

**MARIA TEREZA MARTINS FERRARI**

**Análise por sequenciamento paralelo de larga escala de uma coorte de  
pacientes com distúrbios/diferenças do desenvolvimento do sexo 46,XX  
testicular e ovotesticular *SRY*-negativo**

**São Paulo**

**2023**

**MARIA TEREZA MARTINS FERRARI**

**Análise por sequenciamento paralelo de larga escala de uma coorte de  
pacientes com distúrbios/diferenças do desenvolvimento do sexo 46,XX  
testicular e ovotesticular *SRY*-negativo**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Sorahia Domenice

**São Paulo**

**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ferrari, Maria Tereza Martins

Análise por sequenciamento paralelo de larga  
escala de uma coorte de pacientes com  
distúrbios/diferenças do desenvolvimento do sexo  
46,XX testicular e ovotesticular SRY-negativo /  
Maria Tereza Martins Ferrari. -- São Paulo, 2023.

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

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Sorahia Domenice.

Descritores: 1.Transtornos do cromossomo sexual  
no desenvolvimento sexual 2.Transtornos 46,XX do  
desenvolvimento sexual 3.Transtornos  
ovotesticulares do desenvolvimento sexual  
4.Sequenciamento do exoma

USP/FM/DBD-293/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Ferrari MTM. Análise por sequenciamento paralelo de larga escala de uma coorte de pacientes com distúrbios/diferenças do desenvolvimento do sexo 46,XX testicular e ovotesticular *SRY*-negativo [doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Aprovada em: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio do auxílio pesquisa processo 425845/2018-4.

## **DEDICATÓRIA**

À Deus que sempre me carrega no colo nos momentos mais difíceis e desafiadores da caminhada.

À minha filha Maria Luiza, o meu projeto mais importante, inspirador e extraordinário!

## AGRADECIMENTOS

Durante a jornada do Doutorado, muito aprendizado e novos amigos. Agradecer a todos os envolvidos traz uma alegria enorme, pois sem a ajuda de cada um, não teria sido possível.

Agradeço à minha orientadora, a querida Professora Sorahia, sempre muito generosa e paciente. Seus ensinamentos permitiram não só o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, como também o meu crescimento pessoal.

Ao professor Alexander Jorge, por toda dedicação e empenho nas pesquisas da genética endocrinológica. Agradeço pelos ensinamentos nas análises do sequenciamento exômico, que foram essenciais que o trabalho pudesse ser realizado.

À professora Berenice Bilharino Mendonça por suas valorosas contribuições para concretização deste estudo e ao suporte institucional sempre oferecido.

À professora Elaine Maria Frade pelo convívio inicial e ensinamento na sala do DDS.

À Mirian Nishi pelo carinho e auxílio nas técnicas de biologia molecular, sempre muito atenciosa e disponível.

À Luciana Montenegro, Lucas Santana, Anna Benedetti e Barbara Braga que me ajudaram nas análises dos dados.

À toda equipe do Laboratório de Investigação Médica 42 (LIM 42) pelo convívio e colaboração ao longo desta jornada, especialmente a Nilda (*in memoriam*) e a Rosângela, sempre muito alegres e prestativas.

À equipe do Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da FMUSP (SELA) pela expertise e empenho na realização do sequenciamento.

À secretaria de Pós-graduação da Disciplina de Endocrinologia, em especial a secretária Maria Aparecida (Cida) pelas orientações.

À todas as colaborações nacionais e internacionais por compartilharem seus pacientes para o estudo genético e ampliarmos os conhecimentos adquiridos neste trabalho.

À Dani, amiga sempre cuidadosa e atenciosa. Que me apresentou à toda equipe do DDS e permitiu que o desejo da pós-graduação se tornasse realidade.

Aos amigos do grupo do DDS! Rafael, o seu conhecimento e didática, agregaram sempre as discussões de biologia molecular e dos casos clínicos. Renata e Júlio que dividiram o cuidado com os nossos pacientes, sempre de forma muito zelosa e colaborativa. A Lia, colega com quem compartilhei as disciplinas e almoços. Muito especial conhecer todos vocês! A Nathalia Lisboa, que contribuiu para a casuística, com seus pacientes de Belo Horizonte, sempre de forma muito acessível e disponível.

Aos pacientes, minha gratidão permanente, por confiarem em nosso conhecimento, na nossa ética, contribuindo para a ampliação do conhecimento e da ciência.

Ao meu esposo Flávio, que está comigo desde o início da Faculdade de Medicina. O meu companheiro de todos os momentos, que me ouve, aconselha e apoia. E principalmente, torna os meus dias mais leves e felizes!

À minha mãe Aliziê (*in memmoriám*), minha primeira professora, que me ensinou sobre independência e autonomia, mas sem esquecer da amizade e da gratidão. Como gostaria que estivesse aqui para compartilhar comigo estes anos.

Ao meu pai, Norival, que sempre alicerçou o sonho da menina de 9 anos que já queria ser médica. E permitiu que este sonho se tornasse realidade.

À minha prima Aloma e a minha tia Sofia, que sempre me receberam com todo carinho e receptividade em sua casa, nos dias que precisei pernoitar em São Paulo

Às pessoas que foram minha rede de apoio e ajudaram a cuidar da minha Maria Luiza quando precisava me dedicar a este trabalho, em especial a Claudirene Cunha e a Geisa Concret. Sem este apoio, teria sido muito mais difícil.

À minha professora de inglês, Flávia, sempre com um sorriso no rosto! Nossas aulas são uma oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal.



## RESUMO

Ferrari MTM. Análise por sequenciamento paralelo de larga escala de uma coorte de pacientes com distúrbios/diferenças do desenvolvimento do sexo 46,XX testicular e ovotesticular *SRY*-negativo [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

O desenvolvimento gonadal em mamíferos é um processo dinâmico e complexo, que requer a interação de múltiplos fatores em um meticuloso sistema de retrocontrole e autorregulação. Defeitos nos genes envolvidos nestes processos são uma das causas dos distúrbios/diferenças do desenvolvimento do sexo (DDS). A diferenciação ovariana é o resultado normalmente esperado para o desenvolvimento gonadal em fetos 46,XX. Entretanto, em raros casos, as gônadas de indivíduos 46,XX podem se diferenciar completamente em testículos, condição conhecida como DDS 46,XX testicular (DDS 46,XX T) ou, ainda, ocorrer a coexistência de tecidos testicular e ovariano em um mesmo indivíduo, dando origem ao DDS 46,XX ovotesticular (DDS 46,XX OT). O gene *SRY*, um importante fator determinante testicular, é identificado em uma fração de pacientes com DDS 46,XX testicular e ovotesticular (DDS 46,XX T/OT), sendo o responsável pelo desenvolvimento gonadal masculino nestes pacientes. Porém, o estudo de várias coortes de pacientes DDS 46,XX T/OT demonstrou que o *SRY* não é o único gene associado a esses fenótipos. A etiologia heterogênea dessas condições dificulta a análise molecular pelas estratégias tradicionais de estudo de genes candidatos. As novas estratégias de sequenciamento paralelo em larga escala, com avaliação global do material exômico/genômico do indivíduo, veio facilitar a análise simultânea de vários genes já reconhecidos, como também permitir a identificação de novos genes possivelmente envolvidos na etiologia dos DDS. Baseado neste contexto, o presente estudo teve como objetivo principal estabelecer o diagnóstico molecular em um grupo de portadores de DDS 46,XX T/OT sem diagnóstico molecular definido, utilizando a técnica de sequenciamento completo do exoma. O sequenciamento foi realizado na plataforma *Illumina*. Os dados brutos foram analisados utilizando um *pipeline* para a identificação de variantes de ponto, *indels* e variações do número de cópias. As variantes foram classificadas de acordo com os critérios do *American College of Medical Genetics*. Vinte e quatro pacientes com DDS 46,XX T/OT *SRY*-negativo foram avaliados, 22 com diagnóstico histológico de DDS OT e dois com diagnóstico não histológico de DDS T. A casuística incluiu 22 pacientes com doença esporádica e uma família com dois irmãos afetados. Em 29,1% (7/24) dos pacientes investigados foi possível identificar um gene candidato associado ao fenótipo. Nenhum gene candidato foi identificado nos dois pacientes

com diagnóstico provável de DDS 46,XX T. Das variantes selecionadas como possíveis candidatas à etiologia da doença, duas variantes foram classificadas provavelmente patogênicas (genes *FLNB* e *SOX10*) e quatro variantes como de significado incerto, destacando-se as variantes nos genes *IMMP2L*, *SOX8*, *PRKACG* e *CLASPI*. A variante alélica c.397delT (p.Ser133Leufs7\* no *IMMP2L* foi identificada em heterozigose nos dois irmãos com DDS 46,XX OT e estava ausente nos familiares não afetados (mãe e irmão). As descrições prévias da associação entre o gene *Immp2l* e a função reprodutiva em mamíferos bem como seu potencial papel na etiologia de linhagens de ovelhas portadoras de XX *female-to-male sex reversal*, reforçam nossos achados e a possível contribuição desse gene no fenótipo em questão. As variantes alélicas: c.C1329A (p.Ser443Arg) do gene *SOX10* e c.C2822A (p.Pro941Gln) do gene *FLNB*, classificadas como potencialmente patogênicas, também despertaram interesse como potenciais novos genes candidatos. Evidências indicam possíveis interações indiretas dessas proteínas com a regulação do *SOX9*. O papel de destaque dos genes da família *SOX*, no processo do desenvolvimento testicular conduziram ao estudo da variante alélica candidata identificada no gene *SOX8*, categorizada como *VUS*. Da mesma forma, as variantes alélicas c.A971G (p.Asp324Gly) e c.C3475T (p.Arg1159Cys) identificadas nos genes *PRKACG* e *CLASPI*, respectivamente, classificadas como *VUS*, foram consideradas candidatas. O *PRKACG* potencialmente interage com genes críticos da cascata da determinação gonadal masculina e já foi anteriormente associado à etiologia de disgenesia gonadal 46,XY. Neste estudo, a segregação das variantes identificadas só pode ser realizada em 25% dos casos, porque os pais não estavam disponíveis para análise nos outros pacientes. A ausência de disponibilidade dos trios limitou a avaliação e a classificação das novas variantes alélicas candidatas. Embora estabelecer a etiologia genética das anormalidades do desenvolvimento gonadal em portadores de 46,XX DDS OT/T permaneça um desafio, os resultados deste estudo geraram informações inéditas, que abrem novas perspectivas de estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento gonadal humano, uma complexa e fascinante área da ciência.

Palavras-chave: Transtornos do cromossomo sexual no desenvolvimento sexual. Transtornos 46,XX do desenvolvimento sexual. Transtornos ovotesticulares do desenvolvimento sexual. Sequenciamento do exoma.

## ABSTRACT

Ferrari MTM. Whole sequencing analysis of a cohort of *SRY*-negative 46,XX testicular and ovotesticular disorders/differences of sex development [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Gonadal development in mammals is a dynamic and complex process that requires the interaction of multiple factors in a meticulous system of feedback control and self-regulation. Defects in genes involved in these processes are one of the causes of disorders/differences of sex development (DSD). Ovarian differentiation is the ordinarily expected outcome for the gonadal development in 46,XX foetuses. Nevertheless, in rare cases, the gonads of individuals with 46,XX chromosomes can differentiate completely into testes, a condition known as 46,XX testicular DSD (46,XX TDS). Additionally, can occur the coexistence of testicular and ovarian tissues in the same individual, resulting in 46,XX ovotesticular DSD (46,XX OTDS). The *SRY* gene, an important testis-determining factor, is identified in a fraction of patients with 46,XX TDS and OTDS (46,XX TDS/OTDS), responsible for the male gonadal development in these patients. Conversely, the study of various cohorts of 46,XX TDS/OTDS patients has shown that *SRY* is not the single gene associated with these phenotypes. The heterogeneous aetiology of these conditions hampers molecular analysis using traditional strategies for studying candidate genes. The new strategies of large-scale parallel sequencing, with evaluation of the individual's entire exomic/genomic material, have enabled the simultaneous analysis of multiple recognized genes, as well as the identification of new genes possibly involved in the aetiology of DSD. Based on this context, the present study aimed to establish the molecular diagnosis in a group of patients with 46,XX TDS/OTDS without a defined molecular diagnosis, using the technique of whole exome sequencing. Sequencing was performed on the *Illumina* platform. The raw data were analysed using a pipeline for the identification of point variants, indels, and copy number variations. The variants were classified in compliance with the American College of Medical Genetics criteria. Twenty-four patients with *SRY*-negative 46,XX TDS/OTDS were evaluated, 22 with a histological diagnosis of 46,XX OTDS and two with a non-histological diagnosis of 46,XX TDS. The casuistry included 22 patients with sporadic disease and one family with two affected siblings. In 29,1% (7/24) of the investigated patients, it was possible to identify a candidate gene associated with the phenotype. No candidate gene was identified in the two patients with a probable diagnosis of 46,XX TDS. Among the variants selected as potential candidates for the aetiology of the

disease, two variants were classified as likely pathogenic (in the *FLNB* and *SOX10* genes), and four variants were classified as variants of uncertain significance (VUS), with notable variants in the *IMMP2L*, *SOX8*, *PRKACG* and *CLASPI* genes. The allele variant c.397delT (p.Ser133Leufs\*7) in *IMMP2L* was identified in heterozygosity in the two siblings with 46,XX OTDSD and was absent in unaffected family members (the mother and a third sibling). Previous descriptions of the association between the *Immp2l* gene and the reproductive function in mammals, as well as its potential role in the aetiology of XX female-to-male sex reversal in sheep lineages, reinforce our findings and the possible contribution of this gene to the phenotype in question. The likely pathogenic variants c.C1329A (p.Ser443Arg) of the *SOX10* gene, and c.C2822A (p.Pro941Gln) of the *FLNB* gene, sparked interest as potential new candidate genes. Evidence indicates possible indirect interactions of these proteins with the SOX9 regulation. The prominent role of the *SOX* gene family, in the process of testicular development led to the study of candidate allele variant identified in the *SOX8*, categorized as VUS. Similarly, the allele variant (c.A971G; p.Asp324Gly) identified in the *PRKACG* gene and the c.C3475T (p.Arg1159Cys) in the *CLASPI*, both classified as VUS, were considered candidate variants. The *PRKACG* potentially interacts with critical genes in the cascade of male gonadal determination and has previously been associated with the aetiology of 46,XY gonadal dysgenesis. In this study, the segregation of the identified variants could only be performed in 25% of the cases because parents were not available for analysis. The lack of availability of trios could have limited the evaluation and classification of new candidate allele variants. Although the establishment of the genetic aetiology of gonadal development abnormalities in individuals with 46,XX TDSD/OTDSD remains a challenge, the results of this study have generated unique information that opens new perspectives for studying the mechanisms involved in human gonadal development, a complex and fascinating area of science.

Keywords: Sex chromosome disorders of sex development. 46, XX disorders of sex development. Ovotesticular disorders of sex development. Exoma sequencing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diferenciação sexual durante o período embrionário-fetal humano .....	21
Figura 2 -	Fluxo de preparo das bibliotecas para sequenciamento exômico .....	40
Figura 3 -	Visão geral das etapas de amplificação clonal e sequenciamento na superfície da <i>flowcell</i> .....	42
Figura 4 -	Algoritmo para a priorização das variantes alélicas candidatas .....	47
Figura 5 -	Interações entre as proteínas SOX9, PRKACA e PRKACG com base em pesquisa no banco de dados STRING .....	60
Figura 6 -	Em A: estruturas esquemáticas do aminoácido original (esquerda) e do aminoácido mutante (direita); B: Visão geral da proteína <i>wild-type</i> e mutante em apresentação de fita. A cadeia lateral do resíduo mutado está em destaque rosa e mostrada como pequenas esferas; C: Em destaque, a cadeia lateral da proteína <i>wild-type</i> e da proteína mutante são mostradas em verde e vermelho, respectivamente .....	61
Figura 7 -	Heredograma da família 7 na qual foi identificada a variante alélica candidata c.397delT (p.Ser133Leufs*7) no gene <i>IMMP2L</i> .....	63
Figura 8 -	Eletroferograma com a variante c397delT (p.Ser133Leufs*7) identificada em heterozigose no éxon 5 no gene <i>IMMP2L</i> .....	63
Figura 9 -	Mutação da Glicina para Valina na posição 51 .....	64
Figura 10 -	Mutação da Serina para Arginina na posição 443.....	66

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Distúrbios/Diferenças do desenvolvimento do sexo associado a anormalidades do desenvolvimento gonadal.....	23
Quadro 2 - Causas dos Distúrbios/Diferenças do Desenvolvimento do Sexo 46,XX.....	23
Quadro 3 - Descrição dos fenótipos e dos genes classicamente causadores de DDS 46 XX Testicular e Ovotesticular.....	27
Quadro 4 - Variantes alélicas nos genes <i>NR5A1</i> e <i>WT1</i> , causadoras do fenótipo DDS 46,XX ovotesticular e testicular .....	30
Quadro 5 - Características clínicas e gonadais dos pacientes 46, XX DSD ovotesticular/testicular .....	51
Quadro 6 - Variantes alélicas identificadas por exoma nos pacientes DDS, 46XX T/OT.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	- Percentual
ABraOM	- Arquivo Brasileiro Online de Mutações
aCGH	- <i>Comparative Genomic Hybridization array</i> (array de hidridação genômica comparativa)
ACMG	- <i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
AMH	- <i>Anti- Mullerian Hormone</i> (Hormônio anti-Mulleriano)
AMP	- <i>Association of Molecular Pathology</i> (Associação Molecular de Patologia)
bp	- Pares de bases
BP	- Critério do ACMG/AMP fraco para benignidade
BS	- Critério do ACMG/AMP forte para benignidade
CAAD	- <i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>
CAPPesq	- Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cm	- Centímetros
ClinVar	- Banco de dados com as informações referentes ao significado clínico das variantes alélicas
CNV	- <i>Copy number variation</i>
dbSNP	- <i>Single Nucleotide Polymorphism database</i> (banco de dados para avaliação de polimorfismo de nucleotídeo único)
DDS	- Distúrbio do desenvolvimento sexual
DDS OT	- Distúrbio do desenvolvimento sexual ovotesticular
DDS T	- Distúrbio do desenvolvimento sexual testicular
DHT	- Dihidrotestosterona
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
FISH	- <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
GERP	- <i>Genomic evolutionary Rate Profiling</i>
HAC	- Hiperplasia Adrenal Congênita
hCG	- gonadotrofina coriônica humana
HGMD	- <i>Human Gene Mutation Database</i>
gnomAD	- <i>genome Aggregation Database</i>
HCFMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Hg19 UCSC	- <i>Human Genome</i> versão 19 do projeto genoma da Universidade da Califórnia Santa Cruz
IGV	- <i>Integrative Genomics Viewer</i>
Indels	- Inserções e deleções
kb	- ( <i>Kilobase</i> ) quilobase

LIM42	- Laboratório de Hormônios e Genética Molecular 42
MAF	- <i>Minor allele frequency</i>
mL	- Mililitros
MLPA	- <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
ng	- Nanograma
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology and Information</i>
ND	- Não descrito
OMG	- Organismo Geneticamente Modificado
OMIN	- <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PCR	- Reação de polimerase em cadeia
PM	- Critério do ACMG/AMP moderado para patogenicidade
PolyPhen2	- <i>Polymorphism Phenotyping v2</i> (ferramenta de predição <i>in silico</i> )
PP	- Critério do ACMG/AMP fraco para patogenicidade
PREMIUM	- Programa Rede de Equipamentos Multiusuários
PS	- Critério do ACMG/AMP forte para patogenicidade
PVS	- Critério do ACMG/AMP muito forte para benignidade
SELA	- Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala
SIFT	- <i>Sorting Intolerant from Tolerant Human Protein</i> (ferramenta de predição <i>in silico</i> )
SNP	- <i>Single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de um único nucleotídeo)
SNV	- <i>Single nucleotide variant</i> (variante de nucleotídeo único)
SPLE	- Sequenciamento paralelo em larga escala
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
TESCO	- <i>Element of testis-specific enhancer</i>
TDF	- <i>Testis -determining factor</i>
UTR	- <i>Untranslated region</i>
vcf	- <i>Variant Call Format</i> (chamada de variantes)



## LISTA DE SÍMBOLOS DE GENES

- AMH* - Anti-Mullerian Hormone
- CBX2* - Chromobox protein homolog 2
- CLASP1* - Cytoplasmic Linked-Associated Protein 1
- CTNNB* - Catenin Beta 1
- DMRT1* - Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1
- FLNB* - FilaminB
- GATA4* - Gata-building Protein 4
- FGF9* - Fibroblast Growth Factor 9
- FGFR2* - Fibroblast Growth Factor Receptor 2
- FOXL2* - Forkhead box L2
- FTS* - Folistatin
- HSD3B2* - Hydroxy-Delta-5-Steroid Dehydrogenase, 3 Beta- And Steroid  
Delta\_Isomerase 2
- IMMP2L* - Inner Mitochondrial Membrane Peptidase, subunit 2
- NR2F2* - Nuclear Receptor subfamily 2, group F, member 2
- NR5A1* - Nuclear Receptor Subfamily 5
- PRKACA* - Protein Kinase, cAMP- dependente,Catalytic, alfa
- PRKACG* - Protein Kinase, cAMP- dependente,Catalytic, Gamma0
- PTGDS* - Prostaglandin D2 Synthase
- RSPO1* - R-spondin 1
- SOX3* - SRY-related HMG-Box gene 3
- SOX8* - SRY-related HMG-Box gene 8
- SOX9* - SRY-related HMG-Box gene 9
- SOX10* - SRY-related HMG-Box gene 10
- SRD5A2* - Steroid 5 Alpha\_reductase 2
- SRY* - Sex Determining Region Y
- WNT4* - Wnt Family member 4
- WT1* - WT1 Transcription Factor

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1	MECANISMOS ATUANTES NO DESENVOLVIMENTO DO SEXO EM HUMANOS .....	20
1.1.1	Determinação gonadal.....	20
1.1.2	Diferenciação sexual .....	22
1.2	DISTÚRBIOS/DIFERENÇAS DO DESENVOLVIMENTO DO SEXO.....	22
1.3	DISTÚRBIOS/DIFERENÇAS DO DESENVOLVIMENTO DO SEXO TESTICULAR E OVOTESTICULAR.....	24
1.3.1	Distúrbio/diferença do desenvolvimento do sexo testicular .....	24
1.3.2	Distúrbios/diferenças do desenvolvimento do sexo ovotesticular .....	24
1.4	POSSÍVEIS MECANISMOS GENÉTICOS CAUSADORES DOS DDS TESTICULAR/OVOTESTICULAR .....	25
1.5	DIAGNÓSTICO DOS DISTÚRBIOS/DIFERENÇAS DO DESENVOLVIMENTO DO SEXO TESTICULAR E OVOTESTICULAR.....	31
1.6	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO .....	33
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
2.1	OBJETIVO PRINCIPAL.....	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>3</b>	<b>MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	37
3.2	PACIENTES .....	37
3.2.1	CrITÉRIOS de inclusão .....	37
3.2.2	CrITÉRIOS de exclusão.....	38
3.3	MÉTODOS .....	38
3.3.1	Extração e armazenamento do DNA genômico.....	38
3.3.2	Sequenciamento paralelo em larga escala.....	38
3.3.2.1	Preparo das bibliotecas .....	39
3.3.2.2	Amplificação clonal .....	40
3.3.2.3	Sequenciamento .....	41
3.3.3	Análise por Bioinformática.....	42
3.3.4	Seleção e classificação das variantes de ponto ou <i>indels</i> candidatas.....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES SELECIONADOS PARA O ESTUDO.....	50
4.2	AVALIAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO EXÔMICO .....	54
4.3	PRIORIZAÇÃO DAS VARIANTES ALÉLICAS.....	54
4.3.1	Paciente 1 .....	57
4.3.2	Paciente 2 .....	58
4.3.3	Paciente 4.....	59

4.3.4	Pacientes 7a e 7b .....	62
4.3.5	Paciente 9 .....	64
4.3.6	Paciente 20 .....	65
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
5.1	ANÁLISE DAS VARIANTES ALÉLICAS IDENTIFICADAS EM GENES CLASSICAMENTE RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO GONADAL: MEMBROS DA FAMÍLIA SOX .....	70
5.1.1	Variante identificada no gene <i>SOX8</i> .....	70
5.1.2	Variante identificada no gene <i>SOX10</i> .....	72
5.2	ANÁLISE DAS VARIANTES ALÉLICAS IDENTIFICADAS EM NOVOS GENES CANDIDATOS AOS DISTÚRBIOS DO DESENVOLVIMENTO GONADAL 46,XX: <i>CLASP1</i> , <i>FLNB</i> , <i>IMMP2L</i> , <i>PRKACG</i> .....	73
5.2.1	Gene <i>CLASP1</i> .....	74
5.2.2	Gene <i>FLNB</i> .....	75
5.2.3	Gene <i>IMMP2L</i> .....	76
5.2.4	Gene <i>PRKACG</i> .....	77
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>96</b>

# **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 MECANISMOS ATUANTES NO DESENVOLVIMENTO DO SEXO EM HUMANOS

O desenvolvimento sexual dos mamíferos constitui um processo extremamente complexo e coordenado, com determinação genética, que pode ser dividido em três etapas<sup>1</sup>.

