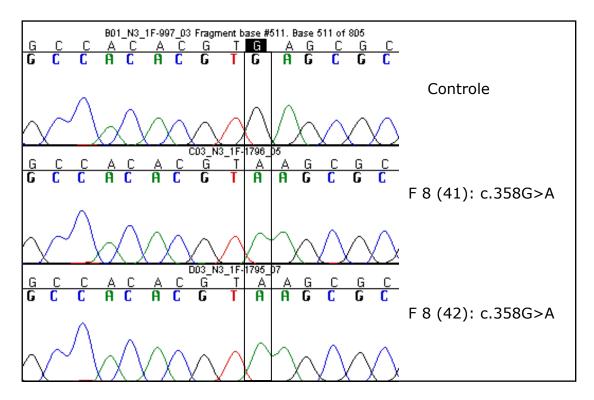


Figura 7. Eletroferograma mostrando a substituição da guanina 358 por uma adenina em homozigose no exon 1 do gene *NANOS3* (c.358G>A) em comparação com uma seqüência controle

A troca nucleotídica promoveu a mudança do aminoácido ácido glutâmico por uma lisina. Essa mutação está localizada na posição 120 da proteína na região onde está localizado o domínio de ligação ao RNA do tipo dedo de zinco da proteína NANOS3 (Figura 8).

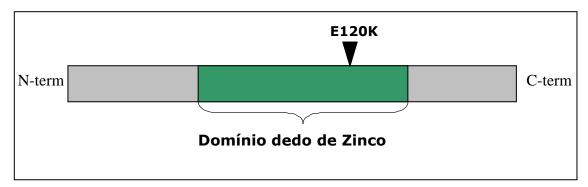


Figura 8. Localização da mutação p.E120K na proteína NANOS3 de 192 aa. A mutação está localizada no domínio do dedo de zinco de ligação ao RNA

4.2 Pesquisa de mutações no BMP15

Identificamos a troca de uma citosina por uma timina na posição 392 do exon 1 que resultou em um códon de parada prematuro na proteína. Essa nova mutação *nonsense* (p.Q115X) em homozigose foi identificada em duas irmãs (pacientes 8 e 9, Tabela 2), portadoras de DDS 46,XX por disgenesia gonadal (Figura 9) e em heterozigose em um caso esporádico (paciente 26) com amenorréia secundária.

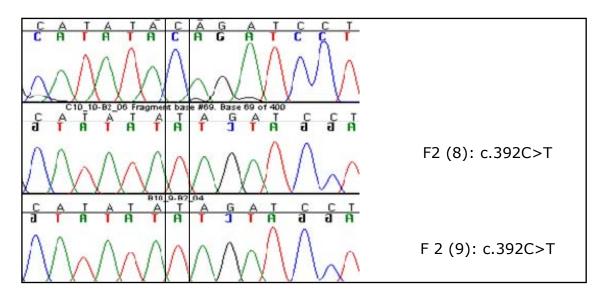


Figura 9. Eletroferograma mostrando a mostrando a substituição da citosina 392 por uma timina em homozigose no exon 1 do gene *BMP15* (c.392C>T)

Nenhuma das 100 mulheres do grupo controle, analisadas através da digestão enzimática com a enzima *AlwN*I, apresentou a alteração, confirmando não se tratar de um polimorfismo.

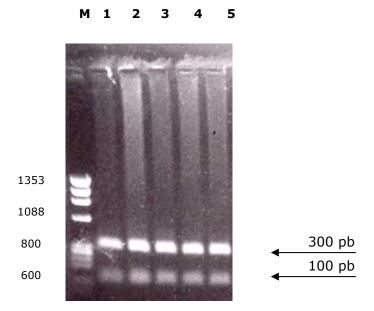


Figura 10. Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR de controles digeridos com a enzima *AlwN*I. **M:** marcador de peso molecular φX; **1,2,3,4 e 5:** produtos de PCR correspondente ao exon 2 (400 pb) do gene *BMP15* gerando 2 fragmentos de 100pb e 300 pb. A digestão enzimática se dá nos casos controles onde a seqüência não sofreu a troca nucleotídica C>T.

A mutação p.Q115X (Figura 11) foi investigada na família (Figura 12).