A primeira etapa refere-se ao estabelecimento do sexo cromossômico durante a fertilização do embrião. O conteúdo cromossômico 46,XY e 46,XX em humanos identifica, respectivamente, o sexo masculino e o sexo feminino e inicia a cascata do desenvolvimento sexual correspondente<sup>2</sup>.

A segunda etapa consiste no processo de determinação gonadal, que compreende a transformação do tecido gonadal embriologicamente indiferenciado, a crista urogenital, em uma gônada masculina ou feminina<sup>3</sup>.

Finalmente temos a diferenciação sexual, que engloba os processos envolvidos na diferenciação da genitália interna e externa e no desenvolvimento de caracteres sexuais secundárias no período puberal.

### 1.1.1 Determinação gonadal

A gônada bipotencial é constituída por duas populações celulares distintas: a germinativa e a somática, originárias do epitélio celômico e do mesênquima, respectivamente<sup>3</sup>.

Nos seres humanos, a fase de determinação sexual inicia-se por volta da sexta semana de vida do embrião e consiste na transformação do tecido somático gonadal bipotente em gônada masculina ou feminina<sup>3</sup>. Trata-se de um período complexo do desenvolvimento do embrião, com envolvimento de inúmeros genes e moléculas sinalizadoras, que interagem entre si, levando à formação do testículo ou do ovário<sup>2</sup>.

Uma delicada, balanceada e intrincada cronologia de expressão gênica está presente no processo de diferenciação gonadal, em que as vias para a formação testicular e ovariana são próprias e antagônicas<sup>4</sup>. Nos indivíduos 46,XY, a expressão do gene *SRY* (*Sex Determining Region Y*), que está localizado no braço curto do cromossomo Y na posição p11.3, desencadeia uma cascata de interações gênicas, cujo efeito final levam ao desenvolvimento dos testículos<sup>5</sup>.

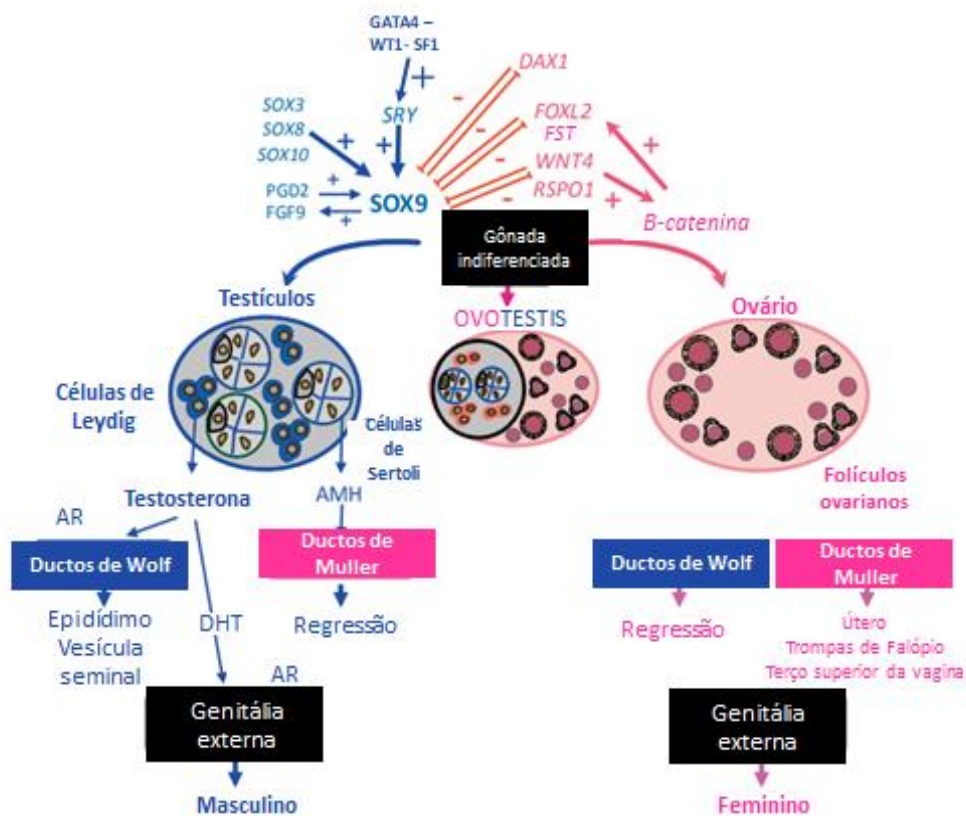
Muitos genes participam de forma crucial no processo da determinação testicular, com destaque para *NR5A1* (*Nuclear Receptor Subfamily 5*)<sup>6</sup>, *WT1* (*WT1 Transcription Factor*)<sup>7</sup>, *CBX2* (*Chromobox protein homolog 2*)<sup>8</sup>, o *GATA4* (*Gata-building Protein 4*)<sup>9</sup> e vários membros da família *SOX*, especialmente o *SOX9* (*SRY-related HMG-Box gene 9*)<sup>10</sup>. Este tem um importante papel, regulando a expressão de diversos genes da diferenciação sexual masculina,

como *FGF9/FGFR2* (*Fibroblast Growth Factor 9/Fibroblast Growth Factor Receptor 2*)<sup>11</sup>, *PTGDS* (*Prostaglandin D2 Synthase*)<sup>12</sup>, *AMH* (*Anti-Mullerian Hormone*)<sup>13</sup>, além de suprimir a expressão de genes indutores da diferenciação ovariana, como o *RSPO1* (*R-spondin 1*) e *FOXL2* (*Forkhead box L2*)<sup>14</sup>.

Os genes envolvidos na determinação ovariana exibem sua expressão um pouco mais tardiamente no processo de diferenciação da gônada bipotente<sup>15</sup>. *WNT4* (*Wnt Family member 4*) e *RSPO1* estabilizam a  $\beta$ -catenina, codificada pelo *CTNNB* (*Catenin Beta 1*). A  $\beta$ -catenina promove a expressão de importantes genes ovarianos, como o *FST* (*Folistatin*) e o *FOXL2*. Este último antagoniza o *SOX9* e outros genes envolvidos no desenvolvimento testicular.

Um desequilíbrio entre estas harmônicas vias gênicas pode determinar a geração de um tecido gonadal anômalo, como testículos incompletamente diferenciados, gônadas compostas apenas por tecido fibroso com ausência de tecido gonadal ou, até mesmo, a coexistência dos tecidos ovariano e testicular em um mesmo indivíduo (Figura 1).

**Figura 1 - Diferenciação sexual durante o período embrionário-fetal humano. A gônada indiferenciada pode diferenciar em testículo, ovário ou, ainda, de forma anômala, em ovotestis, a depender da via prevalente no delicado balanço da expressão gênica ativada**



Fonte: adaptado de Grinspon e Rey<sup>16</sup>.

### 1.1.2 Diferenciação sexual

Nesta última etapa, os processos são dependentes da ação dos hormônios secretados pelos testículos<sup>1</sup>. Em torno da sétima semana de gestação, os embriões possuem dois sistemas de dutos embrionários – os paramesonéfricos (ou mullerianos) que darão origem às trompas, útero e terço superior da vagina; e os dutos mesonéfricos (ou wolffianos) precursores dos vasos deferentes, epidídimo, vesículas seminais e ducto ejaculatório. Com a formação do testículo, há produção do hormônio antimulleriano (HAM) pelas células de Sertoli, que levará a regressão dos dutos de Muller<sup>1</sup>. A testosterona, secretada pelas células de Leydig, atua nos dutos de Wolff promovendo a formação das estruturas do sistema reprodutor interno masculino. A conversão da testosterona a diidrotestosterona (DHT) pela ação da enzima 5- $\alpha$  redutase 2 levará à completa formação da genitália externa masculina em torno da 12<sup>a</sup> semana gestacional<sup>1</sup>.

Na ausência da produção de testosterona e do hormônio antimulleriano, haverá regressão dos dutos de Wolff e manutenção das estruturas mullerianas, com desenvolvimento das trompas uterinas, útero e vagina proximal<sup>1</sup>.

## 1.2 DISTÚRBIOS/DIFERENÇAS DO DESENVOLVIMENTO DO SEXO

Os distúrbios/diferenças do desenvolvimento do sexo (DDS) são condições congênitas em que o desenvolvimento do sexo cromossômico, gonadal ou anatômico é atípico. Estas alterações afetam a diferenciação do sistema urogenital, resultando em um espectro fenotípico amplo, que engloba desde atipias genitais variadas, distúrbios do desenvolvimento puberal e infertilidade<sup>17</sup>. Recentemente, muitos autores têm substituído o termo “distúrbios” pela palavra “diferenças” do desenvolvimento do sexo<sup>18</sup>.

Didaticamente, os DDS podem ser classificados em três grandes grupos considerando-se o cariótipo dos indivíduos: DDS 46,XX; DDS 46,XY e DDS por anormalidades cromossômicas<sup>17</sup>.

Nestes três grandes grupos, diversas condições clínicas apresentam anormalidades no desenvolvimento da gônada, incluindo os portadores de disgenesias gonadais 46,XX e 46,XY, os pacientes com diagnóstico de DDS 46,XX ovotesticular e testicular. Há também os pacientes com alterações cromossômicas e gonadais, com destaque para aqueles com síndrome de Klinefelter e síndrome de Turner, pela maior prevalência nas populações<sup>17,19</sup> (Quadro 1).

**Quadro 1 - Distúrbios/Diferenças do desenvolvimento do sexo associado a anormalidades do desenvolvimento gonadal**

<b>DDS 46,XX</b>
Disgenesia gonadal (formas completa e parcial)
DDS testicular
DDS ovotesticular
<b>DDS 46,XY</b>
Disgenesia gonadal (formas completa e parcial)
Disgenesia gonadal associada a quadros sindrômicos
<b>Distúrbio do desenvolvimento sexual por anormalidade cromossômica</b>
Disgenesia dos túbulos seminíferos e suas variantes (síndrome de Klinefelter)
Disgenesia gonadal 45,X e suas variantes (síndrome de Turner)
DDS associado a mosaïcismo e quimerismo cromossômicos
Disgenesia gonadal mista (45,X/46,XY)
DDS ovotesticular 46,XX/46,XY

É de conhecimento comum que a diferenciação ovariana é a via normal em fetos 46,XX, com feminilização da genitália interna e externa. Em condições anormais, neonatos 46,XX podem apresentar virilização da genitália ao nascimento. Esta virilização pode ocorrer em condições, nas quais o feto, possuidor de ovários normais, é exposto a um excesso de andrógenos durante períodos críticos do desenvolvimento. Neste cenário, a origem dos andrógenos pode ser fetal, feto-placentária ou materna<sup>20</sup>. A hiperplasia adrenal congênita (HAC) por deficiência da enzima 21-hidroxilase representa a etiologia mais comum de DDS 46,XX<sup>21,22</sup>.

Em raros casos, gônadas de fetos 46,XX podem apresentar diferenciação anômala, com a formação de testículos, condição conhecida como Distúrbio do Desenvolvimento do Sexo Testicular (DDS T) 46,XX, ou desenvolver ambos tecidos gonadais, testicular e ovariano, em um mesmo indivíduo, condição chamada Distúrbio do Desenvolvimento do Sexo Ovotesticular (DDS OT) 46,XX (Quadro 2).

**Quadro 2 - Causas dos Distúrbios/Diferenças do Desenvolvimento do Sexo 46,XX**

<b>Diferenciação gonadal normal</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Excesso de andrógenos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Fetal: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hiperplasia adrenal congênita por deficiência de: 21-hidroxilase, 11<math>\beta</math>-hidroxilase, 3<math>\beta</math>-hidroxiesteroide-desidrogenase.</li> </ul> </li> <li>○ Feto-placentária: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ deficiência de aromatase e da P450 oxido-redutase (POR)</li> </ul> </li> <li>○ Materna (luteoma, exógena, dentre outras)</li> </ul> </li> </ul>
<b>Diferenciação gonadal anormal</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>DDS Testicular</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Forma clássica sem atipia genital (previamente denominado “Homem XX”)</li> <li>○ Forma com atipia genital.</li> </ul> </li> <li>● <b>DDS ovotesticular</b></li> </ul>



### 1.3 DISTÚRBIOS/DIFERENÇAS DO DESENVOLVIMENTO DO SEXO TESTICULAR E OVOTESTICULAR

As antigas definições de “homem XX ou sexo reverso XX” e “hermafrodita verdadeiro” foram substituídas pela nomenclatura mais recente DDS 46,XX Testicular (T) e DDS 46,XX ovotesticular (OT), respectivamente, de acordo com o consenso publicado em 2006<sup>17</sup>.

#### 1.3.1 Distúrbio/diferença do desenvolvimento do sexo testicular

Primeiramente descrito em 1964<sup>23</sup>, a frequência desta condição é estimada em 1:20.000 a 1: 25.000 meninos recém-nascidos e representa 2% dos casos de infertilidade masculina.

O fenótipo poderá ser masculino típico a graus variados de atipia genital, a depender do desenvolvimento tecidual testicular. Cerca de 80% dos afetados apresentam fenótipo normal ao nascimento e são, geralmente, diagnosticados durante ou após a puberdade por hipogonadismo hipergonadotrófico, ginecomastia e/ou infertilidade<sup>24</sup>.

#### 1.3.2 Distúrbios/diferenças do desenvolvimento do sexo ovotesticular

O distúrbio/diferença da desenvolvimento do sexo ovotesticular é uma forma bastante rara de DDS, com incidência calculada em 1:100.000 nascidos-vivos<sup>25</sup>, o que representa 3 - 10% da totalidade dos pacientes com DDS<sup>26</sup>. É caracterizado pela coexistência de tecido gonadal masculino com túbulos seminíferos bem desenvolvidos e tecido gonadal feminino com folículos primordiais em um mesmo indivíduo. Ambos tecidos gonadais podem estar presentes na mesma gônada, denominada de ovotestis.

Se ovotestis presente nos dois lados é classificado como tipo bilateral, se os tecidos ovariano e testicular se apresentarem separadamente, um em cada gônada, é classificado em tipo lateral ou, ainda, comumente, como tipo unilateral, ovotestis unilateral e um testículo ou ovário contralateral<sup>27</sup>.

A idade de reconhecimento desta condição é heterogênea. Grande número de portadores terá genitália atípica ao nascimento; outros poderão apresentar-se na infância com hipospádia perineal ou criptorquidia. Há ainda manifestações mais tardias, em adolescentes com hematúria cíclica e/ou desenvolvimento mamário em indivíduos com fenótipo masculino ou irregularidade menstrual e/ou sinais de virilização em indivíduos fenotipicamente femininos<sup>28-31</sup>.

Nos pacientes DDS OT podem ser identificados diversos cariótipos, os quais apresentam prevalências diferentes de acordo com a região geográfica em estudo. Entretanto, na maioria das coortes descritas, o cariótipo 46,XX é o mais frequente, identificado em 65 a 90% dos pacientes<sup>32-34</sup>.

A maioria dos casos de DDS OT são esporádicos. Entretanto há várias descrições na literatura de indivíduos DDS T e DDS OT dentro da mesma irmandade, sugerindo que ambas as condições possam ter uma origem genética similar<sup>35-38</sup>.

#### 1.4 POSSÍVEIS MECANISMOS GENÉTICOS CAUSADORES DOS DDS TESTICULAR/OVOTESTICULAR

Muitos mecanismos genéticos causadores dos DDS 46,XY foram elucidados nos últimos anos; entretanto as vias que levam ao desenvolvimento testicular em indivíduos 46,XX permanecem pouco esclarecidas, de forma que muitos destes pacientes ainda estão sem uma etiologia molecular definida para a origem do desenvolvimento gonadal atípico.

A formação do tecido testicular em DDS 46,XX T/OT pode ser consequência de pelo menos três mecanismos diferentes: (1) translocação de material genético do cromossomo Y para um cromossomo X ou um autossomo durante a meiose paterna; (2) presença de mosaicismo críptico do cromossomo Y ou (3) presença de mutações de ponto ou de variações no número de cópias em genes que participam das vias da determinação gonadal masculina ou feminina<sup>14</sup>. Estas alterações gênicas causam um desequilíbrio das vias de determinação gonadal para o sentido do desenvolvimento tecidual testicular em um indivíduo 46,XX.

Inicialmente, a diferenciação masculina em indivíduos 46,XX foi creditada à transferência de um fator determinante testicular *\_Testis-Determining Factor (TDF)\_* presente no cromossomo Y. A identificação do gene *SRY* no braço curto do cromossomo Y no início da década de 1990 permitiu o esclarecimento de uma importante etapa no processo de determinação da gônada embrionária masculina. Ao gene *SRY* foi atribuído este papel de *TDF*<sup>39</sup>.

Na apresentação dos pacientes DDS 46,XX testicular sem atipia genital, também chamada de forma clássica, a presença de material de Y, especialmente o gene *SRY*, no genoma é identificada em cerca de 80-90%. De forma contrária, aqueles com graus menores de virilização e maior incidência de atipia genital comumente não apresentam material de Y detectável<sup>40</sup>. Foram descritos raros pacientes DDS T portadores de translocações de fragmentos do Y para o X, com atipia genital, mesmo na presença do gene *SRY*. A inativação preferencial do X que carrega o fragmento de Y poderia ser o mecanismo causador da masculinização incompleta da genitália neste subgrupo<sup>41</sup>.

A despeito do número limitado de estudos com grandes coortes de pacientes DDS 46,XX OT, a prevalência do gene *SRY* nestes pacientes variou de 10 a 33%<sup>38,42</sup>. A pesquisa negativa do *SRY* no DNA extraído de linfócitos do sangue periférico constitui o achado mais frequente nos pacientes portadores de DDS 46,XX OT com atipia genital<sup>30,43</sup>. Porém, em alguns estudos nos quais a análise do DNA extraído do tecido gonadal foi realizada, a presença de mosaïcismo críptico para o *SRY* e/ou para outras sequências de Y foi identificada, estabelecendo esta condição como uma causa incomum e rara da doença<sup>44-46</sup>. Desta forma, outras causas gênicas, independentes do *SRY*, têm sido intensamente investigadas nos DDS 46,XX T/OT *SRY*-negativo.

Dois diferentes mecanismos podem ser considerados no entendimento da diferenciação testicular em uma gônada XX *SRY*-negativo: a maior expressão de genes pró-testiculares, entre eles os genes da família *SOX*; ou a insuficiente expressão de genes pró-ovarianos/anti-testiculares, como o *WNT4*, *RSPO1*, dentre outros.

Duplicações do gene *SOX9* ou de sua região regulatória são causas de DDS 46,XX T/OT<sup>47-62</sup>. Recentemente, a variante alélica *missense* c.G148A (p.Glu50Lys) que causa ganho de função do promotor-específico do *SOX9*, foi reportada como provável etiologia molecular associada ao DDS 46,XX OT investigado, embora os resultados obtidos nos experimentos com o modelo animal modificado não tenham reproduzido o fenótipo da doença<sup>50</sup>. A identificação de variações no número de cópias do gene *SOX3* (*SRY-related HMG-Box gene 3*) foram descritas em pacientes DDS 46,XX OT<sup>57,63-72</sup>. A duplicação parcial da região cromossômica 22q13, que contém o gene *SOX10* (*SRY-related HMG-Box gene 10*) e trissomia do cromossomo 22 também foram identificados em portadores de DDS 46,XX OT<sup>68,73</sup>, reforçando a importância desta família de genes na etiologia da doença (Quadro 3).

Em adição a estas alterações de ganho de função de genes determinantes da diferenciação sexual masculina, as mutações com perda de função de genes que promovem a determinação sexual feminina também podem gerar o fenótipo DDS 46,XX T/OT. Este mecanismo é representado por mutações *missense* em homozigose no *RSPO1*, as quais foram associadas à rara síndrome caracterizada por DDS 46,XX T/OT, hiperqueratose palmo-plantar e susceptibilidade para o surgimento de carcinoma cutâneo de células escamosas<sup>74-77</sup>. Na síndrome de SERKAL (*SEx Reversion, Kidneys, Adrenal and Lung dysgenesis*), uma doença autossômica recessiva causada pela perda de função do gene *WNT4*, também são identificadas anormalidades do desenvolvimento da gônada XX<sup>78</sup> (Quadro 3).

**Quadro 3 - Descrição dos fenótipos e dos genes classicamente causadores de DDS 46 XX Testicular e Ovotesticular**

Patogênese proposta	Achado genético	Diagnóstico de DDS 46,XX	Genitália Externa	Gônadas	Referência	
<b>Expressão aumentada do SOX9</b>	Gene <i>SOX9</i> - Duplicado	Testicular	P(1): Atípica	P(1): ND	Huang <i>et al.</i> <sup>53</sup>	
		Testicular	P(1): Masculina	P(1): Testículos	Lee <i>et al.</i> <sup>54</sup>	
	Gene <i>SOX9</i> – Mutação Ativadora	Ovotesticular	P(1): Atípica	P(1): Ovotestis/ Ovário	Ushijima <i>et al.</i> <sup>50</sup>	
		Testicular	P(1): Masculina	P(1): Testículos	Cox <i>et al.</i> <sup>55</sup>	
		Testicular	P(1): Masculina	P(1): Testículos	Vetro <i>et al.</i> <sup>56</sup>	
		Testicular	P(1): Masculina	P(1): ND	Vetro <i>et al.</i> <sup>57</sup>	
		Ovotesticular	P(2): Atípica	P(2): ovotestis bilateral		
		Testicular	P(3): Masculina	P(3): ND		
		Ovotesticular	P(1): Atípica	P(1): Ovotestis /Testículos	Kim <i>et al.</i> <sup>58</sup>	
		Testicular	Atípica	Testículo	Refai <i>et al.</i> <sup>59</sup>	
		Região regulatória do gene <i>SOX9</i> - Duplicado / Triplicado	Ovotesticular	P(1): Atípica	P(1): ND	Benko <i>et al.</i> <sup>60</sup>
			Ovotesticular	P(2): Atípica	P(2): testículo /ovário	
	Ovotesticular		P(3): Atípica	P(3): ovotestis/ gônada disgenética		
	Testicular		P(1): ND	P(1): testículos bilaterais	Croft <i>et al.</i> <sup>51</sup>	
	Ovotesticular		P(2):ND	P(2): ovotestis		
	Testicular		P(1): Masculina	P(1): testículos disgenéticos	Hyon <i>et al.</i> <sup>61</sup>	
	Testicular		P(2): Masculina	P(2): testículos disgenéticos		
Testicular	P(3): Masculina	P(3): ND	López-Hernández <i>et al.</i> <sup>48</sup>			
Ovotesticular	P(1):Atípica	Ovário e ovotestis				
Ovotesticular		P: Masculina	P: GD ND/ GE: ovotestis	Shankara <i>et al.</i> <sup>62</sup>		
Testicular		P(1): Hipospadia	P(1): ND	Xiao <i>et al.</i> <sup>49</sup>		
Ovotesticular		P(1): Atípica	P(1): Testículo/Ovário	Mengen <i>et al.</i> <sup>47</sup>		

continua

conclusão

Patogênese proposta	Achado genético	Diagnóstico de DDS 46,XX	Genitália Externa	Gônadas	Referência
Expressão aumentada SOX3	Gene <i>SOX3</i> - Duplicação	Testicular	P(1): Masculina P(2): Masculina P(3): Masculina	P(1): ND P(2): ND P(3): ND	Sutton <i>et al.</i> <sup>65</sup>
		Testicular	P(1): Masculina	P(1): ND	Vetro <i>et al.</i> <sup>57</sup>
	Região regulatória do gene <i>SOX3</i> - Rearranjos	Ovotesticular	P(1): Atípica	P(1): Ovotestis	Grinspon <i>et al.</i> <sup>64</sup>
		Testicular	P(1): Atípica	P(1): ND	Moalem <i>et al.</i> <sup>71</sup>
		Ovotesticular	P(1): Atípica	P(1): Ovotestis	de Oliveira <i>et al.</i> <sup>72</sup>
		Testicular	P(1): Masculina	P(1): Testículos disgenéticos	Vetro <i>et al.</i> <sup>57</sup>
		Testicular	P(1): Atípica	P(1): Testículos	Mizuno <i>et al.</i> <sup>66</sup>
Ovotesticular	P(1): Atípica	P(1): Testículo/ Ovário	Haines <i>et al.</i> <sup>67</sup>		
Expressão aumentada do <i>SOX10</i>	Cromossomo 22 - Duplicação	Ovotesticular	P(1): Atípica	P(1): Testículo/ Ovário	Aleck <i>et al.</i> <sup>73</sup>
		Testicular	P(1): Masculina	P(1): ND	Seeherunvong <i>et al.</i> <sup>68</sup>
	Cromossomo 22 - Trissomia	Testicular	P(1): Atípica	P(1): Testículos disgenéticos	Nicholl <i>et al.</i> <sup>70</sup>
Expressão reduzida do <i>WNT4</i>	Gene <i>WNT4</i> - Mutação inativadora	NC	P(1): Atípica (Síndrome de SERKAL)	P(1): Testículo disgenético/Ovotestis	Mandel <i>et al.</i> <sup>78</sup>
Expressão reduzida do <i>RSPO1</i>	Gene <i>RSPO1</i> - Deleção	Testicular	P(1): Atípica, ceratose palmo-plantar	P(1): ND	Parma <i>et al.</i> <sup>74</sup>
		Testicular	P(1): Atípica, ceratose palmo-plantar	P(1): ND	Parma <i>et al.</i> <sup>74</sup>
	Gene <i>RSPO1</i> - Mutação inativadora	Ovotesticular	P(1): Atípica	P(1): Ovotestis	Tomaselli <i>et al.</i> <sup>75</sup>
		Testicular	P(1): Atípica	P(1): ND	Tallapaka <i>et al.</i> <sup>77</sup>
		P(1): Testicular P(2): Ovotesticular	P(1): Atípica P(2): Atípica	P(1): testículos disgenéticos P(2): ND	Naasse <i>et al.</i> <sup>76</sup>

NC- Não classificado; ND- Não descrito; P- Paciente. (Fonte: adaptada de Grinspon *et al.*<sup>79</sup>).

Uma variante única e recorrente em vários pacientes DDS 46, XX OT no gene *NR5A1* (c.C274T, p.Arg92Trp), em estado de heterozigose, foi inicialmente descrita<sup>80-84</sup>. Posteriormente, outra variante foi identificada no mesmo códon, apenas com a troca do aminoácido (c.G275A, p.Arg92Gln)<sup>85</sup>. E, mais recentemente, foi identificada em uma coorte de 26 pacientes DSD 46,XX OT uma variante rara (c.C779T, p.Ala260Val) no éxon 4 do *NR5A1* em um único paciente<sup>86</sup>. O mecanismo exato pelo qual estas variantes ativam o desenvolvimento testicular em portadores DDS 46,XX OT mantém-se elusivo. Sugere-se que estas variantes no *NR5A1* reduzam a inibição da expressão dos genes da via masculina, como o *SOX9* e o *HAM*<sup>81,82</sup>, ao causarem uma ruptura nos sinais específicos do desenvolvimento ovariano, principalmente na via *WNT/β-catenina*, a qual normalmente suprime a expressão de genes testiculares<sup>85,86</sup>.

O gene *WT1* exerce um papel essencial no desenvolvimento normal do sistema urogenital<sup>87</sup>. Classicamente, as variantes patogênicas estão associadas a testículos disgenéticos causando diferentes fenótipos de DDS 46,XY<sup>88</sup>. Estudos recentes descreveram variantes alélicas no *WT1*, localizadas no éxon 10 ou em local de *splicing*, com retenção do intron 9. Todas estas mutações acometem de uma região altamente conservada do *WT1*, o quarto dedo de zinco. Estas variantes foram associadas ao desenvolvimento de tecido testicular em indivíduos DDS 46,XX T/OT *SRY*-negativo<sup>89-91</sup>. A formação testicular pode ser devido a interação inapropriada entre a proteína mutada e o principal determinante ovariano, a *β-catenina*. Em adição, autores demonstraram que mutação no éxon 10 aumenta a expressão de genes *SOX9*, *NR5A1* e *DMRT1* (*Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1*), envolvidos na formação das células de Sertoli<sup>90,92</sup>.

Deste modo, mutações em genes que participam de etapas comuns ao desenvolvimento gonadal masculino e feminino, como *WT1* e *NR5A1*, têm sido associados à etiologia dessas condições e estimulado a investigação de outras vias sinalizadoras ainda não avaliadas (Quadro 4).

**Quadro 4 - Variantes alélicas nos genes *NR5A1* e *WT1*, causadoras do fenótipo DDS 46,XX ovotesticular e testicular**

Gene	Achado genético	Diagnóstico de DDS 46, XX	Genitália Extern	Gônadas	Referência
<i>NR5A1</i>	p.Arg92Trp	Testicular Ovotesticular	P(1): Atípica F(1; n=2): Atípica	P(1): Testículos bilaterais F(1; n=2): Ovotestis bilateral	Domenice <i>et al.</i> <sup>80</sup>
	p.Arg92Trp	Testicular Testicular Testicular	F(2; n=1): Masculina com micropênis F(3; n=1): Masculina com micropênis F(4; n=1): Masculina com hipospadia	F(2; n=1): ND F(3; n=1): ND F(4; n=1): Testículos disgenéticos bilaterais	Bashamboo <i>et al.</i> <sup>81</sup>
	p.Arg92Trp	Ovotesticular Testicular	P(1): Atípica P(2): Masculina	P(1): Testículo/ ovotestis P(2): Testículos bilaterais	Igarashi <i>et al.</i> <sup>82</sup>
	p.Arg92Trp	NC Testicular	P(1): Atípica P(1): Feminina com clitoromegalia	ND P(1): Testículo/ tecido fibroso	Takasawa <i>et al.</i> <sup>83</sup>
	p.Arg92Trp	Ovotesticular Testicular	P(2): Atípica P(3): Masculina	P(2): Ovotestis bilateral P(3): Testículos bilaterais	Baetens <i>et al.</i> <sup>84</sup>
	p.Arg92Gln	Ovotesticular	P(1): Atípica	P(1): Ovotestis bilateral	Swartz <i>et al.</i> <sup>85</sup>
	p.Arg92Trp	Testicular	P(1): Masculina com criptorquidia	P(1): ND	
	p.Arg92Trp	Ovotesticular	P(2): Atípica	P(2): Ovotestis bilateral	Knarston <i>et al.</i> <sup>86</sup>
	p.Arg92Trp	Testicular	P(3): Atípica	P(3): ND	
	p.Ala260Val	Ovotesticular	P(4): Atípica	P(4): Ovotestis/ ovário	
<i>WT1</i>	p.Arg485Glyfs*14	Testicular	P(1): Atípica	P(1): Testículos bilaterais	Gomes <i>et al.</i> <sup>89</sup>
	p. Arg495Gly	Testicular	P(1): Atípica	P(1): Testículos disgenéticos bilaterais	
	p.Pro481Leufs*15	Testicular	P(2): Atípica	P(2): Testículos disgenéticos bilaterais	
	p.Arg495Gln	Testicular	P(3): Atípica	P(3): Testículos disgenéticos bilaterais	Eozenou <i>et al.</i> <sup>90</sup>
	p.Arg495Gln	Ovotesticular	P(4): Atípica	P(4): Ovotestis bilateral	
	p.Arg495Gln	Ovotesticular	P(5): Atípica	P(5): Ovotestis bilateral	
	p.Ser478Thrfs*17	Ovotesticular	P(6): Atípica	P(6): ND	
	p.Lys491Glu	Testicular	P(7): Masculina	P(7): Testículos bilaterais	
	c.1437 A>G	Testicular/Ovotesticular	P(1): Atípica	ND	Sirokha <i>et al.</i> <sup>91</sup>
	p.Arg495Gln	Testicular	P(1): Atípica	P(1): Testículos bilaterais	Kirino <i>et al.</i> <sup>92</sup>

ND- Não descrito; P- Paciente; F, Família.

## 1.5 DIAGNÓSTICO DOS DISTÚRBIOS/DIFERENÇAS DO DESENVOLVIMENTO DO SEXO TESTICULAR E OVOTESTICULAR

O diagnóstico dos distúrbios/diferenças do desenvolvimento do sexo é complexo e laborioso; envolve a combinação de achados fenotípicos, dosagens hormonais, estudos de imagem, achados histológicos, citogenética clássica e tecnologias de análise molecular.

Tradicionalmente, o diagnóstico e classificação dos DDSs são baseados na análise cromossômica. A realização da cariotipagem convencional é o exame inicial e de referência na identificação dos cromossomos sexuais na maioria dos centros e permite a classificação do DDS de acordo com o consenso de 2006<sup>17,93,94</sup>. A utilização da cariotipagem com bandamento G permite a identificação de anormalidades estruturais como grandes deleções, inserções, translocações e outras formas complexas de rearranjos genômicos observadas especialmente em pacientes DDS com quadros sindrômicos<sup>94,95</sup>.

Para o estudo de alterações submicroscópicas não identificáveis no cariótipo convencional foram desenvolvidas técnicas de citogenética molecular, como a *FISH* (*Fluorescent In Situ Hybridization*) e a técnica de *MLPA* (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). A técnica de *FISH* baseia-se no uso de sequências de DNA ligadas a fluorocromos que, por sua vez, se ligam a sequências do DNA que lhe são complementares<sup>96</sup>. A pesquisa do gene *SRY* por técnica de *FISH* em pacientes com DDS 46,XX T/OT é uma ferramenta diagnóstica importante e utilizada na prática clínica<sup>44,97</sup>. A técnica de *MLPA* baseia-se na hibridação simultânea e amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) de várias sondas diferentes em uma única reação, tornando-se uma alternativa mais rápida e econômica de estudo para a detecção de deleções e/ou duplicações<sup>98</sup>. *Kits* comerciais desenvolvidos para o estudo de genes envolvidos em anormalidades do desenvolvimento sexual (*NR5A1*, *SRY*, *WNT4*, *DMRT1*, *SRD5A2*, *HSD3B2*, entre outros) estão disponíveis, o que possibilita a avaliação de pacientes com DDS por esta técnica<sup>99</sup>. No entanto, ambos os métodos (*FISH* e *MLPA*) investigam um número limitado e determinado de regiões do genoma, de forma que é necessária uma suspeita clínica para direcionar a pesquisa de uma região específica. Nos casos em que o fenótipo clínico ou hormonal não sugere um gene ou região cromossômica acometida, essas técnicas se tornam pouco eficientes.

As técnicas de *arrays*, seja *array-CGH* (*Comparative Genomic Hybridization*) ou *SNP-array* (*Single Nucleotide Polymorphism*), também conhecidas como “cariotipagem molecular”, têm sido aplicadas na pesquisa de alterações submicroscópicas no genoma de pacientes com DDS<sup>100</sup>. Essas técnicas permitem a rápida pesquisa de microduplicações ou microdeleções, o



que possibilita a identificação de variação no número de cópias genômicas (*CNV, copy number variation*). Um número de genes chaves nas vias de desenvolvimento gonadal apresentam efeitos dose-dependente. Duplicações do *SOX3* são causas reconhecidas de 46,XX DSD OT/T<sup>48,63,64,71</sup>. Em adição, vários casos de DDS 46,XX OT/T foram associados a *CNVs* na região regulatória do *SOX9*<sup>47,48,51</sup>. Contudo, esta técnica não é adequada para identificar rearranjos cromossômicos balanceados, como translocações ou inversões, sem perda ou ganho de material genético<sup>101</sup>.

O sequenciamento convencional por Sanger também é útil na pesquisa diagnóstica do DDS, especialmente se os achados clínicos e os testes bioquímicos sugerem um defeito específico e um gene candidato para o estudo. No entanto, quando a causa potencial do DDS não é evidente, o diagnóstico molecular específico será obtido em cerca de 20% dos casos, tornando o diagnóstico por sequenciamento por Sanger demorado, dispendioso e pouco efetivo<sup>102</sup>.

Recentemente, as técnicas de sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE) emergiram como uma ferramenta importante para a identificação da etiologia molecular. O SPLE é essencialmente um método de identificação de variantes do DNA, com a capacidade de detectar tanto substituições de pares de bases quanto pequenas inserções e deleções envolvendo poucas bases nucleotídicas pela análise de milhares de nucleotídeos simultaneamente, gerando mais dados em menor tempo<sup>102,103</sup>.

As três metodologias mais comuns de SPLE são: painel de genes, sequenciamento exômico e sequenciamento genômico. Estudos que utilizaram painéis de genes demonstraram resultados promissores na obtenção do diagnóstico em indivíduos com DDS 46,XY<sup>103-105</sup>. No entanto, esses resultados positivos não foram reproduzidos nas coortes de pacientes com DDS 46,XX por anormalidades do desenvolvimento gonadal *SRY*-negativo estudados por painel de genes<sup>106-108</sup>.

Os métodos de sequenciamento exômico e genômico, que permitem avaliar todo o exoma ou todo o genoma, respectivamente, proporcionam uma varredura genética mais extensa. Estas tecnologias aumentam a eficiência do diagnóstico de doenças, cuja etiologia genética já é conhecida e, também, possibilitam a identificação de novos genes candidatos à gênese dos DDSs.

Nos pacientes portadores de DDS 46,XX por anormalidades do desenvolvimento gonadal, o acurado diagnóstico é fundamental para prover o correto aconselhamento genético, além de permitir o manejo clínico eficiente a longo prazo. Entretanto, as causas genéticas dos DDS 46, XX T/OT *SRY*-negativo não são completamente compreendidas e, para muitos pacientes com estas condições, o diagnóstico molecular não é obtido.

A despeito das reduzidas taxas de sucesso no diagnóstico molecular de indivíduos DDS 46,XX por anormalidades do desenvolvimento gonadal *SRY*-negativo com as técnicas atualmente disponíveis, os trabalhos que utilizaram o sequenciamento exômico como metodologia de estudo, possibilitaram identificar variantes patogênicas nos genes *NR5A1* e *WT1*, até então não considerados causadores de DDS 46,XX T/OT<sup>52,81,85,89-91,109</sup>. Adicionalmente, em uma coorte de 69 pacientes com virilização da genitália, Bashamboo *et al.*<sup>110</sup> utilizando a metodologia de SPLE identificaram variantes alélicas do tipo *frameshift*, em heterozigose no receptor nuclear *NR2F2* (*Nuclear Receptor subfamily 2, group F, member 2*) em um subgrupo de portadores de DSD 46,XX T/OT com cardiopatia e/ou outras anomalias congênitas. Este gene não havia sido reconhecido como participante das vias de formação das gônadas até o citado estudo.

Deste modo, o sequenciamento exômico tem se mostrado uma ferramenta muito útil na descoberta de novos genes associados aos DDS, permitindo um melhor entendimento das vias relacionadas à formação gonadal.

## 1.6 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A despeito dos avanços das tecnologias disponíveis para realização de uma investigação diagnóstica acurada, a etiologia genética dos pacientes portadores de DDS 46,XX testicular/ovotesticular, *SRY*-negativo é esclarecida em uma minoria dos pacientes.

Estabelecer um diagnóstico preciso e precoce em pacientes portadores de DDS é importante, pois permite a realização de um tratamento individualizado, de forma a oferecer para o indivíduo afetado e sua família informações seguras quanto a trajetória clínica, a qualidade de vida, expectativa de fertilidade, e ao risco de tumorigênese; além de prover um aconselhamento genético familiar adequado. Todas essas informações são muito relevantes para os pais durante o processo de escolha do sexo de registro de recém-nascidos com atipia genital, o que reforça a necessidade da busca de métodos de investigação que promovam maior efetividade e rapidez no diagnóstico genético dos DDS e em particular nos DDS 46,XX testicular/ovotesticular, *SRY* negativo.

A identificação de novos genes candidatos pode contribuir para o avanço no entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento gonadal humano, bem como nas peculiaridades das interações gênicas determinantes das vias gonadais masculinas e femininas.

## **2 OBJETIVOS**

## 2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Estabelecer o diagnóstico genético de uma coorte de pacientes portadores de DDS 46,XX T/OT *SRY* negativo.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o papel do sequenciamento exômico no diagnóstico de pacientes de 46,XX DDS testicular/ovotesticular *SRY* negativo.

Identificar novos genes candidatos à etiologia dos DDS 46,XX T/OT.

## **3 MÉTODOS**

### 3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos contidos na declaração de Helsinki e pelas orientações descritas pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. O protocolo do estudo (CAAE: 17787719.1.0000.0068) foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de acordo com o parecer 3.555.845. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os pacientes/seus responsáveis legais e dos familiares incluídos para estudo de segregação das variantes encontradas (Anexo A). A confidencialidade dos resultados obtidos é garantida a todos os pacientes.

### 3.2 PACIENTES

Pacientes com diagnóstico de DDS 46,XX T/OT sem etiologia molecular conhecida acompanhados no ambulatório de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) foram convidados a participar desta pesquisa. Dois pacientes oriundos de serviços externos (Hospital Clínico da Universidad de Chile, Santiago/Chile e Santa Casa de Belo Horizonte, Minas Gerais) foram adicionados ao grupo original.

#### 3.2.1 Critérios de inclusão

Vinte e quatro pacientes aceitaram participar da pesquisa e todos os pacientes/pais ou responsáveis legais assinaram o TCLE. Os pacientes incluídos no estudo eram oriundos de 23 famílias. Todos os pacientes avaliados, exceto dois irmãos portadores de DDSOT, eram casos esporádicos. O diagnóstico histológico de DDS OT foi estabelecido em 22 pacientes, e dois pacientes tinham o diagnóstico presumido de DDS T, com atipia genital. Não foram incluídos pacientes que apresentavam estigmas clínicos ou outras patologias associadas que pudessem classificá-los como portadores de condições sindrômicas.