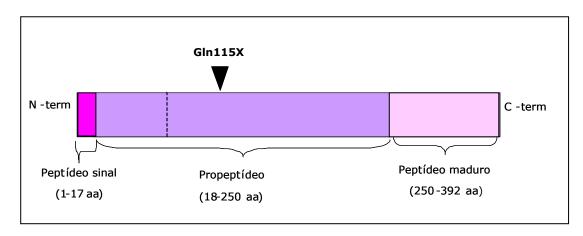


Figura 11. Localização da mutação p.Q115X na proteína BMP15. A mutação nessa posição gera um códon de parada prematuro na região do propeptídeo, o que impede a tradução da porção ativa do peptídeo (peptídeo maduro) localizada na porção C-terminal

Os pais são consangüíneos (primos de primeiro grau) sendo que o pai é carreador da mutação p.Q115X em hemizigose e a mãe é heterozigota. Das 3 filhas do casal, uma é heterozigota para a mutação e como a mãe não apresenta o fenótipo, enquanto que as 2 irmãs afetadas apresentam a mutação p.Q115X em homozigose.

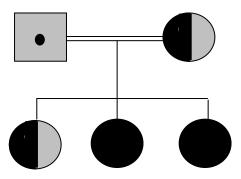


Figura 12. Heredograma mostrando segregação mutação p.Q115X na família

Outras três variantes previamente descritas, p.S5R, p.N103S (rs41308602) e p.L262_L263insL foram identificadas, tanto em pacientes com amenorréia primária quanto secundária (DG 46,XX). A variante p.S5R no exon 1, foi identificada pela troca de uma adenina por uma citosina na posição 13 do cDNA (c.13A>C) em heterozigose em duas irmãs com amenorréia primária (F9) e em caso esporádico de amenorréia secundária (paciente 41) (Figura 13).

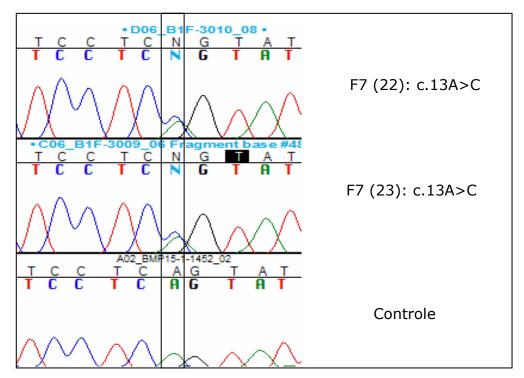


Figura 13. Eletroferograma mostrando a substituição de uma adenina por uma citosina em heterozigose no exon 1 do gene *BMP15* (c.13A>C)

A variante p.N103S também no exon 1, foi identificada pela troca de uma adenina por uma guanina na posição 308 do cDNA (c.308A>G) em heterozigose em 2 casos de amenorréia secundária (23 e 32) e um caso de amenorréia primária (Figura 14).

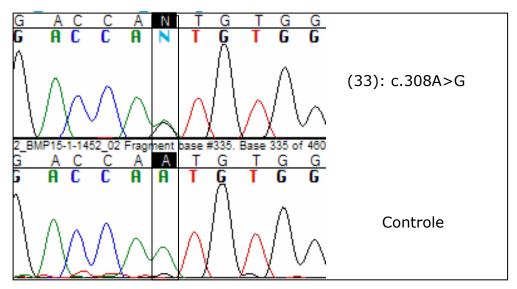


Figura 14. Eletroferograma mostrando a substituição de uma adenina por uma guanina em heterozigose no exon 1 do gene *BMP15* (c.308A>G)

A variante p.L262_L263insL, resultado da insersão de um códon TCT na posição 788 do cDNA (c.788insTCT) foi identificada em heterozigose em 7 pacientes com amenorréia primária e 10 pacientes com amenorréia secundária. Em 2 irmãs (pacientes 3 e 4, Tabela 2), os pais eram consangüíneos. Esta mesma alteração foi identificada em 5 dos 100 controles pesquisados.

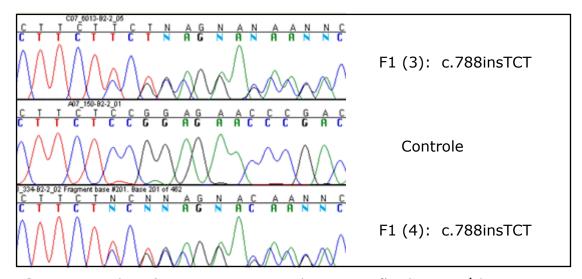


Figura 15. Eletroferograma mostrando a inserção de um códon TCT em heterozigose no exon 2 do gene *BMP15* (c.788insTCT)

4.3 Pesquisa de mutações no STRA8

Foi identificado um único polimorfismo previamente descrito na literatura (rs7805859) no exon 2 do gene *STRA8* na posição 201 do transcrito onde há uma troca de um G por um A (c.201G>A). Essa variante resulta em uma troca sinônima (alanina>alanina). Esse polimorfismo foi identificado em heterozigose em 7 pacientes com DDS 46,XX por disgenesia gonadal e em 8 pacientes DDS ovotesticular e testicular. Em 10 pacientes DDS 46,XX por disgenesia gonadal e em 6 pacientes DDS ovotesticular e testicular o mesmo polimorfismo foi identificado em homozigose. Nenhuma alteração foi identificada na região promotora proximal pesquisada.