Todos os pacientes apresentavam cariótipo 46,XX (mínimo de 30 células analisadas) e em nenhum deles o diagnóstico molecular foi estabelecido nos estudos previamente realizados. Na análise molecular prévia foi pesquisada e excluída a presença do gene *SRY*, realizada por reação de polimerase em cadeia (PCR), em amostras de DNA extraído de leucócitos de sangue

periférico de todos os pacientes. Um subgrupo dos pacientes foi avaliado quanto a presença de variação do número de cópias gênicas pelas técnicas de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (kit comercial *Intersex P185*) e/ou *array-CGH*, com utilização de kits comerciais para microarranjo genômico 180K, contendo 180.000 sondas distribuídas pelo genoma humano (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA*). Estas análises prévias excluíram a presença de deleções e/ou duplicações de genes/regiões cromossômicas reconhecidamente envolvidas ou candidatas ao processo de desenvolvimento gonadal (Anexo B).

O DNA dos genitores e outros familiares do propósito, quando disponível, foi incluído para análise conjunta no estudo por sequenciamento exômico, totalizando 5 trios (afetado com ambos os genitores); 5 índices com a genitora; e uma família com dois irmãos afetados, a genitora e o irmão não afetados. Os demais pacientes foram estudados isoladamente.

### 3.2.2 Critérios de exclusão

Pacientes sem diagnóstico histológico de DDS 46,XX OT ou que apresentavam cariótipos diferentes de 46,XX foram excluídos do estudo.

## 3.3 MÉTODOS

### 3.3.1 Extração e armazenamento do DNA genômico

As amostras de DNA dos pacientes e seus familiares foram obtidas a partir de leucócitos do sangue periférico. O DNA foi extraído e armazenado de acordo com procedimento padronizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ LIM 42 da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com base no método de Miller *et al.*<sup>111</sup>. Todas as amostras foram anonimizadas e catalogadas, para posterior armazenamento a -20° C no Biobanco do mesmo Laboratório descrito acima até a utilização (Anexos C e D).

### 3.3.2 Sequenciamento paralelo em larga escala

O sequenciamento paralelo em larga escala compreende três etapas principais: (1) o preparo das bibliotecas, (2) a amplificação clonal e (3) o sequenciamento propriamente, seguido por processos de bioinformática, que tratam do armazenamento, manipulação e análise dos dados gerados.

### 3.3.2.1 Preparo das bibliotecas

O preparo das bibliotecas dos exomas foi realizado de acordo com o protocolo *SureSelectXT Target Enrichment System for Illumina Paired-End Sequencing Library*, com utilização de kits comerciais *SureSelect XT Human All Exon V6* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

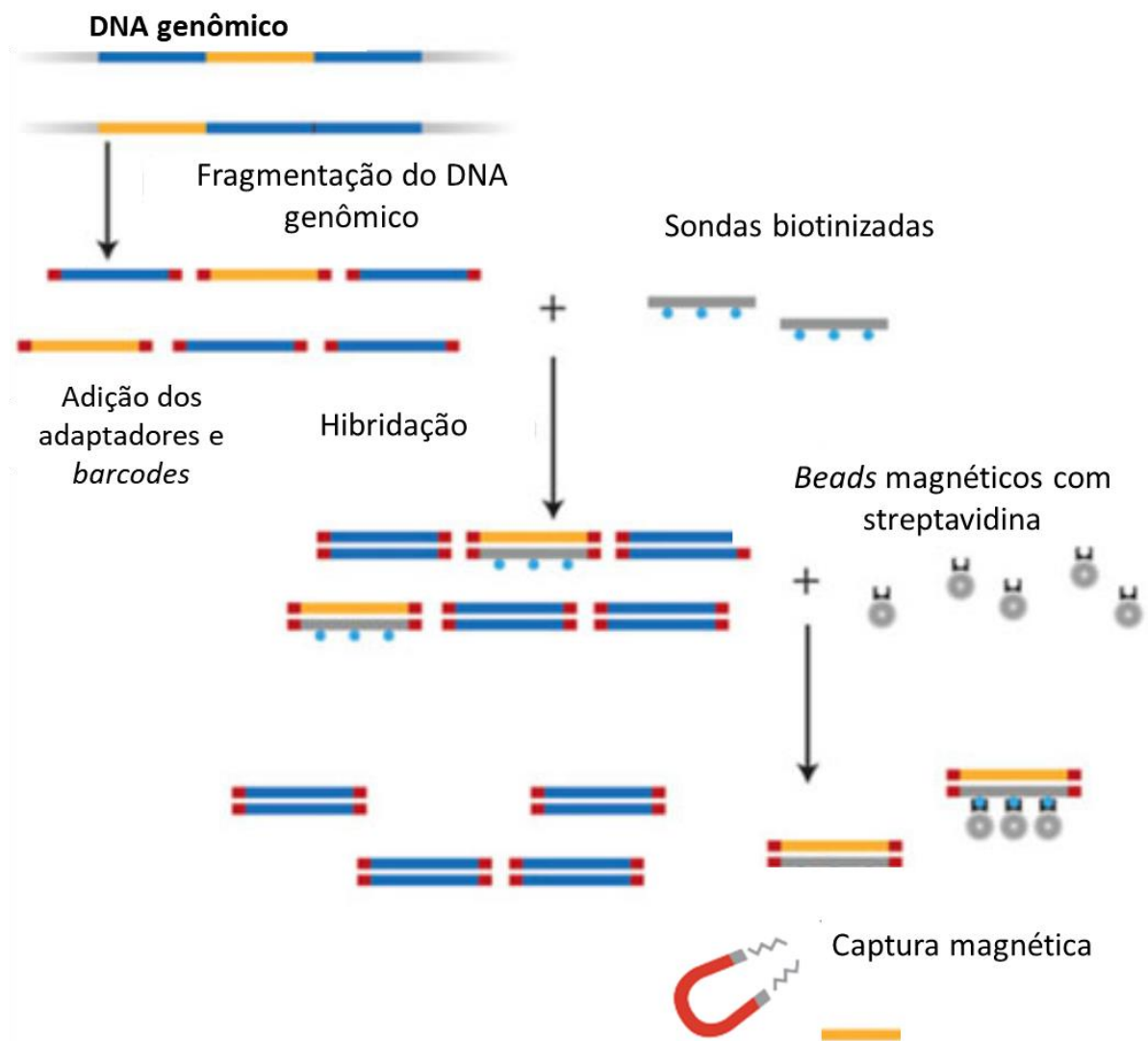
Neste preparo, alíquotas de 200ng de DNA genômico foram fragmentadas por ação mecânica, ultrassonicação centrada, no equipamento *Covaris* (*Covaris Inc, Woburn, MA, EUA*), gerando fragmentos de tamanhos entre 150 e 550 pb.

A seguir, adaptadores, que são sequências complementares às sequências de oligonucleotídeos presentes na *flow-cell*, foram adicionados às extremidades dos fragmentos de DNA. Após, foram adicionados os *barcodes* (códigos de identificação específicos para o DNA de cada participante). Os fragmentos ligados aos adaptadores foram amplificados em uma reação em PCR.

Posteriormente, sondas biotinizadas foram acrescentadas as bibliotecas. Estas sondas hibridizam ao DNA fragmentado nas regiões de interesse, sendo específicas para as regiões exômicas. Uma captura das regiões de interesse através de *beads* magnéticos acoplados a estreptavidina foi realizada. Os fragmentos capturados pela biotina-estreptavidina foram purificados, antes de serem amplificados (Figura 2).



Figura 2 - Fluxo de preparo das bibliotecas para sequenciamento exômico



### 3.3.2.2 Amplificação clonal

Nesta etapa, as bibliotecas, com os seus fragmentos de DNA ligados aos adaptadores, foram depositadas em uma lâmina especial denominada *flowcell*, em cuja superfície estão fixados, de forma paralela, dois tipos de oligonucleotídeos. Após a ligação dos adaptadores aos oligonucleotídeos complementares presentes na *flowcell* ocorre a clusterização, quando cada fragmento foi multiplicado várias vezes, através de uma reação conhecida como “PCR em ponte”. Ao término desta etapa, foram gerados clusters (clones) de moléculas de DNA idênticas à molécula original, ligadas à superfície da *flowcell*.

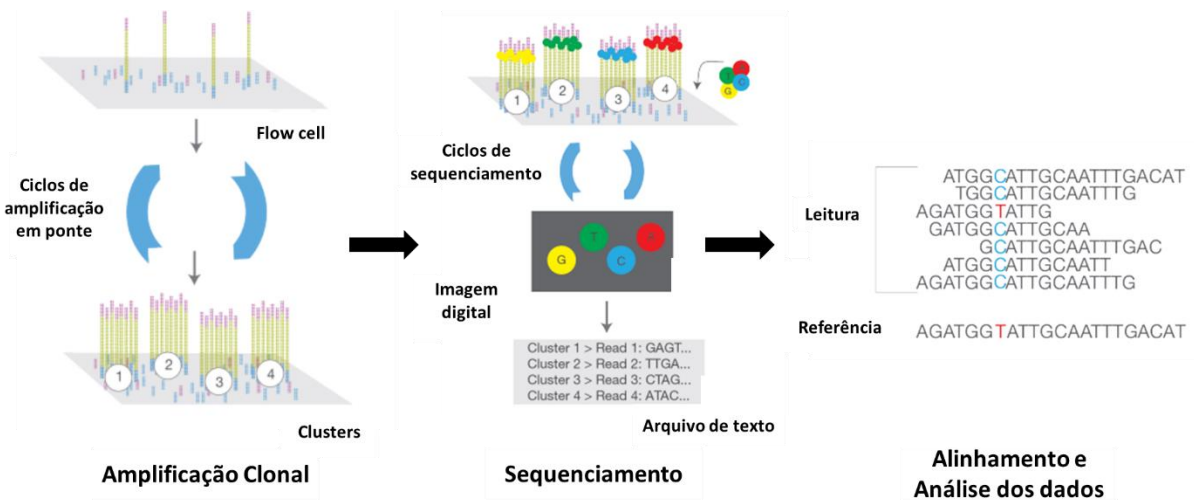
### 3.3.2.3 Sequenciamento

Após a amplificação clonal, as moléculas *antisense* foram removidas enzimaticamente e o processo de sequenciamento foi iniciado com o acoplamento de um oligonucleotídeo iniciador especial (*sequencing primer*). Em seguida, nucleotídeos modificados com terminadores marcados com fluoróforos específicos foram adicionados ao meio. Este processo é conhecido como sequenciamento por síntese A cada nova incorporação, foram geradas imagens da superfície da *flowcell* captadas por um *scanner* de fluorescência em cada um dos comprimentos de onda, específico para cada fluoróforo. Os *clusters* presentes na superfície do *flowcell* foram então identificados e mapeados. A sobreposição das imagens produzidas a cada ciclo de incorporação de cada *cluster* propiciou a identificação da sequência de bases nucleotídicas que o originou. As sequências produzidas pela plataforma possuíam de 36 a 100 pares de bases, podendo ser lidas tanto em configuração *single-end* (quando apenas a sequência *sense* do DNA é lida) quanto *paired-end* (quando a sequência *antisense* do DNA também é lida), possibilitando leituras de fragmentos de até 200 pares de bases. Finalmente, as sequências lidas foram separadas entre si de acordo com os *barcodes*, sendo então pareadas as leituras *sense* e *antisense*, formando sequências contíguas. Estas foram alinhadas para comparação com a sequência de DNA referência, de forma a permitir comparação entre o sequenciamento obtido e a sequência referência.

Em síntese, a amplificação clonal gera os *clusters* através das PCR em ponte. O sequenciamento é realizado pela adição de nucleotídeos que emitem sinais luminosos que são captados e escaneados, gerando o arquivo *\*fastq* (Figura 3).

As etapas de amplificação clonal e do sequenciamento propriamente ditas foram realizadas em sequenciadores da plataforma *Illumina*: (1)- *Illumina HiSeq 2500* (*Illumina Inc, San Diego, CA, EUA*) do Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) da Rede PREMium, localizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e (2)- *Illumina NovaSeq 6000* (*Illumina Inc, San Diego, CA, EUA*) do Laboratório Fleury S.A. Os kits utilizados para a realização do sequenciamento foram *HiSeq SBS kit V4 2x 125 ciclos* e *Rapid SBS Kit v2 (2x 100 ciclos)* (ambos *Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA*) no SELA e *Twist Exome 2.0* (*Twist Bioscience, San Francisco, CA, EUA*) no Fleury.

**Figura 3 - Visão geral das etapas de amplificação clonal e sequenciamento na superfície da *flowcell*. As sequências geradas são alinhadas a uma sequência referência**



### 3.3.3 Análise por Bioinformática

A análise de bioinformática foi realizada em colaboração com o Dr. Antônio M. Lerário (SELA e *Michigan University*) e com o Dr. Lucas Santos Santana (SELA), a partir dos arquivos gerados no processo de sequenciamento anteriormente descrito.

A volumosa quantidade de dados gerados pelos sequenciadores de nova geração requer o emprego de ferramentas de bioinformática sofisticadas, capazes de detectar as poucas alterações genômicas de interesse em meio a milhares alterações não relacionadas à condição em estudo. Esta análise utiliza diversos programas de informática que trabalham sucessivamente. Uma biblioteca de exoma gera tipicamente 50 a 100 milhões de sequências de 100 a 150 pares de base, armazenadas de forma aleatória em dois arquivos *fastq\** (*formad* e *reverse \_* para a configuração *paired-end*). Além da sequência exata de cada fragmento, os arquivos *fastq\** também armazenam os dados sobre *scores* de qualidade para cada uma das bases de determinada sequência e a unidade de leitura do sequenciador que originou aquele fragmento.

A partir dos dados brutos gerados pelo sequenciador e armazenados nos arquivos *fastq\**, a análise de bioinformática seguiu as etapas descritas:

- 1) Checagem da consistência dos arquivos *fastq\** e cálculo de estatísticas básicas como número de sequências produzidas. Nesta etapa, empregou-se o *software FastQC*.

- 2) As sequências lidas foram separadas entre si de acordo com seus *barcodes*, sendo então pareadas as sequências *sense* e *antisense*, criando sequências contíguas. Estas foram alinhadas para comparação com a sequência de DNA referência, de modo a permitir comparação entre o sequenciamento obtido e a referência. A sequência referência do genoma humano utilizada foi *hg19* UCSC ou b37 GRC/NCBI e o alinhamento foi realizado pelo *software BWA* ([www.bio-baw.sourceforge.net](http://www.bio-baw.sourceforge.net)), formando o arquivo \*.bam.
- 3) Nos arquivos \*.bam as sequências foram ordenadas de acordo com as ordenadas genômicas e as cópias idênticas de determinadas sequências de uma biblioteca (duplicatas) foram marcadas para posteriormente serem quantificadas e desconsideradas nas próximas análises. Assim, os arquivos \*.bam ficaram prontos para os diversos tipos de leitura descritos posteriormente.
- 4) Para o controle de qualidade dos arquivos \*.bam, além da marcação das sequências duplicadas, foi feita uma análise quantitativa de alguns parâmetros para indicar a qualidade e quantidade de sequências obtidas em uma biblioteca. Estes parâmetros englobam a qualidade global das sequências, taxa de erro, número de sequências não mapeadas e cobertura média das regiões alvo do exoma. Esta varredura foi feita pelo *software Qualimap2* (<http://qualimap.conesalab.org>).
- 5) Pesquisa das variantes alélicas. Nesta etapa é feita a chamada de variantes, realizadas pelo *software Freebays* (<https://www.msi.umn.edu/sw/freebayes>), que identifica as variantes de um único nucleotídeo (*SNVs*) e pequenas deleções e inserções (*indels*), gerando um arquivo de texto no formato *Variant Call Format* (\*.vcf). A última etapa antes da análise consistiu na anotação das variantes, feita pelo *software Annovar* (<https://annovar.openbioinformatics.org>), que gerou uma planilha com as variantes identificadas bem como com as informações de diversos bancos públicos de dados de frequência populacionais, além de algoritmos de predição de patogenicidade *in silico*.

### 3.3.4 Seleção e classificação das variantes de ponto ou *indels* candidatas

Diante da quantidade de informações geradas pelo sequenciamento completo do exoma, as alterações genéticas de interesse devem ser filtradas em meio a milhares ou centenas de polimorfismos existentes e outros achados não relacionados ao fenótipo em estudo. Todas as etapas realizadas estão descritas abaixo e representadas esquematicamente no fluxograma a seguir (Figura 4).

Nesta etapa, foi utilizado um conjunto de ferramentas com objetivo de gerar uma lista limitada de variantes potencialmente relacionadas ao fenótipo dos pacientes para que, se possível, identificar a variante candidata associada à doença.

Os seguintes critérios foram utilizados para a priorização das variantes candidatas:

- Seleção das variantes com frequência inferior a 1% (*minor allele frequency, MAF*) nos principais bancos populacionais internacionais e nacionais: gnomAD ([www.gnomad.broadinstitute.org](http://www.gnomad.broadinstitute.org)), que é um recurso que agrega sequenciamento de 125.748 exomas de indivíduos não relacionados, com doenças diversas e como parte de estudo de genética populacional, além do 1000 *Genomes Project* (<http://www.1000genomes.org>). Em nosso meio, o Arquivo Brasileiro Online de Mutações \_ ABraOM ([www.abraom.ib.usp.br](http://www.abraom.ib.usp.br)) engloba dados obtidos a partir de sequenciamento genético de indivíduos da comunidade de São Paulo.
- Seleção das variantes com frequência alélica menor que 1% em um banco de dados próprio do Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala – SELA, o qual conta, até o momento, com mais de 1800 indivíduos sequenciados por exoma, dentre portadores de diversas afecções e seus aparentados.
- Seleção das variantes localizadas nos éxons e sítios de *splicing*.
- Avaliação das variantes em relação ao efeito sobre a proteína. Foram selecionadas as variantes alélicas que causam perda de função da proteína (*stopgain, stoploss, frameshift*).
- Seleção das variantes com predição de alteração de *splicing* pelo *dbscSNV*<sup>112</sup> (*ADA* ou *RF score* > 0,7), incluindo as sinônimas (Anexo E).
- Avaliação das variantes não sinônimas quanto a predição de patogenicidade pelos algoritmos de predição *in silico*: SIFT<sup>113</sup>, *PolyPhen2*<sup>114</sup>, *Mutation Taster*<sup>115</sup>, *Mutation Acessor*, FATHMM<sup>116</sup>, CADD (phred) para mutações do tipo *missense*<sup>117</sup>, além do escore de conservação do aminoácido envolvido (*GERP++*)<sup>118</sup>. No Anexo E estão descritos os critérios utilizados nestes algoritmos em conjunto com a classificação determinada por cada um deles.

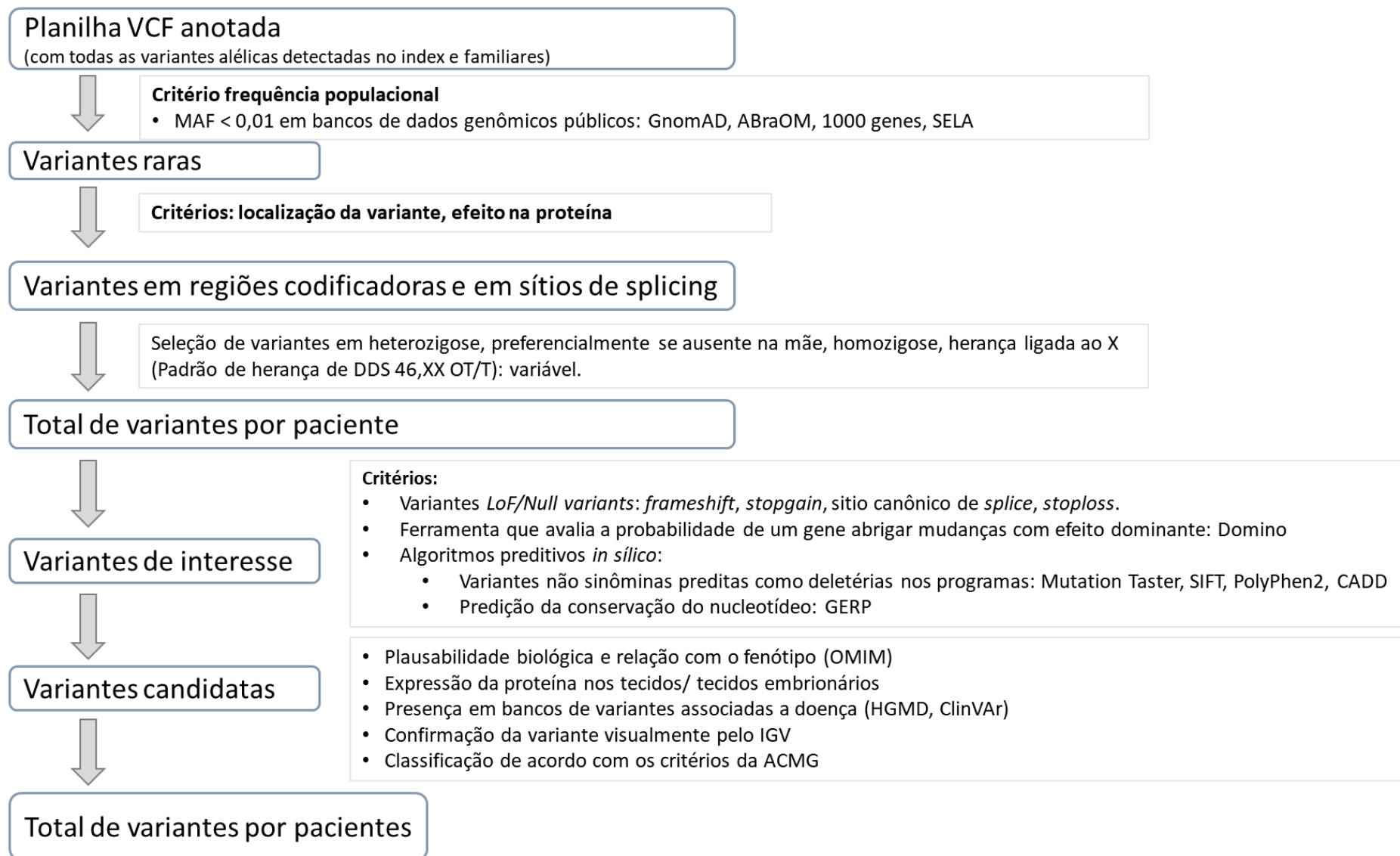
- 
- Frente ao elevado número de variantes candidatas encontradas em genes com função não totalmente conhecida, duas ferramentas de inteligência artificial para priorização dos genes candidatos foram utilizadas. A primeira, *Varelect* (<https://varelect.genecards.org>) correlaciona os genes com as doenças ou fenótipos escolhidos<sup>119</sup>. Nesta ferramenta, fornece-se os genes selecionados e a apresentação clínica em foco. Após a análise, gera-se uma lista de genes, direta ou indiretamente, relacionados ao fenótipo, cada um com uma pontuação em ordem decrescente, sendo que, quanto mais alta esta pontuação, maior probabilidade de correlação com o fenótipo em questão. A segunda, DOMINO ([www.fbm.unil.ch/domino](http://www.fbm.unil.ch/domino)), avalia a probabilidade de um determinado gene apresentar efeito dominante para a geração do fenótipo em estudo, com base em propriedades inerentes ao gene em estudo<sup>120</sup>. Após estas análises, cada variante em questão foi revista, já que as ferramentas descritas acima avaliam o gene em si e sua associação com o fenótipo, não a patogenicidade da variante alélica.
  - A expressão tecidual de cada gene foi verificada no *Human Protein Atlas*<sup>121</sup> e em publicação específica sobre expressão gênica nas gônadas e nas suprarrenais durante o desenvolvimento embrionário-fetal<sup>122</sup>.
  - As características e função cada gene foram verificadas no *GeneCards* ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)); além da pesquisa em publicações relacionadas no Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>).
  - As informações disponíveis sobre as interações proteína-proteína foram obtidas a partir do banco de dados STRING v11.5<sup>123</sup>. A rede de conectividade entre as proteínas deve ser considerada para uma compreensão completa dos fenômenos biológicos.
  - Os genes de interesse foram avaliados quanto a existência de modelos animais não humanos (OMG – organismo geneticamente modificados) com comprometimento de seu ortólogo correlato. Dados a respeito de modelos OGM foram adquiridos do *Mouse Genome Informatics Database* (MGI) (<http://www.informatics.jax.org>), um repositório de camundongos geneticamente modificados<sup>124</sup> e *International Mouse Phenotyping Consortium* (IMPC), um consórcio internacional cujo objetivo é caracterizar e entender a função de cada genes no genoma do camundongo. Em adição, foi realizada a pesquisa de descrições de outros modelos animais com fenótipos similares às alterações gonadais em estudo, com o objetivo de encontrar informações relevantes e correlatas com os genes selecionados.