Os distúrbios do desenvolvimento gonadal 46,XX (DDG) são condições relacionadas a anormalidades no desenvolvimento ovariano. Apesar dos recentes estudos terem ampliado o conhecimento a respeito dos distúrbios do desenvolvimento gonadal em humanos, as causas genéticas deste grupo complexo de doenças permanecem desconhecidas na grande maioria dos casos (Ledig *et al*, 2008). Mutações nos genes *SF1*; *WNT4*, *RSPO1 e FOXL2* foram raramente associadas a casos de distúrbios do desenvolvimento gonadal 46,XX sindrômico ou isolado. Entre as causas conhecidas de diferenciação de tecido testicular em pacientes 46,XX podemos destacar: 1) a translocação do *SRY* durante a meiose paterna em pacientes com DDS 46,XX ovotesticular e testicular (Fechner *et al*, 1993; Krob *et al*, 1994); 2)- a dosagem dupla do *SOX9* no DDS 46,XX testicular (Huang *et al*, 1999).

Considerando a raridade de defeitos dos genes acima referidos procuramos mutações em outros genes participantes da cascata de migração, diferenciação e manutenção das células germinativas ovarianas, uma vez que na ausência delas o ovário não se mantém.

Escolhemos dentro da cascata de determinação ovariana o *NANOS3* por sua participação da manutenção das células germinativas durante a migração até a gônada primitiva, *o STRA8* por sua ação na diferenciação das células germinativas induzindo a meiose e o *BMP15* por sua ação na manutenção de um ambiente somático adequado à sobrevivência dos oócitos.

5.1 Gene NANOS3

As proteínas NANOS3 são responsáveis pela inibição do apoptose das células germinativas que migram para o ducto gonadal no início do desenvolvimento. A ausência do equilíbrio entre a morte celular promovida por genes apoptóticos e a sua sobrevivência controlada pelo *NANOS3* durante o processo migratório pode causar a morte das células germinativas. De fato camundongos nocaute para o gene *NANOS3* não possuem células germinativas (Tsuda *et al*, 2003). Segundo a hipótese desse trabalho as células germinativas são essenciais para o desenvolvimento ovariano. O *NANOS3*, portanto é um candidato importante para pesquisas de mutações em pacientes com insuficiência ovariana. Apesar de sua importância, o estudo de mutações no gene *NANOS3* realizado por outro grupo em 176 mulheres com falência ovariana não identificou nenhuma mutação (Qin *et al*, 2003).

Identificamos em nossa casuística de 45 mulheres com amenorréia primária a mutação p.E120K, localizada no domínio de ligação ao RNA tipo dedo de zinco da proteína NANOS3. Esta nova mutação *missense* (p.E120K) foi identificada em homozigose em duas irmãs portadoras de DDS 46,XX por disgenesia gonadal.

Podemos especular que a capacidade de ligação da proteína esteja prejudicada, resultando em aumento da expressão de genes apoptóticos e conseqüentemente a morte das células germinativas causando o fenótipo de DDS 46,XX por disgenesia gonadal.

A identificação desta mutação no *NANOS3*, abre um novo caminho de investigação de proteínas anti-apoptóticas na etiologia da disgenesia gonadal 46,XX.

5.2 Gene *BMP15*

O *BMP15*, membro da família dos TGF-β, é expresso pelas células germinativas durante a foliculogênese e atua por efeito parácrino na proliferação das células da granulosa, as quais por sua vez asseguram a sobrevivência dos oócitos. (Di Pasquale *et al*, 2004).

Até o momento foram descritas 5 mutações em heterozigose no *BMP15* por 5 grupos distintos (Di Pasquale *et al*, 2004, Laissue *et al*, 2006; Dixit *et al*, 2006; Rossetti *et al*, 2008). Os estudos funcionais de mutações *missense* demonstraram que as mutações no *BMP15* apresentam um efeito dominante negativo (Di Pasquale *et al*, 2004, Rossetti *et al*, 2008). Há apenas uma mutação *nonsense* descrita neste gene, porém o estudo funcional não foi realizado (Dixit *et al*, 2006).

Em nosso estudo, identificamos uma nova mutação *nonsense* (p.Q115X) em homozigose em duas irmãs com amenorréia primária, filhas de casamento consangüíneo. Nesta família não observamos o efeito dominante negativo descrito anteriormente (Di Napoli *et al*, 2006; Rossetti *et al*, 2008), uma vez que a mãe e uma irmã, ambas heterozigotas para a mutação, apresentavam função ovariana normal. Este fato sugere que provavelmente o códon de parada prematuro

impeça a formação de uma proteína anômala que causaria o efeito dominante negativo sobre o alelo normal.

Identificamos também a variante p. L262_L263insL causada pela inserção de uma leucina na posição 262 do peptídeo (c.INS262Leu) em pacientes e também em 5 controles corroborando com os dados da literatura de se tratar de um polimorfismo (Laissue *et al*, 2006). No entanto, um estudo de freqüência havia demonstrado maior prevalência desta variante em pacientes com amenorréia primária ou secundária (Dixit *et al*, 2006). Entretanto o efeito deletério desta variante foi definitivamente afastado pelo encontro desta variante em mulheres com menopausa fisiológica (Morón *et al*, 2007) e pelo estudo recente in *silico* e *in vitro* afastando o efeito patogênico da variante sobre a bioatividade do peptídeo (Rossetti *et al*, 2008).

A variante p.S5R foi identificada em dois casos de amenorréia primária familial e em uma paciente com amenorréia secundária. Estudo *in silico* prévio definiu esta variante como benigna apesar de alterar a estrutura secundária da proteína. O estudo *in vitro* demonstrou que a atividade biológica da variante só foi significativamente reduzida nos experimentos com a proteína p.S5R em estado de homozigose; nos experimentos onde foram testadas a proteína selvagem e a mutante a atividade biológica não foi afetada (Rossetti *et al*, 2008). No entanto as pacientes 22, 23 (amenorréia primária familial) e paciente 43 (amenorréia secundária) apresentam a variante p.S5R e a variante p. L262_L263insL, ambas em heterozigose. Desta forma há a possibilidade de que as duas variantes juntas possam causar algum efeito na

bioatividade da proteína. Estudos *in vitro* adicionais serão necessários para confirmar essa hipótese.

A variante c.308A>G (p.N103S) foi identificada em duas pacientes com amenorréia secundária (23 e 32) e em uma paciente com amenorréia primária (33). Esta variante já havia sido previamente identificada em controles normais em outro estudo (Dixit *et al*, 2006).

Uma análise de haplótipos foi realizada para verificar se variantes freqüentes no gene em combinação teriam um efeito cumulativo associado significativamente com o fenótipo de pacientes com falência ovariana. Foram utilizadas três variantes (c.-9C>G; c.308A>G) e c. 852C>T) gerando o haplótipo G-G-C o qual se associou positivamente ao fenótipo de amenorréia primária e secundária (Dixit *et al*, 2006).

Nosso achado confirma a importância do *BMP15* na manutenção dos oócitos.

5.3 Gene *STRA8*

O STRA8 é um fator de transcrição induzido por ácido retinóico que induz a meiose nas células germinativas do ovário embrionário (Suzuki *et al*, 2008; Koubowa *et al*, 2006). No estudo atual, investigamos a presença de mutações nas regiões promotora proximal e codificadora do *STRA8* em pacientes portadores de DDS 46,XX.

Nossa hipótese era de que mutações inativadoras no *STRA8* poderiam impedir a meiose das células germinativas. Isso conseqüentemente

afetaria a diferenciação das células somáticas podendo impedir o desenvolvimento ovariano adequado. Estudos de Yao e Capel utilizando co-cultura de gônadas XX e XY de camundongos as células germinativas meióticas da gônada XX produziram um efeito inibitório na formação dos cordões testiculares e na expressão de marcadores masculinos das células adjacentes na gônada XY, reforçando o papel antagônico das células germinativas meióticas na via de diferenciação testicular (Yao e Capel, 2003). Além disso, a perda de oócitos nos primeiros estágios do desenvolvimento ovariano pode permitir o desenvolvimento testicular, uma vez que, a sobrevivência dos oócitos garante a diferenciação das células da granulosa e a organogênese ovariana (Taketo et al, 1993). Nesta fase, a ausência de diferenciação das células da granulosa pode acarretar a conversão das células precursoras somáticas em células de Sertoli, resultando na formação de cordões testiculares sem células germinativas (McLaren, 2000; Hashimoto et al, 1990). O início da meiose, desencadeada em uma onda antero-posterior na gônada XX, portanto, se consolida como uma etapa imprescindível na formação do ovário e é provável que atrasos ou ausência nesta sinalização meiótica propicie o espectro de fenótipos observados nos DDS 46,XX.