Após a escolha das variantes, foi realizada a busca de descrições prévias de sua ocorrência no Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), *Human Gene Mutation Database* (HGMD) ([www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index/php](http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index/php)) e ClinVar ([www.ncbi.nih.gov/clinvar](http://www.ncbi.nih.gov/clinvar)).

As variantes selecionadas foram visualmente confirmadas no programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV) (<https://software.broadinstitute.org/software/igv>), que possibilita a conferência do sequenciamento a partir do arquivo \*.bam. Este *software* permite avaliar a adequada cobertura do sequenciamento, bem como identificar as variantes “chamadas” incorretamente por erros de alinhamento das sequências.

Finalmente, as variantes de ponto ou pequenas deleções, selecionadas como potencialmente causadoras do fenótipo, foram confirmadas nos índices e familiares pelo sequenciamento automático pelo método de Sanger<sup>125</sup>.

**Figura 4 - Algoritmo para a priorização das variantes alélicas candidatas**





### 3.3.5 Sequenciamento confirmatório pelo método de Sanger

Neste sequenciamento, oligonucleotídeos iniciadores específicos foram desenhados segundo o programa *PRIMER3* (<https://primer3.ut.ee>) e sintetizados para amplificar por PCR as regiões que flanqueiam as variantes. As amplificações foram acompanhadas de um controle negativo e os produtos amplificados foram submetidos a uma purificação enzimática com o kit *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA*).

O sequenciamento foi realizado com o kit *ABI Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA*) e os produtos gerados foram submetidos a eletroforese capilar no sequenciador automático *ABI Prism 3130xl Genetic Analyser* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA*). A leitura do eletroferograma foi feita através do programa *Sequencher 4.10.1* (*GeneCodes Corporation, Ann Arbor, MI, EUA*), sempre em paralelo a sequência de referência do gene.

### 3.3.6 Classificação das variantes alélicas candidatas

A classificação das variantes candidatas foi realizada com base nas diretrizes do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG), publicadas em 2015<sup>126</sup>. A diretriz é constituída por um conjunto de critérios oriundos de quatro campos principais de avaliação: dados populacionais, dados computacionais e preditivos, dados funcionais e análise de cosegregação. Para cada variante, em cada um destes campos, é atribuído um critério com um código e um peso pré-estabelecido. O conjunto de códigos conferidos a uma variante é, então, utilizado para classificá-la quanto a evidência de patogenicidade em um espectro qualitativo com cinco grupos: (1) patogênicas, (2) provavelmente patogênicas, (3) provavelmente benignas, (4) benignas e (5) as de significado incerto/indeterminado (*variant of uncertain/unknown significance\_ VUS*). A descrição detalhada destes critérios bem como as normas para combinação dos mesmos e classificação das variantes constam nos Anexos F e G.

## **4 RESULTADOS**

#### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES SELECIONADOS PARA O ESTUDO

A coorte selecionada para o estudo do exoma, foi composta por 22 pacientes com diagnóstico de DDS 46,XX OT, com confirmação histopatológica em tecido gonadal e dois paciente com provável diagnóstico de DDS 46,XX T com atipia genital (P6 e P18). As gônadas destes pacientes não foram abordadas para estudo histológico, entretanto ambas estavam localizadas na bolsa testicular, com aspecto ultrassonográfico de testículos. A produção de testosterona foi demonstrada nos dois pacientes, seja em amostra randômica no P6 quanto após o estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG) no P18. Ademais os pacientes não apresentam sinais de clínicos da ação estrogênica ou elevação dos níveis de estradiol sérico. Esses achados nos levaram a classificá-los como DDS 46,XX T embora não tenhamos a confirmação histológica.

Todos apresentavam pesquisa negativa para o gene *SRY* e nenhum outro diagnóstico molecular foi estabelecido nas pesquisas previamente realizadas (Anexo B). Todos os casos eram esporádicos, exceto em uma família, a qual dois irmãos (P7a e P7b) apresentavam diagnóstico de DDS 46,XX OT. Em nenhuma das famílias foi relatada a presença de consanguinidade. Nenhum dos pacientes foram considerados sindrômicos.

As características clínicas, o grau de virilização da genitália externa, baseado nos critérios de Prader<sup>127</sup> (Anexo H), os achados da genitália interna, a histologia das gônadas e evolução puberal estão descritos no Quadro 5.

**Quadro 5 - Características clínicas e gonadais dos pacientes 46, XX DSD ovotesticular/testicular**

ID	Idade na avaliação inicial (anos)	Apresentação da genitália externa	Classificação de Prader	Genitália Interna	Gônada direita		Gônada esquerda		Puberdade	Sexo social
					Localização	Histologia	Localização	Histologia		
P 1	15	Atipia genital	4	Ausência de derivados Mullerianos. RM: Vesículas seminais	Canal inguinal	Testículo	Abdominal	Ovotestis	Espontânea. Porção ovariana do OT -E ressecado	M
P 2	10	Atipia genital	4	Útero e canal vaginal	Abdominal	Ovotestis	Canal inguinal	Ovotestis	Induzida. Gonadectomia bilateral aos 12 anos	M
P 3	1	Atipia genital	3	ND	Abdominal	Ovotestis	Abdominal	Ovotestis	Induzida. Reposição androgênica	M
P 4	1	Atipia genital	2	Útero, trompas e canal vaginal	Abdominal	Ovotestis	Abdominal	Ovotestis	Espontânea com ciclos menstruais presentes. Porção testicular OT ressecada bilateralmente	F
P 5	15	Atipia genital	4	Hemiútero a direita com trompa. Epidídimo a direita	Abdominal	Ovotestis (com gonadoblastom a focal)	Escroto	Testículo	Espontânea com desenvolvimento masculino. Ginecomastia	M
P 6#	18	Atipia genital	4	Ausentes	Escroto	ND (imagem compatível com testículo ao US)	Escroto	ND (imagem compatível do testículo ao US)	Espontânea	M
P 7a*	6	Feminina com clitoromegalia	1	Útero, trompas e canal vaginal	Abdominal	Ovotestis	Abdominal	Ovotestis	Espontânea com ciclos menstruais presentes. Porção testicular OT ressecada bilateralmente	F
P 7b*	4	Atipia genital	4	Ausentes	Escroto	Ovotestis	Canal inguinal	Ovotestis	Iniciada espontaneamente aos 13 anos. Ressecção tecido feminino bilateralmente Ginecomastia	M
P 8	9	Atipia genital	4	ND	ND	Testículo	ND	Ovário	Gonadectomia Esquerda. Reposição androgênica	F → M

continua

continuação

ID	Idade na avaliação inicial (anos)	Apresentação da genitália externa	Classificação de Prader	Genitália Interna	Gônada direita		Gônada esquerda		Puberdade	Sexo social
					Localização	Histologia	Localização	Histologia		
P 9	14	Clitoromegalia, com fusão posterior e pequenos lábios hipoplásicos	2	Útero, trompas e canal vaginal	Abdominal	Ovotestis	Abdominal	Ovotestis	Induzida com reposição estrogênica aos 19 anos. Ressecção da porção testicular bilateralmente	F
P 10	1	Atipia genital	4	Útero, trompas	Inguinal	Ovotestis	Abdominal	Ovotestis	Gonadectomia Bilateral. Reposição de testosterona	M
P 11	21	Atipia genital	4	Útero rudimentar, trompas e vagina	Canal Inguinal	Ovotestis	Abdominal	Ovário	Espontânea. Ginecomastia e hematúria cíclica. Ressecção do tecido feminino bilateralmente	M
P 12	ND	Atipia genital	5	Útero rudimentar. Vagina	Canal Inguinal	Ovotestis	Canal Inguinal	Ovotestis	Espontânea. Ginecomastia e hematúria cíclica. Ressecção da porção ovariana bilateralmente	M
P 13	1	Atipia genital	2	Epidídimo à direita e trompa uterina à esquerda	Abdominal	Ovotestis	Abdominal	Ovotestis	Gonadectomia Bilateral. Reposição androgênica	M
P 14		Atipia genital	3	ND	Canal Inguinal	Ovotestis	Abdominal	Ovotestis	Gonadectomia Bilateral. Reposição androgênica	
P 15	1	Atipia genital	3	ND	Abdominal	Ovotestis	Escroto	Testículo	Início espontâneo. Ressecção de gônada D. Reposição de testosterona no seguimento	M
P 16	1	Atipia genital	3	Útero, trompas	Canal Inguinal	Ovotestis	Abdominal	Ovário	Telarca espontânea aos 13 anos	M → F

continua

conclusão

ID	Idade na avaliação inicial (anos)	Apresentação da genitália externa	Classificação de Prader	Genitália Interna	Gônada direita		Gônada esquerda		Puberdade	Sexo social
					Localização	Histologia	Localização	Histologia		
P 17	14	Micropênis, hipospadia peniana e criptorquidia a direita	5	Útero, tuba uterina e terço superior da vagina. Epidídimo a esquerda	Abdominal	Ovotestis	Escroto	Ovotestis	Espontânea. Ginecomastia e hematúria cíclica. Ressecção das gônadas bilateralmente	M
P 18#	1	Atipia genital	5	Ultrassonografia: ausentes	Escroto	ND (imagem compatível com testículo ao US)	Escroto	ND (imagem compatível com testículo ao US)	Aos 9 anos sem sinais puberais	M
P 19	1	Atipia genital	4	Útero, trompas e canal vaginal	Abdominal	Ovário	Canal Inguinal	Ovotestis	Espontânea. Telarca aos 11 anos. Menarca aos 13 anos	F
P 20	1	Atipia genital	4	ND	Abdominal	Ovotestis	Canal Inguinal	Ovotestis	Gonadectomia Bilateral. Reposição de testosterona	M
P 21	1	Atipia genital	3	Ultrassonografia: Útero	Abdominal	Ovotestis	Abdominal	Testicular	Criança com 3 anos de idade	F
P 22	3	Atipia genital	4	Útero rudimentar, trompa E	Escroto	Testículo	Canal inguinal	Ovotestis	ND	M
P 23	8	Atipia genital	4	Derivados Mullerianos ausentes	Canal Inguinal	Ovotestis	Canal Inguinal	Ovotestis	Induzida. Reposição androgênica	M

P, paciente; ID, identificação; ND, não descrito; RM, ressonância magnética; US, ultrassonografia; OT-E, ovotestis à esquerda; D, direita; E, esquerda; M, masculino; F, feminino; #, pacientes com provável diagnóstico de DDS 46,XX T; \*, irmãos portadores de DDS 46,XX OT; →, mudança de sexo social.

## 4.2 AVALIAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO EXÔMICO

Em relação às métricas de qualidade dos exomas realizados, a cobertura média variou de 21 a 281 leituras e a mediana de todas as amostras foi de 115,69. Cerca de 98,05% das regiões alvo foram cobertas mais de 10 vezes e cerca de 96,53% foram cobertas mais de 20 vezes, como descrito na Tabela 1.

**Tabela 1 - Dados da cobertura do sequenciamento paralelo em larga escala**

ID	Cobertura média (número de <i>reads</i> )	Cobertura $\geq 10x$ (%)	Cobertura $\geq 20x$ (%)
P1	134,76	98,65	97,86
P2	93,04	98,39	96,77
P3	58,69	97,46	92,63
P4	510	99,28	99,08
P5	43,05	96,14	85,19
P6	64,83	97,83	94,02
P7a	79,02	98,14	95,64
P7b	70,65	97,91	94,40
P8	70,52	97,88	94,27
P9	92,10	97,68	97,42
P10	115,82	97,68	97,48
P11	104,6	97,70	97,45
P12	115,57	97,72	97,5
P13	124,04	97,70	97,53
P14	115,82	97,68	97,48
P15	114,98	97,68	97,47
P16	96,69	97,66	97,42
P17	126,67	97,72	97,44
P18	281,73	98,89	98,38
P19	248,49	99,11	98,50
P20	261,89	98,88	98,41
P21	250,5	98,89	98,43
P22	270,04	98,96	98,55
P23	131,73	97,73	97,52

ID, identificação; P, paciente.

## 4.3 PRIORIZAÇÃO DAS VARIANTES ALÉLICAS

Cada indivíduo da coorte investigada, pacientes e familiares, apresentou em média 160.278 variantes alélicas, distribuídas entre regiões codificadoras e limites exon-intron do genoma, além de regiões 5' e 3' UTR, *downstream*, *upstream* dos genes sequenciados.

Como a hereditariedade para o 46,XX DSD OT/T não está completamente estabelecida, as filtragens das variantes alélicas foram realizadas para vários modelos de herança genética (autossômica dominante, autossômico recessivo e ligada ao X). As avaliações para variante *de novo* e heterozigose composta foram efetuadas, de acordo com a disponibilidade de material genético dos genitores.

Em 29,1% (7/24) dos pacientes investigados foi possível identificar um gene candidato à associação fenotípica causal, sendo 31,8% (7/22) dentre aqueles com diagnóstico de DDS 46,XX OT. Nenhum gene foi considerado candidato nos dois pacientes com provável DDS 46,XX T.

As características de todas as variantes alélicas candidatas (presença e frequência em bancos de dados populacionais, predição de patogenicidade, escore de conservação de nucleotídeo) assim como a classificação pelos critérios do ACMG estão apresentadas no Quadro 6.



Quadro 6 - Variantes alélicas identificadas por exoma nos pacientes DDS, 46XX T/OT

Paciente	Gene (transcrito)	Variante	Alteração proteica	Estado da variante	MAF	Polyphen2	SIFT	CADD_phred	GERP	Classificação ACMG	Critérios ACMG
1	<i>CLASP1</i> (NM_015282)	c.C3475T	p.Arg1159Cys	HTZ	0,00001	B	I	23,7	5,55	VUS	PM2, PP2, BP4
2	<i>FLNB</i> (NM_001457)	c.C2822A	p.Pro941Gln	HTZ	0	D	D	32	7,56	Provavelmente patogênica	PS2, PM2, PP3
4	<i>PRKACG</i> (NM_002732)	c.A971G	p.Asp324Gly	HTZ	0,00007	PD	D	23,7	1,18	VUS	PM2, PP3
7♦	<i>IMMP2L</i> (NM_032549)	c.397del T	p.Ser133Leufs*7	HTZ	0					VUS	PM2, PM4,
9	<i>SOX8</i> (NM_014587)	c.G152T	p.Gly51Val	HTZ	0	B	T	16,53	3,06	VUS	PM2,PP3
20	<i>SOX10</i> (NM_006941)	c.C1329A	p.Ser443Arg	HTZ	0,000004	B	D	14,92	4,09	Provavelmente patogênica	PSV2, PM2, PP2

HTZ, heterozigoto; B, benigno; I, incerto; PD, provável deletéria; D, deletéria; T, tolerável; VUS, variante de significado indeterminado. ♦ variante encontrada nos dois irmãos afetados.

#### 4.3.1 Paciente 1

Para o sequenciamento exômico foram selecionados, o indivíduo afetado (P1) e a sua genitora.

A filtragem inicial foi feita para o modelo de herança autossômico dominante. Com base nesta filtragem foram encontradas 89 variantes raras, em regiões codificadoras ou de *splicing*, presentes no paciente e ausentes na sua mãe. Destas variantes, nenhuma em gene reconhecidamente causador de DDS. No processo de priorização alélica, uma possível variante candidata à associação fenotípica, foi identificada no gene *CLASP1* (*Citoplasmic Linked-Associated Protein 1*).

O gene *CLASP1* está localizado no cromossomo 2, na região q14.3 e possui 40 éxons. O *CLASP1* é amplamente expresso em diferentes tecidos, inclusive nos testículos e ovários e é particularmente importante durante o desenvolvimento embrionário. Codifica uma proteína citoplasmática integrante da família CLASP, envolvida na dinâmica e organização dos microtúbulos. O *CLASP1* interage com os microtúbulos, sendo importante para sua estabilidade e funcionamento adequado. Ele desempenha um papel em diversos processos celulares, incluindo mitose e sinalização celular<sup>128</sup>.

É importante destacar que o gene *CLASP1* apresenta características inatas para gerar mudanças com efeito dominante no fenótipo, com base na análise feita pela ferramenta DOMINO. Trata-se um gene com pouca tolerância para variantes *missense* benignas, com *Z-score* de 3,61 (*Z-score* > 3.09), como demonstrado no gnomAD.

A variante c.C3475T (p.Arg1159Cys), do tipo *missense*, em heterozigose, é raríssima em banco de dados públicos e descrita em somente três indivíduos cujo cariótipo foi 46,XY, de acordo com o gnomAD (frequência  $1,1 \times 10^{-6}$ ). Ela foi predita como causadora de doença pelo *MutationTaster* e incerta pelo SIFT e pelo FATHMM, com um GERP de 5,55. Essa variante alélica identificada no gene *CLASP1* foi classificada pelos critérios do ACMG como VUS. (Quadro 6)

O comprometimento da função do *CLASP1* não foi associado, até o momento, à nenhuma condição humana monogênica. O OGM (camundongo) com comprometimento do gene ortólogo apresentou alterações endócrinas e reprodutivas, com destaque para a presença de morfologia testicular alterada nos estados de heterozigose, segundo informações disponíveis no *MGI Mouse Gene* e *IMPC*.

Nos modelos de filtragem para herança autossômica recessiva ou ligada ao X, nenhuma variante de interesse foi encontrada no P1.

#### 4.3.2 Paciente 2

Foram selecionados para o sequenciamento exômico, o indivíduo afetado (P2) e seus genitores. A filtragem inicial foi feita para o modelo de herança autossômico dominante. Foram encontradas 82 variantes raras, em regiões codificadores ou de *splicing*, ausentes em ambos os genitores. Destas variantes, nenhuma em gene reconhecidamente causador de DDS.

A variante c.C2822A (p.Pro941Gln), encontrada no éxon 19 do gene *FLNB* (*Filamin B*), em heterozigose, foi estudada com mais detalhes.

O gene *FLNB* está localizado no cromossomo 3, região p14.3 e contém 46 éxons. As filaminas, como o *FLNB*, são proteínas do citoesqueleto que induzem a polimerização da actina e interage com moléculas de sinalização da transdução. Este gene está implicado em quatro anomalias esqueléticas: síndrome espondilocarpotarsal (OMIM #272460), síndrome de Larsen (OMIM #150250), atelosteogênese tipo I (OMIM #108720) e atelosteogênese tipo III (OMIM #108721). Recentemente, foi descrito como provável etiologia molecular em um paciente com displasia esquelética e disgenesia gonadal 46,XY<sup>129</sup>. Destacamos que o P2 não apresentou alterações óssea até o presente estudo.

A variante identificada no *FLNB* é do tipo *missense*, não herdada de ambos os genitores (*de novo*) e ausente em banco de dados públicos. Altera um nucleotídeo conservado entre as espécies (GERP de 5,10) e foi predita ser deletéria por pelo menos três algoritmos de predição *in silico* (SIFT, *MutationTaster* e *Polyphen2*).

Essa variante alélica identificada no *FLNB* foi classificada pelos critérios do ACMG como provavelmente patogênica (Quadro 6).

Nos modelos de filtragem para herança autossômica recessiva e ligada ao X, nenhuma variante de interesse foi encontrada nesta família.

#### 4.3.3 Paciente 4

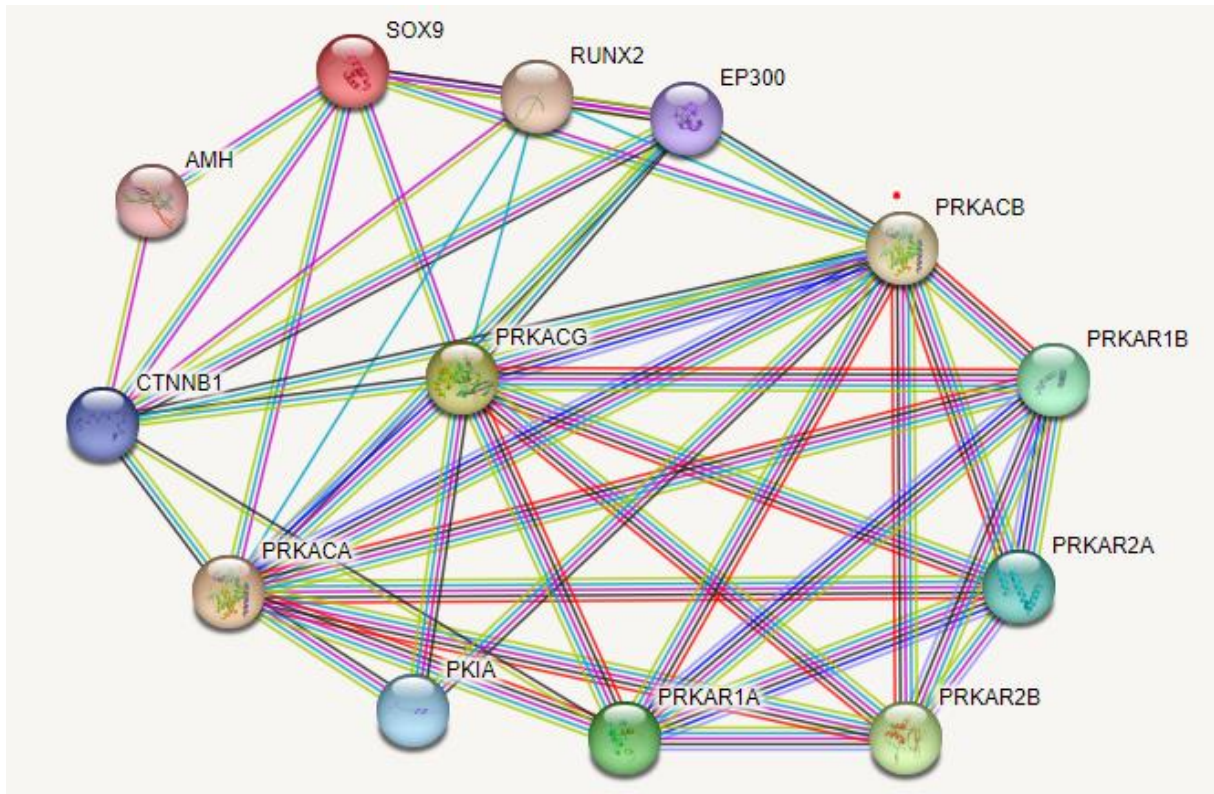
Foram selecionados para o sequenciamento exômico, o indivíduo afetado (paciente 4) e sua genitora. Na filtragem para o modelo de herança autossômico dominante, foram encontradas 112 variantes raras, em regiões codificadores ou de *splicing*, presente no afetado e ausentes na genitora. Destas variantes, nenhuma estava presente em gene reconhecidamente causador de DDS.

A variante c.A971G (p.Asp324Gly) encontrada no gene *PRKACG* (*Protein Kinase, cAMP- dependente, Catalytic, Gamma*), em heterozigose, foi motivo de detalhamento de estudo.

O *PRKACG*, localizado no cromossomo 9, na região q21.11, possui apenas um éxon, classificado como um gene *introlless* e considerado um *retrotransposon* derivado da forma alfa do *PRKAC* (*PRKACA, Protein Kinase, cAMP- dependente, Catalytic, Alfa*). A proteína *PRKACG* apresenta expressão testicular destacada e única, segundo dados do *Getex* e do *Human Atlas Protein*. Adicionalmente, estudo demonstrou a expressão do *PRKACG* em células germinativas testiculares<sup>130</sup>. A análise das propriedades gênicas intrínsecas através do algoritmo DOMINO evidenciou *score* compatível para o *PRKACG* gerar mudanças com efeito dominante para o fenótipo.

O *PRKACG* foi previamente reportado como um gene potencialmente envolvido nos mecanismos etiológicos dos DDS (disgenesia gonadal 46,XY), devido a sua singular expressão tecidual e a reconhecida interação do SOX9 com o *PRKACG*<sup>131</sup>, como ilustrado na Figura 5. Baseado na homologia entre os nucleotídeos, uma estreita relação evolutiva entre as formas alfa e gama do *PRKAC* pode ser prevista.

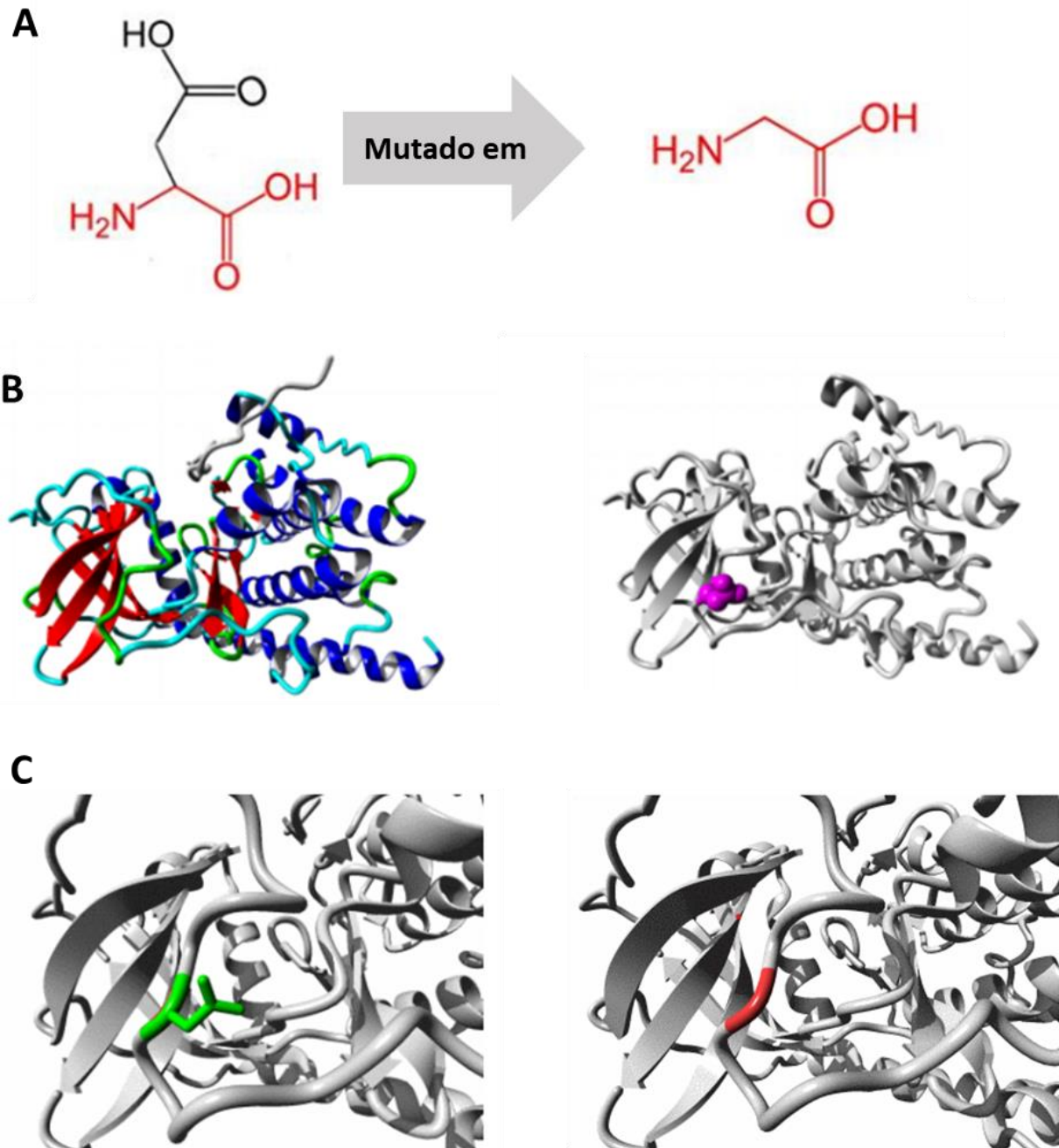
**Figura 5 - Interações entre as proteínas SOX9, PRKACA e PRKACG com base em pesquisa no banco de dados STRING (Szklarczyk *et al.*<sup>132</sup>). Essas interações são representadas como uma rede, onde as arestas representam os tipos de interações e os nós centrais são as proteínas. Observa-se interações entre SOX9, CTNNB1 ( $\beta$ -catenina) e as proteínas quinase catalíticas subunidades alfa e gama**



A variante c.A971G (p.Asp324Gly) é do tipo *missense*, com frequência populacional extremamente baixa (gnomAD:  $6,7 \times 10^{-6}$ ) e foi predita como deletéria ou provavelmente deletéria em pelo menos 3 algoritmos de predição *in-silico* (*MutationTaster*, *Mutation Assessor* e *Polyphen2*). Está localizada no domínio *ACG-Kinase C-terminal*, como anotado no UniProt<sup>133</sup>. Este domínio é importante para a atividade proteica e está em contato com outros domínios envolvidos na transdução de sinal.

A análise através do algoritmo HOPE mostrou que o resíduo mutado é menor, e mais hidrofóbico. Além disso, a mudança de aminoácidos provoca a perda das pontes de hidrogênio, prejudicando a conformação estrutural da proteína. A Figura 6 mostra o desenho esquemático da estrutura da proteína *wild-type* e da proteína mutada bem como a apresentação no modelo tridimensional.

Figura 6 - Em A: estruturas esquemáticas do aminoácido original (esquerda) e do aminoácido mutante (direita); B: Visão geral da proteína *wild-type* e mutante em apresentação de fita. A cadeia lateral do resíduo mutado está em destaque rosa e mostrada como pequenas esferas; C: Em destaque, a cadeia lateral da proteína *wild-type* e da proteína mutante são mostradas em verde e vermelho, respectivamente. O restante da proteína é mostrado em cinza



Fonte: adaptado de HOPE (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope>)<sup>134</sup>.

A variante alélica identificada no *PRKACG* foi classificada pelos critérios do ACMG como VUS (Quadro 6).

Nos modelos de filtragem para herança autossômica recessiva e ligada ao X, nenhuma variante candidata foi encontrada.

#### 4.3.4 Pacientes 7a e 7b

Para o sequenciamento exômico, foram selecionados os dois indivíduos afetados (os irmãos P7a e P7b), a genitora e o irmão não afetados. A filtragem inicial foi feita para o modelo de herança autossômico dominante, buscando variantes iguais nos dois afetados e ausentes na mãe e no irmão não acometido. Foram encontradas 42 variantes raras, em regiões codificadores ou de *splicing*. Destas variantes, nenhuma era em gene reconhecidamente causador de DDS.

Uma variante alélica destacou-se como possivelmente relacionada a condição de DDS 46,XX por anormalidade do desenvolvimento gonadal. A variante alélica c.397delT (p.Ser133Leufs\*7) foi identificada no éxon 5 do gene *IMMP2L* (*Inner Mitochondrial Membrane Peptidase, subunit 2*).

O gene *IMMP2L* está localizado no cromossomo 7, região q31.1 e possui 6 éxons. Está expresso em vários órgãos e tecidos, inclusive nos testículos e ovários, segundo dados do *Getex* e do *Human Protein Atlas*. *IMMP2L* é uma peptidase localizada na membrana mitocondrial interna, que tem como um dos substratos, o citocromo C1, componente do complexo III da cadeia respiratória mitocondrial em um importante sítio gerador de superóxidos desta organela celular<sup>135</sup>.

O comprometimento da função do gene foi associado ao atraso moderado do desenvolvimento global e espectro autista e à Síndrome de Tourette. Os dois irmãos portadores da variante alélica no *IMMP2L* não apresentaram estas manifestações neurológicas até o momento. O OGM (camundongo) com comprometimento do gene ortólogo apresentou alterações endócrinas e reprodutivas, com destaque para o surgimento de morfologia ovariana alterada e prejuízo da foliculogênese, com base em informações disponíveis no *MGI Mouse Gene*.

A variante alélica, c.397delT (p.Ser133Leufs\*7) apresentava-se em heterozigose. Trata-se de uma variante do tipo *frameshift* e resulta em uma proteína truncada. Esta variante não foi relatada em bancos de dados populacionais; ademais não há descrição no ClinVar de variantes alélicas tipo *frameshift* no gene *IMMP2L*.

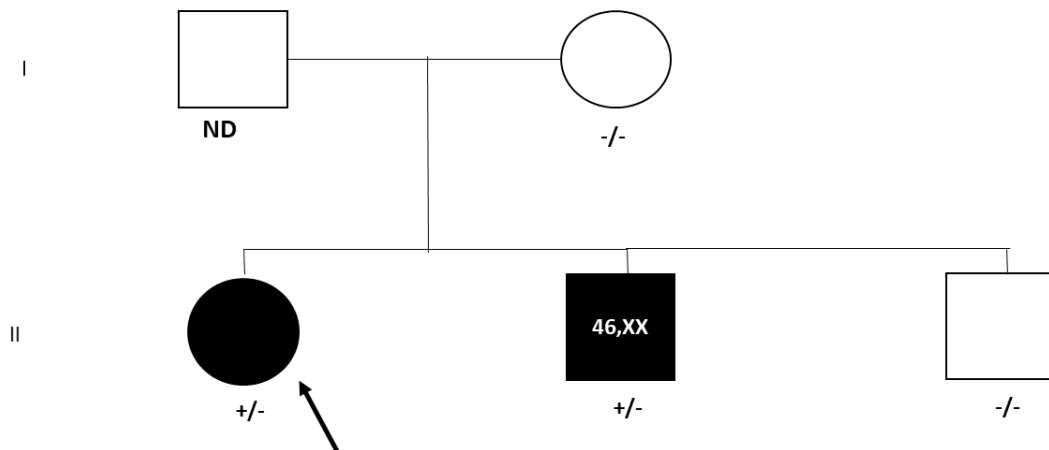
Essa variante alélica identificada no *IMMP2L* foi classificada como VUS pelos critérios do ACMG (Quadro 6).

O estudo de segregação da variante p.Ser133\* na família 7 identificou a variante nos dois irmãos portadores de DDS 46,XX OT (P7a e P7b) e a mesma estava ausente na mãe e no irmão não afetado. O estudo do DNA do pai não estava disponível para estudo (pai falecido) (Figuras 7 e 8).



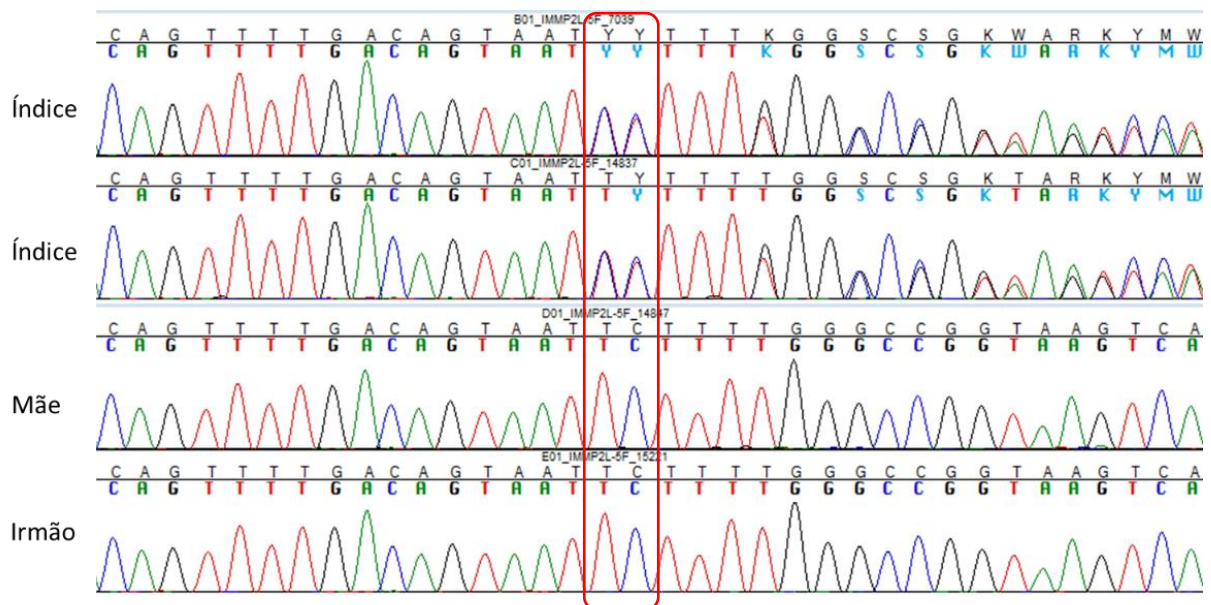
**Figura 7 - Heredograma da família 7 na qual foi identificada a variante alélica candidata c.397delT (p.Ser133Leufs\*7) no gene *IMMP2L***

**Família 7**



Os afetados estão representados pelo círculo e quadrado preenchidos. Símbolos: Seta-paciente índice; (+/-) variante alélica identificada em heterozigose; (-/-) variante alélica ausente; ND- DNA não disponível para estudo

**Figura 8 - Eletroferograma com a variante c397delT (p.Ser133Leufs\*7) identificada em heterozigose no éxon 5 no gene *IMMP2L*. As sequencias dois irmãos (P7a e P7b) portadores de DDS 46,XX OT, da mãe e do irmão não afetado**



Nos modelos de filtragem para herança autossômica recessiva e ligada ao X, nenhuma variante de interesse foi encontrada na Família 7.



#### 4.3.5 Paciente 9

Foi selecionado para o sequenciamento exômico apenas o indivíduo afetado (Paciente 9). Na filtragem para o modelo de herança autossômico dominante, foram encontradas 167 variantes raras, em regiões codificadores ou de *splicing*.

A variante alélica, c.G152T (p.Gly51Val), identificada no gene *SOX8* (*SRY-Box Transcription Factor 8*) destacou-se como possível candidata associada à condição de DDS OT.

O *SOX8* está localizado no cromossomo 16, na região p13.3 e contém três éxons. A análise das propriedades intrínsecas do gene através do uso do algoritmo DOMINO evidenciou um *score* compatível para gerar mudanças com efeito dominante para o fenótipo.

A variante c.G152T (p.Gly51Val) foi identificada em heterozigose no éxon 1 do *SOX8*. Trata-se de uma variante *missense*, ausente em bancos de dados públicos nacionais e internacionais. Altera um aminoácido conservado entre os mamíferos, que se encontra no domínio N-terminal, considerado importante para a atividade biológica da proteína. A análise utilizando o algoritmo HOPE mostrou que o resíduo mutado é maior e mais hidrofóbico que o resíduo original. Além disso, a flexibilidade secundária a presença do resíduo Gly51 permite a angulação necessária para a conformação da proteína; outros aminoácidos podem gerar uma conformação incorreta com alteração da estrutura proteica e da sua função (Figura 9)<sup>134</sup>.

**Figura 9 -** Mutação da Glicina para Valina na posição 51. Molécula do aminoácido original (esquerda) e do aminoácido mutante (direita). A estrutura principal, que é comum aos dois aminoácidos, está em cor vermelha; a cadeia lateral, única para cada aminoácido mutado, está em cor preta



Fonte: adaptado de HOPE (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope>)<sup>134</sup>.

A avaliação em *sites* de predição *in silico* não foi uniforme, entretanto pelo menos três (*MutationTaster*, *MetaLR* e *FATHMM*) indicaram efeito deletério ou causador de doença. Consta uma descrição no ClinVar da mesma variante aqui identificada, submetida em abril de 2023, que foi classificada como variante de significado incerto. Nesta descrição foi associada a doença genética congênita, sem outras informações fenotípicas adicionais.

O OGM (camundongo) com comprometimento do locus ortólogo apresentou alterações endócrinas e reprodutivas, com destaque para o surgimento de morfologia alterada das células de Sertoli e anormalidades no sistema reprodutivo masculino, nos estados de heterozigose, segundo informações disponíveis no MGI *Mouse Gene*.

A variante alélica identificada foi classificada pelos critérios do ACMG como VUS (Quadro 6).

Nos modelos de filtragem para herança autossômica recessiva e ligada ao X, nenhuma variante candidata foi encontrada.

#### 4.3.6 Paciente 20

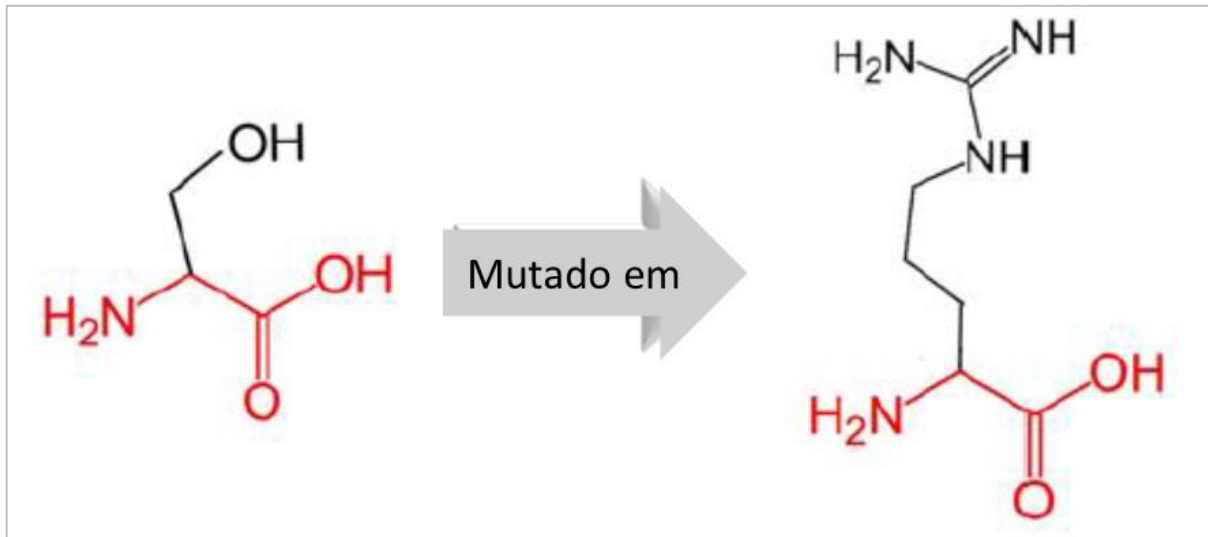
Foram selecionados para o sequenciamento exômico, o indivíduo afetado (paciente 20) e seus genitores. A filtragem inicial foi feita para o modelo de herança autossômica dominante, pesquisa de variante *de novo*. Foram encontradas 60 variantes raras, em regiões codificadores ou de *splicing*.

Uma variante em heterozigose no *SOX10* foi selecionada como provável candidata a etiologia do DDS 46,XX OT.