Duas evidências importantes sustentam essa hipótese, uma clínica e outra molecular. O fato dos distúrbios do desenvolvimento gonadal 46,XX testicular e ovotesticular coexistirem na mesma família reforça o fato de que estas manifestações fenotípicas são apresentações alternativas do mesmo efeito genético (Maciel-Guerra *et al*, 2008). Estudos utilizando animais que não expressam genes envolvidos com a

progressão meiótica das células germinativas por sua vez, estão implicados com um espectro de fenótipos que variam de redução da fertilidade a perda de embriões (provavelmente por aneuploidias) e de infertilidade a disgenesia gonadal (Moreli *et al*, 2005).

Apesar dessas evidências, identificamos um único polimorfismo (rs7805859) previamente descrito na literatura (fonte do banco de dados Ensembl). O polimorfismo resulta em uma troca sinônima sem efeito patogênico e foi identificada tanto em heterozigose quanto em homozigose em pacientes portadores de DDS 46,XX por disgenesia gonadal, ovotesticular e testicular.

Nenhuma mutação no *STRA8* foi identificada nesta coorte de pacientes. Tendo em vista a relevância desta via no desenvolvimento ovariano e seu padrão de expressão temporal e espacial específico, é importante reforçar que não foram descartadas mutações intrônicas ou em regiões regulatórias distais a montante do promotor proximal. Um recente estudo mostra que a região promotora proximal do gene *STRA8* é suficiente para induzir meiose em testículos de camundongos adultos, porém não é suficiente para induzir a meiose em oócitos, reforçando a idéia de que regiões promotoras distais possam estar envolvidas na modulação de expressão do *STRA8* em ovários (Sadate-Ngatchou *et al*, 2008).



- Descrevemos a primeira mutação no gene NANOS3 associada ao fenótipo de disgenesia gonadal 46,XX em um caso familiar
- Descrevemos uma nova mutação nonsense no BMP15, associada com o fenótipo de disgenesia gonadal 46,XX em um caso familiar e um esporádico
- Mutações no gene STRA8 não foram associadas aos distúrbios do desenvolvimento gonadal 46,XX
- Mutações em genes envolvidos na diferenciação e manutenção das células germinativas ovarianas foram raramente identificadas nesta coorte de pacientes com distúrbios do desenvolvimento sexual 46,XX.

7 REFERÊNCIAS

Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex-reversal and adrenal failure in humans. Nat Genet 1999; 22:125–126.

Asaoka M, Sano H, Obara Y. and Kobayashi S. Maternal Nanos regulates zygotic gene expression in germline progenitors of Drosophila melanogaster. *Mech Dev* 1998; 78, 153-158.

Baltus AE, Menke DB, Hu, YC, Goodheart ML, Carpenter AE, de Rooij G, and Page DC. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet* 2006; 38: 1430–1434.

Barbaro M, Oscarson M, Schoumans J, Staaf J, Ivarsson SA, Wedell A. Isolated 46,XY gonadal dysgenesis in two sisters caused by a Xp21.2 interstitial duplication containing the *DAX1* gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 92 (8):3305-13.

Bassett JH, O'Halloran DJ, Williams GR, Beardwell CG, Shalet SM, Thakker RV. Novel *DAX1* mutations in X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotrophic hypogonadism. *Clin Endocrinol* (Oxf) 1999; 50 (1):69-75.

Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, Palmiter RD, Brinster RL. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing müllerian inhibiting substance. *Nature* 1990; 345(6271):167-70.

Besmer P, Manova K, Duttlinger R, Huang EJ, Packer A, Gyssler C, Bachvarova RF. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl* 1993; 125-37.

Biason-Lauber A, KoNDad D, Navratil F, Schoenle EJ. A *WNT4* mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med* 2004; 351(8):792-8.

Biason-Lauber A, De Filippo G, KoNDad D, Scarano G, Nazzaro A, Schoenle EJ. WNT4 deficiency - a clinical phenotype distinct from the classic Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a case report. *Hum Reprod* 2007; 22(1):224-9.