*SOX10*, um gene fortemente relacionado ao *SOX9* e *SOX8*, está localizado no cromossomo 22q13.1 e contém quatro éxons. O gene *SOX10* possui propriedades intrínsecas para provocar mudanças com efeito dominante para o fenótipo, de acordo com o algoritmo DOMINO. Evidências sugerem o *SOX10* como um candidato à etiologia molecular do DDS 46,XX T/OT em humanos<sup>68</sup>. Ademais, estudos com ratos transgênicos, cujo *Sox10* estava expresso de forma excessiva, apresentaram sexo reverso XX<sup>136</sup>.

A variante c.C1329A (p.Ser443Arg), localizada no éxon 4 do gene *SOX10*, em heterozigose, do tipo *missense*, é raríssima em banco de dados públicos populacionais (frequência  $4,0 \times 10^{-7}$  pelo gnomAD). Provoca uma alteração em um aminoácido conservado entre as espécies, localizado no domínio de transativação. Pelo modelo HOPE, a proteína mutada é maior e mais hidrofóbica que a *wild-type* (Figura 10). Com relação a predição *in silico*, os algoritmos não demonstram resultados uniformes de patogenicidade, sendo que a maioria deles classificaram a variante com efeito funcional incerto. Essa variante alélica identificada no *SOX10* foi classificada pelos critérios do ACMG como provavelmente patogênica (Quadro 6).

**Figura 10 -** Mutação da Serina para Arginina na posição 443. Molécula do aminoácido original (esquerda) e do aminoácido mutante (direita). A estrutura principal, que é comum aos dois aminoácidos, está em cor vermelha; a cadeia lateral, única para cada aminoácido, está em cor preta



Fonte: adaptado de HOPE (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope>)<sup>134</sup>.

Nos modelos de filtragem para herança autossômica recessiva e ligada ao X, nenhuma variante candidata foi encontrada.

## **5 DISCUSSÃO**

Os DDS 46,XX T/OT constituem condições raras e representam de 3 a 10% dos diagnósticos entre os pacientes portadores de DDS 46,XX<sup>22</sup>. O pequeno número de indivíduos acometidos e de famílias informativas, com vários membros afetados pela doença, são fatores que limitam o conhecimento a respeito da etiologia dessas intrigantes anormalidades do desenvolvimento gonadal

A maioria das publicações disponíveis na literatura consistem em relatos de casos ou descrevem o estudo de um pequeno número de pacientes<sup>64,82</sup>. De forma que, apesar de todas as ferramentas disponíveis para a investigação das causas genéticas, os mecanismos envolvidos na etiologia deste grupo de DDS continuam, ainda, pouco elucidados.

O desenvolvimento das técnicas de citogenética molecular como FISH e *SNP/CGH-array* contribui para o diagnóstico molecular de um subgrupo de pacientes DDS 46,XX T, nos quais a presença do gene *SRY* paterno transcolado para o cromossomo X ou um autossomo estabelece a causa da doença. Achado semelhante é raramente confirmado nos pacientes DDS 46,XX OT<sup>42</sup>. A identificação de regiões cromossômicas e/ou genes candidatos na avaliação de pacientes DDS T/OT sindrômicos também contribuiu para o avanço diagnóstico. Genes importantes e ativos na formação ovariana, tiveram seu papel estabelecido somente após o estudo dos quadros sindrômicos de DDS 46,XX T/OT, incluindo o *NR2F2/COUPTFII*<sup>10</sup>, associado a defeitos cardíacos e síndrome de blefarofimose, ptose, epicanto inverso; o *RSPO1*, associado a anormalidades na pele (hiperqueratose palmoplantar e aumento do risco de carcinoma de células escamosas)<sup>75</sup> e membro 4 da família Wnt (*WNT4*), que causa a síndrome SERKAL (disgenesia renal, adrenal e pulmonar)<sup>78</sup>. No entanto, este perfil de pacientes não representa a maioria dos acometidos pela condição DDS 46,XX T/OT<sup>137</sup>.

O sequenciamento exômico permite identificar variantes alélicas presentes nas regiões codificadoras e em sítios de *splicing*, possibilitando determinar novas causas genéticas, além de trazer agilidade para as pesquisas de genes já reconhecidos neste processo. Uma significativa vantagem do sequenciamento exômico completo é a sua grande flexibilidade, se comparado aos painéis genéticos pré-estabelecidos. Em adição, esta tecnologia permite o estudo das variantes alélicas quantas vezes forem necessário, com a possibilidade de diagnósticos futuros à medida que o conhecimento avança e novos genes correlacionados ao fenótipo são confirmados<sup>138</sup>.

Como característica inerente da técnica, variações em regiões regulatórias e intrônicas não são analisadas pelo sequenciamento exômico completo. Com relação à variantes estruturais, como as variações em número de cópias, translocações, inversões e

rearranjos complexos, a leitura de pequenos fragmentos de DNA (*reads*) limita a sua identificação. Ademais, variantes localizadas em regiões de baixa complexidade com sequências repetidas de nucleotídeos, podem ter o seu mapeamento reduzido<sup>139</sup>. Todos estes aspectos podem limitar a eficácia diagnóstica da metodologia.

A apresentação dos resultados deste primeiro estudo de uma coorte brasileira de pacientes portadores de DDS 46,XX OT/T *SRY*-negativo, acompanhados em um único centro terciário de atendimento especializado em DDS, cuja pesquisa molecular foi realizada por técnica de sequenciamento exômico, vem agregar muito à essa escassa literatura. Apresentamos a segunda maior coorte descrita na literatura de pacientes DDS 46, XXT/OT *SRY*-negativo não-sindrômicos estudada por esta metodologia<sup>90</sup>.

O grupo estudado representa uma coorte bem caracterizada fenotipicamente, com informações a respeito da genitália externa e interna, da histologia gonadal e do desenvolvimento puberal, à despeito da coleta retrospectiva dos dados clínicos. Entretanto, a segregação completa de muitas variantes de interesse ficou comprometida pela ausência do DNA dos familiares, pois muitos pacientes já não faziam o seguimento ambulatorial na instituição, dificultando o contato e a busca ativa dos aparentados.

Das seis variantes identificadas em sete pacientes com diagnóstico de DDS 46,XX OT, duas foram categorizadas como provavelmente patogênicas e quatro como de significado incerto (VUS). Destas, duas foram identificadas em genes da clássica cascata da determinação gonadal, representada na Figura 1, pertencentes a família *SOX*. As demais variantes alélicas candidatas foram identificadas em genes não reconhecidamente atuantes na via da determinação gonadal humana, mas previamente correlacionados a outros fenótipos gonadais, como disgenesia XY e insuficiência ovariana prematura.

## 5.1 ANÁLISE DAS VARIANTES ALÉLICAS IDENTIFICADAS EM GENES CLASSICAMENTE RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO GONADAL: MEMBROS DA FAMÍLIA SOX

As proteínas Sox, exemplificadas pelo gene de determinação sexual *Sry* em mamíferos, são fatores de transcrição que possuem um domínio de alta mobilidade do grupo (HMG, do inglês *High-Mobility Group*) com capacidade de ligar e dobrar o DNA, permitindo assim a transativação de genes-alvo<sup>140</sup>. Os genes *Sox* são predominantemente, embora não exclusivamente, expressos durante a embriogênese e em humanos e camundongos formam uma família de 20 membros<sup>141</sup>. Com base nos níveis de diferenças e semelhanças estruturais e, na provável relação evolutiva, a família Sox foi subdividida em 10 subgrupos, de A-J<sup>142</sup>. O grupo SoxE, composto por Sox8, Sox9 e Sox10, tem sido implicado em diversos distúrbios humanos, incluindo DDS, displasia óssea camptomélica<sup>143</sup> e doença de Waardenberg-Hirschsprung tipo IV (megacólon agangliônico)<sup>144</sup>.

Coerente com uma origem evolutiva compartilhada, os genes SoxE frequentemente apresentam padrões de expressão sobrepostos e são capazes de compensar ou cooperar entre si, como demonstrado em OGM<sup>145,146</sup>.

### 5.1.1 Variante identificada no gene *SOX8*

Sox8 é expresso em células somáticas nos estágios iniciais do desenvolvimento gonadal em mamíferos, em paralelo e em redundância ao Sox9<sup>145,147</sup>. Após a ativação de Sox9 nas gônadas embrionárias de camundongos, Sox8 e Sox10, os outros dois membros do grupo E de SOX, são expressos e ambos podem substituir a função do Sox9 na via de masculinização da gônada<sup>136,146</sup>. Aparentemente o Sox8 é dispensável para o desenvolvimento testicular embrionário em camundongos, visto que o fenótipo apresentado por animais *knockout* para o Sox8 é de infertilidade masculina progressiva e perda de peso<sup>148,149</sup>. Porém, diversos estudos sugerem que tanto Sox8 quanto Sox9 estão normalmente envolvidos na repressão de Foxl2, e desta forma agem na inibição da via ovariana durante o desenvolvimento testicular, reforçando a redundância funcional de ambos<sup>147</sup>.

Em humanos o SOX8 é coexpresso com o NR5A1 e o SOX9 nas fases iniciais da determinação testicular humana, tanto nas células de Sertoli quanto nas de Leydig<sup>150</sup>. Rearranjos cromossômicos englobando o *locus* que contém o SOX8 ou seus elementos regulatórios (*enhancer elements*) foram identificados em pacientes portadores de disgenesia

gonadal forma completa e parcial, respectivamente. A variante c.G468 C (p.Glu156Asp) em heterozigose localizada no HMG-*box* do *SOX8* foi identificada em uma paciente portadora de disgenesia gonadal parcial por Portnoi *et al.*<sup>150</sup>. Os estudos funcionais *in vitro* dessa variante revelaram alterações na atividade biológica da proteína *SOX8* capazes de interferir no desenvolvimento testicular normal<sup>150</sup>. Ademais, associação entre mutações no *SOX8* e casos de infertilidade masculina e feminina, foi descrita<sup>150</sup>.

Esses dados da literatura reforçam o interesse despertado pela variante c.G152T (p.Gly51Val) do *SOX8* identificada na análise do sequenciamento exômico de um paciente portador de DDS 46,XX OT. A classificação dessa variante de acordo com os critérios do ACMG foi de VUS, porém várias das características avaliadas indicam um potencial papel deletério dessa variante (Quadro 6). Soma-se a informação de que o resíduo Gly51 é altamente conservado nos mamíferos e localizado no domínio Sox\_N, estruturalmente similar entre outros membros do subgrupo SOXE, como o *SOX9* e o *SOX10*. O aminoácido glicina na posição 51 permite a flexibilidade necessária para a angulação na estrutura da proteína *SOX8* e a troca de aminoácido para valina ou outro poderia levar a uma conformação incorreta, com alteração da estrutura proteica e conseqüentemente interferência na sua função. Esses dados contribuem para a hipótese de que a proteína *SOX8* mutada poderia estar associada a uma ativação inapropriada de vias testículo-específicas ou, a uma ruptura dos mecanismos de manutenção da via ovariana, culminando com o fenótipo de DDS ovotesticular. Dada a semelhança e redundância funcional do *SOX8* e *SOX9* seria possível que a ativação ectópica do *SOX8* em gônadas XX pudesse gerar sexo reverso em humanos, de forma semelhante aos casos já descritos para o *SOX9*<sup>48,50,62</sup>. Variantes patogênicas *missense* em outros genes envolvidos na diferenciação gonadal, como o *NR5A1* e *WT1*, já foram associadas ao fenótipo de DDS 46,XX T/OT<sup>84,85,89,91</sup>.

No entanto, estudos complementares são necessários para definir o real papel dessa variante do gene *SOX8* no desenvolvimento gonadal.



### 5.1.2 Variante identificada no gene *SOX10*

*SOX10*, um gene estreitamente correlacionado ao *SOX9* e *SOX8*, está localizado no cromossomo 22q13.1 em humanos. Inicialmente expresso nas células da crista neural durante o período embrionário, desempenha um papel crítico no desenvolvimento das células desta linhagem. É também expresso nas gônadas fetais<sup>68</sup>. A desregulação do *SOX10* resulta em anormalidades das células derivadas da crista neural, incluindo células de *Schwann*, oligodendrócitos, melanócitos e células ganglionares entéricas<sup>151</sup> como recentemente, tem sido associada ao fenótipo DDS46, XXT/OT<sup>69</sup>. A expressão do *Sox10* especificamente nas células de Sertoli indica fortemente sua participação no processo de diferenciação testicular<sup>136</sup>.

Polanco *et al.*<sup>136</sup> demonstraram *in vitro* que o *Sox10* ativa o intensificador do *Sox9* chamado TESCO (*element of testis-specific enhancer*). Neste *enhancer* do *Sox9* ligam-se diretamente o *Sry* e o *Nr5a1*, que sinergicamente regulam positivamente a expressão de *Sox9*. No experimento *in vitro* observou-se que a ativação do *Sox9* secundária à ligação *Sox10*-TESCO foi mais robusta quando comparada à ativação gerada pela ligação *Sry*-TESCO. Corroborando com esses achados, os estudos em modelo animal transgênico demonstraram que o excesso de expressão do *Sox10* causa sexo reverso em camundongos XX<sup>136</sup>. Um dado interessante derivado do estudo foi que o nível de expressão é importante na determinação do fenótipo gonadal, em situações envolvendo ganho de função do *Sox10*. Diferenciação testicular completa em todos os camundongos foi observada na linhagem que tinha níveis mais elevados de expressão de *Sox10*, enquanto a linhagem expressando níveis mais baixos do transgene, apenas 30% dos camundongos mostraram reversão completa do sexo no período pós-natal. Curiosamente, todos os fetos do segundo grupo (níveis mais baixos de expressão) foram capazes de iniciar a diferenciação de células de Sertoli (presença de células que expressam *Sox9* em gônadas transgênicas XX) embora nessas gônadas, as células comprometidas com a via feminina, identificadas pela expressão de *Foxl2*, foram encontradas entremeadas com células *Sox9*-positivas. Esse mesmo padrão foi descrito em ovotestis em humanos bem como em modelos de desenvolvimento de ovotestis em camundongos<sup>152</sup>.

Esses dados sugerem que a determinação do fenótipo gonadal sofre a influência de condições envolvendo ganho de função do *SOX10*. No mesmo sentido, alterações gonadais e do sistema reprodutivo foram relatadas em casos de duplicação parcial do cromossomo 22q em humanos 46,XX, região cromossômica que contém o *SOX10*. Raros pacientes com diagnóstico de DDS 46,XX T/OT, síndromicos e não síndromicos foram descritos na literatura com aneuploidias do cromossomo 22<sup>68,70,73</sup>.

Até o momento, nenhuma variante de ponto no *SOX10* relacionada a DDS 46,XX T/OT foi descrita. A proposta da variante *missense* c.C1329A (p.Ser443Arg) identificada no éxon 4 do *SOX10*, como uma variante candidata à etiologia da condição de DDS 46,XX OT baseou-se nos achados e nas características dessa nova variante, que indicam um potencial papel deletério. A variante p.Ser443Arg está localizada no domínio de transativação (TAC), um domínio comum às proteínas SOXE, de fundamental importância para a sua função. Mutações *nonsense* e *frameshift* no *SOX9*, que levam a alterações no domínio TAC, comprometem o desenvolvimento gonadal e esquelético, como resultado da perda da atividade de transativação de genes *downstream* ao *SOX9* nas respectivas células<sup>153,154</sup>. Para que ocorra a interação SOX9- $\beta$ -catenina na célula somática gonadal é necessário o domínio TAC intacto<sup>155</sup>.

Desta forma, as variantes identificadas nos genes da família *SOX* apresentam potencial para gerar o fenótipo de DDS 46,XX OT. A complementação dos estudos utilizando ensaios funcionais *in vitro* e/ou *in vivo*, além da ampliação do número de pacientes pesquisados possibilitarão definir a patogenicidade das variantes alélicas aqui descritas.

## 5.2 ANÁLISE DAS VARIANTES ALÉLICAS IDENTIFICADAS EM NOVOS GENES CANDIDATOS AOS DISTÚRBIOS DO DESENVOLVIMENTO GONADAL 46,XX: *CLASPI*, *FLNB*, *IMMP2L*, *PRKACG*

Novos genes candidatos são frequentemente identificados nos estudos utilizando as novas tecnologias de sequenciamento de larga escala como o exoma, entretanto a confirmação da participação efetiva desses novos genes no processo patológico ainda não é tão simples. A somatória de relatos semelhantes em coortes de diferentes origens pode reforçar essa associação genótipo-fenótipo e contribuir para o avanço no entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento gonadal humano.

Assim, a seguir os genes identificados nesta coorte e que não são classicamente relacionados ao processo de determinação gonadal serão discutidos. Alguns deles foram previamente relacionados a outros fenótipos de anormalidades do desenvolvimento gonadal em humanos e/ou em modelos animais.

### 5.2.1 Gene *CLASP1*

Este gene codifica a proteína *CLIP-associating protein 1* envolvida na estabilização dos microtúbulos dinâmicos, em sua extremidade mais positiva, necessária para o crescimento ativo do microtúbulo, onde a adição de subunidades de tubulina ocorre de forma contínua. A ligação da proteína rastreadora *CLIP-associating protein 1* à extremidade mais positiva do microtúbulo permite que ela interaja com outras proteínas e estruturas celulares, formando complexos funcionais<sup>156,157</sup>. O impacto da substituição do aminoácido arginina por uma cisteína (posição 1159) na estrutura da proteína *CLASP1*, embora teoricamente traga modificações estruturais significativas e com possíveis danos às interações de pontes S-S, a repercussão na função da proteína não pode ser avaliada por tratar-se de uma região cuja estrutura não é previsível.

Durante o início da embriogênese, o *SOX9* é expresso no citoplasma das células precursoras pré-Sertoli/pré-granulosa em ambos os sexos. No momento da diferenciação sexual, o *SOX9* se move para dentro do núcleo das células pré-Sertoli (masculinas) enquanto se mantém no citoplasma de células pré-granulosa (femininas), com consequente redução de sua expressão<sup>158</sup>. A retenção do *SOX9* no citoplasma induz ao fenótipo feminino em gônadas masculinas demonstrando que *SOX9* deve migrar para o núcleo para promover a determinação do sexo masculino. Este deslocamento, fundamental para diferenciação testicular, se dá em função da interação do *SOX9* com componentes do citoesqueleto, os microtúbulos<sup>159</sup>. Os microtúbulos são estruturas extremamente dinâmicas e se organizam sob controle de proteínas associadas, como as da família *CLASP*<sup>160</sup>.

Com base nessas evidências hipotetizamos que alterações na ligação *SOX9*-microtúbulos, secundárias a modificações na estrutura da proteína *CLASP1* poderiam interferir na migração do *SOX9* do citoplasma para o núcleo celular, e consequentemente no processo normal da determinação gonadal. A presença de uma proteína *CLASP1* modificada poderia favorecer o transporte do *SOX9* para o interior do núcleo da célula e desencadear o desenvolvimento da célula de Sertoli em um ambiente originalmente ovariano. Nesta hipótese, a ativação exacerbada da *CLASP1* poderia estar associada ao fenótipo de DDS 46,XX T/OT.

Reforçando o provável papel deste gene na função reprodutiva humana, Jaillard *et al.*<sup>161</sup> identificaram, em um grupo de mulheres com insuficiência ovariana prematura avaliadas por *array-CGH*, uma CNV (duplicação) de 741 kb em 2q14 envolvendo a extremidade 5' do *CLASP1*. Esta duplicação foi considerada candidata à etiologia da doença.

A variante c.C3475T (p.Arg1159Cys) identificada no paciente com DDS 46,XX OT foi previamente descrita no *gnomAD* somente em três indivíduos 46,XY. Esse achado, não desclassifica a variante candidata e reforça a necessidade de estudos complementares, de forma a esclarecer os mecanismos envolvidos e confirmar se a interação entre o SOX9 e os elementos do citoesqueleto teria uma participação efetiva no processo como aqui proposto.

### 5.2.2 Gene *FLNB*

*FLNB* é um dos três membros da família filamina, proteínas do citoesqueleto que induz polimerização da actina e promove transdução de sinal intracelular<sup>162</sup>. Age no controle do desenvolvimento da cartilagem e da formação óssea endocondral<sup>163</sup>. Células de Sertoli e condrócitos em desenvolvimento compartilham um repertório de moléculas sinalizadoras que influenciam a expressão de fatores de transcrição determinantes da sua identidade e função<sup>164-168</sup>.

A proteína *FLNB* faz parte de um complexo de transdução de sinal que inclui as proteínas *MAP3K1* e *RAC1*, moléculas que têm demonstrado modular as atividades de *SOX9* e  $\beta$ -catenina<sup>169</sup>. A expressão de *SOX9* e a atividade de  $\beta$ -catenina podem ser afetadas pela fosforilação de *p38* e *ERK1/2*, alvos da *MAP3K1*<sup>166</sup>.

O gene de transdução de sinal, *MAP3K1*, faz parte de uma rede de genes envolvidos no desenvolvimento gonadal<sup>166</sup>. Estudos recentes tem identificado variantes alélicas deletérias no *MAP3K1* em 13-18% dos pacientes com DSD 46,XY, tornando-o um dos genes mais frequentemente associado ao fenótipo de DDS<sup>170</sup>. Estudos funcionais de variantes patogênicas do *MAP3K1* demonstraram efeitos de ganho de função, causando aumento da fosforilação de alvos a jusante, com consequente diminuição da expressão de *SOX9*, importante para o desenvolvimento do testículo, e aumento da expressão de  $\beta$ -catenina. Essas alterações na expressão gênica imitam a via de sinalização no desenvolvimento ovariano e, portanto, resultam em desenvolvimento testicular anormal<sup>166</sup>.

Upadhyay *et al.*<sup>129</sup> identificaram em um paciente portador de displasia óssea e disgenesia gonadal 46,XY, variantes alélicas em heterozigose composta no *FLNB*<sup>129</sup>. Em experimentos celulares, os autores demonstraram que essas mutações *in vitro* aumentavam a ligação da proteína *FLNB* ao complexo de transdução de sinal *MAP3K1/RAC1* e promoviam a ativação da  $\beta$ -catenina. Além disso, diferentes efeitos na fosforilação de intermediários da via da *MAP* quinase e na expressão do *SOX9* também foram observados. Desta forma, sugeriram que a ativação direta da  $\beta$ -catenina pelo complexo *FLNB-MAP3K1-RAC1* por uma variante modificada da *FLNB* seria um novo mecanismo etiológico da disgenesia gonadal 46,XY<sup>129</sup>.