Boucekkine C, Toublanc JE, Abbas N, Chaabouni S, Ouahid S, Semrouni M, Jaubert F, Toublanc M, McElreavey K, Vilain E, et al. Clinical and anatomical spectrum in XX sex reversed patients. Relationship to the presence of Y specific DNA-sequences. *Clin Endocrinol* (Oxf) 1994; 40 (6):733-42.

Bouillet P, Oulad-Abdelghani M, Vicaire S, Garnier JM, Schuhbaur B, Dollé P, Chambon P. Efficient cloning of cDNAs of retinoic acid-responsive genes in P19 embryonal carcinoma cells and characterization of a novel mouse gene, *Stra1* (mouse LERK-2/Eplg2). *Dev Biol* 1995; 170(2):420-33.

Capel B. R-spondin1 tips the balance in sex determination. *Nat Genet*. 2006; 38, 1233-34.

Carabatsos MJ, Elvin JA, Matzuk MM, Albertini DF. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev Biol* 1998; 203:373–384.

Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J Review*.1996; 10(9):940-54.

Chassot A.A. et al. Activation of β -catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet* 2008; 17, 1264-77.

Correa RV, Domenice S, Bingham NC, Billerbeck AE, Rainey WE, Parker KL, Mendonca BB. A microdeletion in the ligand binding domain of steroidogenic factor 1 causing XY sex reversal without adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 89:1767-72.

Crisponi L., M. Deiana A; Loi et al. The putative forkhead transcription factor *FOXL2* is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 2001; 27: 159–166.

Damiani D, Guedes DR, Damiani D, Setian N, Maciel-Guerra AT, Mello MP, Guerra-Júnior G. True hermaphroditism: experience with 36 patients .*Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005; 49 (1): 71-8.

De Baere, EMJ. Dixon, KW Small, et al. Spectrum of *FOXL2* gene mutations in blepharophimosisptosis- epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype-phenotype correlation. *Hum Mol Genet* 2001;10: 1591–1600.

de la Chapelle A. The etiology of maleness in XX men. *Hum Genet* 1981; 58 (1):105-16.

Dixit H, Rao LK, Padmalatha V, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakravarty B, Singh L. Mutational screening of the coding region of growth differentiation factor 9 gene in Indian women with ovarian failure. *Menopause* 2005; 12(6):749-54.

Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N Chakrabarty B, Singh L. Missense mutations in the *BMP15* gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet* 2006; 119: 408–415.

Di Pasquale E, Beck-Peccoz P & Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 2004; 75, 106–111.

Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383: 531–535.

Domenice S, Correa RV, Costa EM, Nishi MY, Vilain E, Arnhold IJ, Mendonca BB. Mutations in the *SRY*, *DAX1*, *SF1* and *WNT4* genes in Brazilian sex-reversed patients. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(1):145-50.

Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk MM Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor-9-deficient ovary. *Mol Endocrinol* 1999; 13:1018–1034.

Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. Oocyte-expressed TGF-b superfamily members in female fertility. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 159:1–5.

Fechner PY, Marcantonio SM, Jaswaney V, Stetten G, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith KD, Berkovitz GD, Amrhein JA, Bard PA, et al. The role of the sex-determining region Y gene in the etiology of 46,XX maleness. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76 (3):690-5.

Fujii T, Mitsunaga-Nakatsubo K, Saito I, Iida H, Sakamoto N, Akasaka K and Yamamoto T. Developmental expression of HpNanos, the Hemicentrotus pulcherrimus homologue of nanos. *Gene Expr Patterns* 2006; 6, 572- 577.

Giuili G, Tomljenovic A, Labrecque N, Oulad-Abdelghani M, Rassoulzadegan M, Cuzin F. Murine spermatogonial stem cells: targeted transgene expression and purification in an active state. *EMBO Rep* 2002; 3 (8):753-9.

Goodfellow PN, Camerino G. *DAX-1*, an 'antitestis' gene. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55 (6-7): 857–63.

Harris, SE, AL Chand, IM. Winship, et al. Identification of novel mutations in *FOXL2* associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 729–733.

Hasegawa T, Fukamu M, Sato N, Katsumata N, Sasaki G, Fukutani K, Morohashi KI, Ogata T. Testicular dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46,XY patient with a heterozygous inactive mutation of steroidogenic factor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:5930–5935.

Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van- Duin M, Hsueh AJW. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 1999; 140:1236–1244.

Heikkila M, Prunskaite R, Naillat F, Itaranta P, Vuoristo J, Leppaluoto J, Peltoketo H and Vainio S. The partial female to male sex reversal in *Wnt-4*-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. *Endocrinology* 2005; 146, 4016–4023.

Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN and Bartley J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of *SOX9*. *Am J Med Genet* 1999; 87,349–353. 24.

Ito M, Achermann JC, Jameson JL. A naturally occurring steroidogenic factor-1 mutation exhibits differential binding and activation of target genes. *J Biol Chem* 2000; 275:31708–31714

Iyer AK, McCabe ER. Molecular mechanisms of *DAX1* action". *Mol Genet Metab* 2004; 83 (1-2): 60–73. 40.

Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Délot E, Chen XN, Dewing P, Swain A, Rao PN, Elejalde BR, Vilain E. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* 2001; 68 (5):1102-9.

Kocer A, Reichmann J, Best D, Adams IR. Germ cell sex determination in mammals. *Mol Hum Reprod*. 2009; 15(4):205-13.

Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103 (8): 2474-9.

Koprunner M, Thisse C, Thisse B and Raz, E. A zebrafish nanosrelated gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev* 2001; 15, 2877-2885.

Krob G, Braun A, Kuhnle U. True hermaphroditism: geographical distribution, clinical findings, chromosomes and gonadal histology. *Eur J Pediatr* 1994; 153: 2-10.

Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttenn F, Ritvos O, Aittomaki K, Bourcigaux N, Jacquesson L, Bouchard P, Rene F, Dewailly D, Reyss A, Jeffery L, Bachelot A, Massin N, Fellous M and Veitia RA Mutations and sequence variants in *GDF9* and *BMP15* in patients with premature ovarian failure. *European Journal of Endocrinology* 2006; 154 739–744.

Laissue P, Vinci G, Veitia RA, Fellous M. Recent advances in the study of genes involved in non-syndromic premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol Review* 2008; 282(1-2):101-11.

Ledig S, Ropke A, Haeusler G, Hinney B, Wieacker P. *BMP15* mutations in XX gonadal dysgenesis and premature ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198:84.e1–84.e5.

Lehmann R and Nusslein-Volhard C. The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the Drosophila embryo. *Development* 1991; 112, 679-691.

Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA. Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric. *Endocrinology Pediatrics* 2006; 118 (2): e 488-500.

Lin L, Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (*SF-1, Ad4BP, ND5A1*) and disorders of testis development. *Sex Dev Review* 2008; 2 (4-5):200-9.

Lourenço D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, Boudjenah R, Guerra-Junior G, Maciel-Guerra AT, Achermann JC, McElreavey K, Bashamboo A. Mutations in *ND5A1* associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 2009; 360 (12):1200-10.

Maciel-Guerra AT, de Mello MP, Coeli FB, Ribeiro ML, Miranda ML, Marques-de-Faria AP, Baptista MT, Moraes SG, Guerra-Júnior G. XX Maleness and XX true hermaphroditism in *SRY*-negative monozygotic twins: additional evidence for a common origin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(2):339-43.

MacArthur H, Bubunenko M, Houston DW and King ML. Xcat2 RNA is a translationally sequestered germ plasm component in Xenopus. *Mech Dev* 1999; 84, 75-88.

Mallet D, Bretones P, Michel-Calemard L, Dijoud F, David M, Morel Y. Gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46,XY patient heterozygous for the nonsense C16X mutation: a case of SF-1 haploinsufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:4829–4832.

Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges *Review Nat Med* 2008; 14(11):1197-213.

Mclaren A. Establishment of the germ cell lineage in mammals. *J Cell Physiol Review* 2000; 182(2): 141-3.

Menke DB, Page DC. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev Biol* 2003; 262(2):303-12.

Mericq V, Ciaccio M, Marino R, Lamoglia JJ, Viterbo G, Rivarola MA, Belgorosky A. A new *DAX-1* mutation in a family with a case of neonatal adrenal insufficiency and a sibling with adrenal hypoplasia and sudden death at 3 years of age. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2007; (9):1039-43.

Miyamoto T, Sengoku K, Takuma N, Hasuike S, Hayashi H, Yamauchi T, Yamashita T, Ishikawa M. Isolation and expression analysis of the testis-specific gene, *STRA8*, stimulated by retinoic acid gene 8. *J Assist Reprod Genet* 2002; (11): 531-5.

Morelli MA, Cohen PE. Not all germ cells are created equal: Aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 2005; 130:761-781.

Muscatelli F, Strom TM, Walker AP, Zanaria E, Récan D, Meindl A, Bardoni B, Guioli S, Zehetner G, Rabl W, et al. Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 1994; 372 (6507):672-6.

Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Décimo D, Gansmuller A, Heyberger S, Dollé P, Bronner S, Lutz Y, Chambon P. Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by *Stra8*, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol* 1996; 135(2):469-77.

Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 1997; 18:361–377.

Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A, Camerino G. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 2006; 38, 1304–1309.

Philibert P, Biason-Lauber A, Rouzier R, Pienkowski C, Paris F, KoNDad D, Schoenle E, Sultan C. Identification and functional analysis of a new *WNT4* gene mutation among 28 adolescent girls with primary amenorrhea and müllerian duct abnormalities: a French collaborative study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93 (3):895-900.

Pilon M and Weisblat DA. A nanos homolog in leech. *Development* 1997; 124, 1771-1780.

Qin Y, Zhao H, Kovanci E, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A. Mutation analysis of *NANOS3* in 80 Chinese and 88 Caucasian women with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2007; 88(5):1465-7.

Richards KA, Fukai K, Oiso N, Paller AS. A novel KIT mutation results in piebaldism with progressive depigmentation. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44 (2):288-92.

Rossetti R, Di Pasquale E, Marozzi A, Bione S, Toniolo D, Grammatico P, Nelson LM, Beck-Peccoz P, Persani L. *BMP15* mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Hum Mutat* 2009; 30 (5):804-10.

Sadate-Ngatchou PI, Payne CJ, Dearth AT, Braun RE. Cre recombinase activity specific to postnatal, premeiotic male germ cells in transgenic mice. *Genesis* 2008; 46(12):738-42.

Shibanuma K, Tong Z-B, Vanderhoof VH, Vanevskiand K Nelson LM. Investigation of *KIT* gene mutations in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure. *BMC Women's Healt* 2002; 2:8.

Skordis NA, Stetka DG, MacGillivray MH, Greenfield SP. Familial 46,XX males coexisting with familial 46,XX true hermaphrodites in same pedigree. *J Pediatr* 1987; 110(2):244-8.

Spritz RA, Giebel LB, Holmes SA. Dominant negative and loss of function mutations of the c-kit (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene in human piebaldism. *Am J Hum Genet* 1992; 50:261-269.

Subramaniam K and Seydoux G. *nos-1* and *nos-2*, two genes related to Drosophila nanos, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 1999; 126, 4861-4871.

Suzuki H, Tsuda M, Kiso M, Saga Y. *Nanos3* maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both *Bax*-dependent and -independent apoptotic pathways. *Dev Biol* 2008; 318(1):133-42.

van Niererk WA and Retief AE. The gonads of human true hermaphrodites. *Human genetics* 1981; 58 (1):117-22.

Vilodre LC, Moretto M, Kohek MBF, Spritzer PM. Arq Bras Falência ovariana prematura: aspectos atuais REVISÃO. *Endocrinol Metab* 2007; 51: 6.

Taketo T, Saeed J, Manganaro T, Takahashi M, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance production associated with loss of oocytes and testicular differentiation in the transplanted mouse XX gonadal primordium. *Biol Reprod* 1993; 49(1):13-23.

Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S, Kobayashi S, Saga Y. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* 2003; 301 (5637):1239-41.

Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G. *FoxI2* disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 2004; 13 (11):1171-81.

Vainio S, Heikkila M., Kispert A., Chin N. and McMahon A.P. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signaling. *Nature* 1999; 397, 405–409.

Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJ; Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod* 2000; 62:370–377.

Watikins, WJ, AJ Umbers, KJ Woad, et al. Mutational screening of *FOXO3A* and *FOXO1A* in women with premature ovarian failure. *Fertil. Steril* 2006; 86: 1518–1521.

Wilhelm D. R-spondin1-discovery of the long-missing, mammalian female-determining gene? *Bioessays Review* 2007; 29 (4):314-8.

Wong M, Ramayya MS, Chrousos GP, Driggers PH, Parker KL. Cloning and sequence analysis of the human gene encoding *steroidogenic factor 1*. *J Mol Endocrinol* 1996; 17:139–147.

Yan JAC, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulose cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:10288–10293.

Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 2001; (6):854-66.

Yao HH, DiNapoli L, Capel B. Meiotic germ cells antagonize mesonephric cell migration and testis cord formation in mouse gonads. *Development* 2003; 130 (24):5895-902.

Yu RN, Achermann JC, Ito M, Jameson JL. The Role of DAX-1 in Reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 1998; 9(5):169-75.

Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, et al. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 1994; 372: 635–641.

Zhang YH, Guo W, Wagner RL, Huang BL, et al. *DAX1* mutations provide insight into structure-function relationships in steroidogenic tissue development. *Am J Hum Genet* 1998; 62:855–864.