Especulamos que a variante alélica c.C2822A (p.Pro941Gln) do gene *FLNB* identificada em heterozigose no paciente portador de DDS 46,XX OT sem anormalidades ósseas poderia interferir (reduzir) na fosforilação do p38, que é um inibidor transcricional do SOX9 (aumentar sua atividade), levando ao fenótipo gonadal do paciente. Os efeitos dessa variante do *FLNB*, classificada como provavelmente patogênica pelos critérios do ACMG, no equilíbrio das funções do SOX9 e  $\beta$ -catenina, bem como de seus reguladores intermediários deverão ser avaliados por estudos complementares *in vitro* e/ou *in vivo*.

### 5.2.3 Gene *IMMP2L*

*IMMP2L* é uma peptidase da membrana mitocondrial interna, que desempenha funções importantes nas mitocôndrias, envolvendo desde o metabolismo mitocondrial ao destino celular. Sua participação durante condições de aumento de espécies reagentes ao oxigênio (ROS) torna-se fundamental na programação do destino celular, promovendo a morte celular programada pela ativação dos fatores indutores de apoptose na senescência celular.

Mutações do gene *Immp2l* ocasionam elevação da produção de superóxido, e prejuízo da função mitocondrial. Variantes estruturais raras que afetam *IMMP2L* foram implicadas como fatores de suscetibilidade a transtornos do espectro autista e transtorno do déficit de atenção com hiperatividade, assim como outros distúrbios do sistema nervoso e neurodegeneração<sup>171</sup>.

Anormalidades da função reprodutiva em mamíferos também foram associadas com o *Immp2l*. Camundongos machos homozigotos para a mutação no *Immp2l* apresentavam prejuízo da gametogênese e disfunção erétil, enquanto as fêmeas eram inférteis devido a defeitos na foliculogênese e ovulação. Todos esses fenótipos observados nos camundongos poderiam ser explicados pela geração excessiva do íon superóxido mitocondrial, com inativação de óxido nítrico, uma molécula mensageira importante para a ereção peniana e oogênese<sup>172</sup>.

O relato de linhagens de ovelhas portadoras de intersexo (*XX female-to-male sex reversal*), nas quais o estudo por sequenciamento genômico indicou a possível participação do gene *Immp2* no fenótipo dos animais<sup>173</sup> reforçou os nossos achados.

A avaliação desta família rara, que apresenta dois irmãos afetados com diagnóstico de DDS 46,XX OT e uma variante alélica no mesmo gene identificado nos animais ratifica a hipótese de gene candidato. Além disso, a variante alélica c.397delT (p.Ser133Leufs\*7) gera uma proteína *IMMP2L* truncada, que modifica a estrutura da proteína *wild-type* com prováveis repercussões funcionais. Desta forma, várias evidências indicam que a variante p.Ser133Leufs\*7 no *IMMP2L* esteja provavelmente associada ao fenótipo de DDS 46,XX OT.

Outro relato, envolvendo o gene *IMMP2L* e anormalidades do desenvolvimento ovariano, foi o estudo de Ledig *et al.*<sup>174,175</sup>, no qual os autores descreveram uma paciente com insuficiência ovariana prematura e alopecia *totalis* portadora de uma deleção de 35,82Kb localizada no cromossomo 7(q31.1), região que inclui parte do *IMMP2L*. Esta deleção foi fortemente associada à etiologia da doença<sup>174</sup>. Estudos complementares são fundamentais para a confirmação destas proposições.

#### 5.2.4 Gene *PRKACG*

O gene *PRKACG* codifica a forma gama da subunidade catalítica da quinase dependente de AMP cíclico, também chamada de proteína quinase A. O gene gama é considerado um *retrotransposon* derivado da forma alfa. Em contraste com as formas alfa e beta, amplamente expressas, a forma gama é fortemente tecido específica. Estudos iniciais detectaram sua expressão apenas no testículo humano, no entanto, tecidos ovarianos e cerebrais não foram incluídos na análise<sup>176</sup>.

A ativação da proteína quinase A (PKA) pelo AMP cíclico (cAMP) leva à ativação da subunidade catalítica, que fosforila uma variedade de proteínas citosólicas e nucleares. As diferentes funções das três subunidades catalíticas ainda não são totalmente compreendidas, mas devido ao perfil de expressão tecido específico, uma função localizada e particular da forma gama no tecido testicular tem sido teorizada.

A variante c.A971G (p.Asp324Gly) identificada no paciente portador de DDS 46,XX OT e classificada como VUS pelos critérios do ACMG, foi selecionada como uma variante potencialmente candidata a etiologia da doença, especialmente devido a sua localização na proteína, no domínio *ACG-Kinase C-terminal*, região particularmente importante para a atividade proteica.

A possível participação deste gene no desenvolvimento gonadal foi sugerida previamente por Norling *et al.*<sup>175</sup> baseado nos resultados da pesquisa de novos genes candidatos para disgenesia gonadal 46,XY, na qual utilizou uma plataforma de *array-CGH*, com cobertura de todo o genoma. Neste estudo foi identificada uma duplicação de 454 kb em 9q21.11, envolvendo os genes *PIP5K1B*, *PRKACG*, *FXN*, *TJP2* e *FAM189A2* em um paciente com disgenesia gonadal. Dentre os cinco genes, foram considerados candidatos para o fenótipo de disgenesia gonadal 46,XY os dois primeiros genes, *PIP5K1B* e *PRKACG*<sup>129</sup>.

A interação entre as proteínas PRKACA-SOX9 foi demonstrada por Nagaraja *et al.*<sup>131</sup> em análises de redes de associações entre genes chaves no desenvolvimento gonadal. Nesse estudo, os autores construíram diversas redes de interações de genes chaves no desenvolvimento gonadal e analisaram as correlações das proteínas derivadas, através do banco de dados STRING v10. Embora estas redes de coexpressão de proteínas não forneçam informações conclusivas sobre a causalidade das doenças, as ligações funcionais entre as proteínas podem muitas vezes ser inferidas a partir de associações genômicas entre os genes que as codificam, e são capazes de identificar genes regulatórios subjacentes aos fenótipos em questão<sup>177</sup>.

## **6 CONCLUSÕES**



- 1- O atual estudo representa a primeira coorte de pacientes brasileiros portadores de DDS 46,XX T/OT *SRY*-negativo, avaliados por sequenciamento exômico.
- 2- A análise detalhada de priorização alélica realizada no estudo foi capaz de identificar seis variantes alélicas candidatas, o que representa 29,16% (7/24) dos pacientes DDS 46,XX T/OT *SRY*-negativo. De acordo com os critérios do ACMG, duas foram classificadas como provavelmente patogênicas e quatro como VUS.
- 3- A identificação de variantes candidatas em genes da família *SOX* (*SOX8* e *SOX10*) além de destacar a importância dos membros desta família na etiologia das DDS 46,XX T/OT, indica que as variantes de ponto assim como a variação do número de cópias possam ter um papel na gênese destas condições.
- 4- Este estudo permitiu a identificação de quatro novos genes candidatos, *CLASP1*, *FLNB*, *PRKACG*, *IMMP2L*, ao fenótipo de DDS 46,XX T/OT *SRY*-negativo. Estudos complementares vão determinar a validade da relação gene- doença aqui proposta.
- 5- A investigação genético-molecular baseada no sequenciamento exômico global é uma ferramenta fundamental no diagnóstico de pacientes com DDS 46,XX OT/T *SRY*-negativo, pois permite a identificação de novas variantes alélicas em genes clássicos da cascata de diferenciação gonadal, bem como em novos genes candidatos ao fenótipo.

## **REFERÊNCIAS\***

---

\* De acordo com Estilo Vancouver.

1. Pask A. The Reproductive System. *Adv Exp Med Biol*. 2016;886:1-12.
2. Wilhelm D, Yang JX, Thomas P. Mammalian sex determination and gonad development. *Curr Top Dev Biol*. 2013;106:89-121.
3. MacLaughlin DT, Donahoe PK. Sex determination and differentiation. *N Engl J Med*. 2004;350(4):367-78.
4. Eggers S, Ohnesorg T, Sinclair A. Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(11):673-83.
5. Larney C, Bailey TL, Koopman P. Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry. *Development*. 2014;141(11):2195-205.
6. de Santa Barbara P, Méjean C, Moniot B, Malclès MH, Berta P, Boizet-Bonhoure B. Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. *Biol Reprod*. 2001;64(3):775-83.
7. Hossain A, Saunders GF. The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem*. 2001;276(20):16817-23.
8. Katoh-Fukui Y, Miyabayashi K, Komatsu T, Owaki A, Baba T, Shima Y, et al. Cbx2, a polycomb group gene, is required for Sry gene expression in mice. *Endocrinology*. 2012;153(2):913-24.
9. Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM, Orkin SH. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development*. 2002;129(19):4627-34.
10. Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortés L, et al. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev*. 2000;91(1-2):403-7.
11. Jameson SA, Lin YT, Capel B. Testis development requires the repression of Wnt4 by Fgf signaling. *Dev Biol*. 2012;370(1):24-32.
12. Moniot B, Declosmenil F, Barrionuevo F, Scherer G, Aritake K, Malki S, et al. The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development*. 2009;136(11):1813-21.
13. Shen WH, Moore CC, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell*. 1994;77(5):651-61.
14. Ono M, Harley VR. Disorders of sex development: new genes, new concepts. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(2):79-91.
15. Lin YT, Capel B. Cell fate commitment during mammalian sex determination. *Curr Opin Genet Dev*. 2015;32:144-52.

16. Grinspon RP, Rey RA. Disorders of Sex Development with Testicular Differentiation in SRY-Negative 46,XX Individuals: Clinical and Genetic Aspects. *Sex Dev.* 2016;10(1):1-11.
17. Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA. Consensus statement on management of intersex disorders. *J Pediatr Urol.* 2006;2(3):148-62.
18. Baetens D, Verdin H, De Baere E, Cools M. Update on the genetics of differences of sex development (DSD). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2019;33(3):101271.
19. Linden MG, Bender BG, Robinson A. Sex chromosome tetrasomy and pentasomy. *Pediatrics.* 1995;96(4 Pt 1):672-82.
20. Auchus RJ, Chang AY. 46,XX DSD: the masculinised female. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010;24(2):219-42.
21. Kousta E, Papathanasiou A, Skordis N. Sex determination and disorders of sex development according to the revised nomenclature and classification in 46,XX individuals. *Hormones (Athens).* 2010;9(3):218-131.
22. Öcal G, Berberoğlu M, Sıklar Z, Aycan Z, Hacıhamdioglu B, Savas Erdeve Ş, et al. Clinical review of 95 patients with 46,XX disorders of sex development based on the new Chicago classification. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2015;28(1):6-11.
23. de la Chapelle A. Analytic review: nature and origin of males with XX sex chromosomes. *Am J Hum Genet.* 1972;24(1):71-105.
24. Wu QY, Li N, Li WW, Li TF, Zhang C, Cui YX, et al. Clinical, molecular and cytogenetic analysis of 46, XX testicular disorder of sex development with SRY-positive. *BMC Urol.* 2014;14:70.
25. Blackless M, Charuvastra A, Derryck A, Fausto-Sterling A, Lauzanne K, Lee E. How sexually dimorphic are we? Review and synthesis. *Am J Hum Biol.* 2000;12(2):151-66.
26. Wettasinghe KT, Sirisena ND, Andraweera PH, Jayasekara RW, Dissanayake VH. A case series of five sri lankan patients with ovotesticular disorder of sex development. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2012;21(4):69-73.
27. Mekkawy MK, Kamel AK, Dessouky N, Elgharbawy M, Mazen I. Cytogenetic Spectrum of Ovotesticular Difference of Sex Development (OT DSD) among a Large Cohort of DSD Patients and Literature Review. *Sex Dev.* 2019;13(5-6):221-7.
28. Ouhilal S, Turco J, Nangia A, Stotland M, Manganiello PD. True hermaphroditism presenting as bilateral gynecomastia in an adolescent phenotypic male. *Fertil Steril.* 2005;83(4):1041.
29. Osorio Acosta VA, Alonso Domínguez FJ. True hermaphroditism. *Arch Esp Urol.* 2004;57(8):856-60.
30. Matsui F, Shimada K, Matsumoto F, Itesako T, Nara K, Ida S, et al. Long-term outcome of ovotesticular disorder of sex development: a single center experience. *Int J Urol.* 2011;18(3):231-6.

31. Hisamatsu E, Nakagawa Y, Sugita Y. Two cases of late-diagnosed ovotesticular disorder of sex development. *APSP J Case Rep.* 2013;4(3):40.
32. Mao Y, Chen S, Wang R, Wang X, Qin D, Tang Y. Evaluation and treatment for ovotesticular disorder of sex development (OT-DSD) - experience based on a Chinese series. *BMC Urol.* 2017;17(1):21.
33. Wiersma R. The clinical spectrum and treatment of ovotesticular disorder of sexual development. *Adv Exp Med Biol.* 2011;707:101-3.
34. Sircili MH, Denes FT, Costa EM, Machado MG, Inacio M, Silva RB, et al. Long-term followup of a large cohort of patients with ovotesticular disorder of sex development. *J Urol.* 2014;191(5 Suppl):1532-6.
35. Maciel-Guerra AT, de Mello MP, Coeli FB, Ribeiro ML, Miranda ML, Marques-de-Faria AP, et al. 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.
36. Toublanc JE, Boucekkine C, Abbas N, Barama D, Vilain E, McElreavey K, et al. Hormonal and molecular genetic findings in 46,XX subjects with sexual ambiguity and testicular differentiation. *Eur J Pediatr.* 1993;152 Suppl 2:S70-5.
37. Abbas NE, Toublanc JE, Boucekkine C, Toublanc M, Affara NA, Job JC, et al. A possible common origin of "Y-negative" human XX males and XX true hermaphrodites. *Hum Genet.* 1990;84(4):356-60.
38. Verkauskas G, Jaubert F, Lortat-Jacob S, Malan V, Thibaud E, Nihoul-Fékété C. The long-term followup of 33 cases of true hermaphroditism: a 40-year experience with conservative gonadal surgery. *J Urol.* 2007;177(2):726-31; discussion 31.
39. Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, et al. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature.* 1990;348(6300):448-50.
40. Ferguson-Smith MA, Cooke A, Affara NA, Boyd E, Tolmie JL. Genotype-phenotype correlations in XX males and their bearing on current theories of sex determination. *Hum Genet.* 1990;84(2):198-202.
41. Kusz K, Kotecki M, Wojda A, Szarras-Czapnik M, Latos-Bielenska A, Warenik-Szymankiewicz A, et al. Incomplete masculinisation of XX subjects carrying the SRY gene on an inactive X chromosome. *J Med Genet.* 1999;36(6):452-6.
42. McElreavey K, Rappaport R, Vilain E, Abbas N, Richaud F, Lortat-Jacob S, et al. A minority of 46,XX true hermaphrodites are positive for the Y-DNA sequence including SRY. *Hum Genet.* 1992;90(1-2):121-5.
43. Domenice S, Nishi MY, Billerbeck AE, Carvalho FM, Frade EM, Latronico AC, et al. Molecular analysis of SRY gene in Brazilian 46,XX sex reversed patients: absence of SRY sequence in gonadal tissue. *Med Sci Monit.* 2001;7(2):238-41.

44. Queipo G, Zenteno JC, Peña R, Nieto K, Radillo A, Dorantes LM, et al. Molecular analysis in true hermaphroditism: demonstration of low-level hidden mosaicism for Y-derived sequences in 46,XX cases. *Hum Genet.* 2002;111(3):278-83.
45. Jiménez AL, Kofman-Alfaro S, Berumen J, Hernández E, Canto P, Méndez JP, et al. Partially deleted SRY gene confined to testicular tissue in a 46,XX true hermaphrodite without SRY in leukocytic DNA. *Am J Med Genet.* 2000;93(5):417-20.
46. Inoue H, Nomura M, Yanase T, Ichino I, Goto K, Ikuyama S, et al. A rare case of 46,XX true hermaphroditism with hidden mosaicism with sex-determining region Y chromosome-bearing cells in the gonads. *Intern Med.* 1998;37(5):467-71.
47. Mergen E, Kayhan G, Kocaay P, Uçaktürk SA. A Duplication Upstream of SOX9 Associated with SRY Negative 46,XX Ovotesticular Disorder of Sex Development: A Case Report. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2020;12(3):308-14.
48. López-Hernández B, Méndez JP, Coral-Vázquez RM, Benítez-Granados J, Zenteno JC, Villegas-Ruiz V, et al. Duplication of SOX9 associated with 46,XX ovotesticular disorder of sex development. *Reprod Biomed Online.* 2018;37(1):107-12.
49. Xiao B, Ji X, Xing Y, Chen YW, Tao J. A rare case of 46, XX SRY-negative male with approximately 74-kb duplication in a region upstream of SOX9. *Eur J Med Genet.* 2013;56(12):695-8.
50. Ushijima K, Ogawa Y, Terao M, Asakura Y, Muroya K, Hayashi M, et al. Identification of the first promoter-specific gain-of-function SOX9 missense variant (p.E50K) in a patient with 46,XX ovotesticular disorder of sex development. *Am J Med Genet A.* 2021;185(4):1067-75.
51. Croft B, Ohnesorg T, Hewitt J, Bowles J, Quinn A, Tan J, et al. Human sex reversal is caused by duplication or deletion of core enhancers upstream of SOX9. *Nat Commun.* 2018;9(1):5319.
52. Qian Z, Grand K, Freedman A, Nieto MC, Behlmann A, Schweiger BM, Sanchez-Lara PA. Whole genome sequencing identifies a cryptic SOX9 regulatory element duplication underlying a case of 46,XX ovotesticular difference of sexual development. *Am J Med Genet A.* 2021;185(9):2782-2788.
53. Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet.* 1999;87(4):349-53.
54. Lee GM, Ko JM, Shin CH, Yang SW. A Korean boy with 46,XX testicular disorder of sex development caused by SOX9 duplication. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2014;19(2):108-12.
55. Cox JJ, Willatt L, Homfray T, Woods CG. A SOX9 duplication and familial 46,XX developmental testicular disorder. *N Engl J Med.* 2011;364(1):91-3.
56. Vetro A, Ciccone R, Giorda R, Patricelli MG, Della Mina E, Forlino A, et al. XX males SRY negative: a confirmed cause of infertility. *J Med Genet.* 2011;48(10):710-2.

57. Vetro A, Dehghani MR, Kraoua L, Giorda R, Beri S, Cardarelli L, et al. Testis development in the absence of SRY: chromosomal rearrangements at SOX9 and SOX3. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(8):1025-32.
58. Kim GJ, Sock E, Buchberger A, Just W, Denzer F, Hoepffner W, et al. Copy number variation of two separate regulatory regions upstream of SOX9 causes isolated 46,XY or 46,XX disorder of sex development. *J Med Genet.* 2015;52(4):240-7.
59. Refai O, Friedman A, Terry L, Jewett T, Pearlman A, Perle MA, et al. De novo 12;17 translocation upstream of SOX9 resulting in 46,XX testicular disorder of sex development. *Am J Med Genet A.* 2010;152a(2):422-6.
60. Benko S, Gordon CT, Mallet D, Sreenivasan R, Thauvin-Robinet C, Brendehaug A, et al. Disruption of a long distance regulatory region upstream of SOX9 in isolated disorders of sex development. *J Med Genet.* 2011;48(12):825-30.
61. Hyon C, Chantot-Bastaraud S, Harbuz R, Bhourri R, Perrot N, Peycelon M, et al. Refining the regulatory region upstream of SOX9 associated with 46,XX testicular disorders of Sex Development (DSD). *Am J Med Genet A.* 2015;167a(8):1851-8.
62. Shankara Narayana N, Kean AM, Ewans L, Ohnesorg T, Ayers KL, Watson G, et al. Painful ovulation in a 46,XX SRY -ve adult male with SOX9 duplication. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep.* 2017;2017.
63. Zhuang J, Chen C, Li J, Jiang Y, Wang J, Wang Y, et al. The 46, XX Ovotesticular Disorder of Sex Development With Xq27.1q27.2 Duplication Involving the SOX3 Gene: A Rare Case Report and Literature Review. *Front Pediatr.* 2021;9:682846.
64. Grinspon RP, Nevado J, Mori Alvarez Mde L, Del Rey G, Castera R, Venara M, et al. 46,XX ovotesticular DSD associated with a SOX3 gene duplication in a SRY-negative boy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2016;85(4):673-5.
65. Sutton E, Hughes J, White S, Sekido R, Tan J, Arboleda V, et al. Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J Clin Invest.* 2011;121(1):328-41.
66. Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Nakane A, et al. Elucidation of distinctive genomic DNA structures in patients with 46,XX testicular disorders of sex development using genome wide analyses. *J Urol.* 2014;192(2):535-41.
67. Haines B, Hughes J, Corbett M, Shaw M, Innes J, Patel L, et al. Interchromosomal insertional translocation at Xq26.3 alters SOX3 expression in an individual with XX male sex reversal. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(5):E815-20.
68. Seeherunvong T, Perera EM, Bao Y, Benke PJ, Benigno A, Donahue RP, et al. 46,XX sex reversal with partial duplication of chromosome arm 22q. *Am J Med Genet A.* 2004;127a(2):149-51.
69. Falah N, Posey JE, Thorson W, Benke P, Tekin M, Tarshish B, et al. 22q11.2q13 duplication including SOX10 causes sex-reversal and peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelinating leukodystrophy, Waardenburg syndrome, and Hirschsprung disease. *Am J Med Genet A.* 2017;173(4):1066-70.

70. Nicholl RM, Grimsley L, Butler L, Palmer RW, Rees HC, Savage MO, et al. Trisomy 22 and intersex. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1994;71(1):F57-8.
71. Moalem S, Babul-Hirji R, Stavropolous DJ, Wherrett D, Bägli DJ, Thomas P, et al. XX male sex reversal with genital abnormalities associated with a de novo SOX3 gene duplication. *Am J Med Genet A.* 2012;158a(7):1759-64.
72. de Oliveira FM, Barros BA, Dos Santos AP, Campos NLV, Mazzola TN, Filho PL, et al. SOX3 duplication in a boy with 46,XX ovotesticular disorder of sex development and his 46,XX sister with atypical genitalia: Probable germline mosaicism. *Am J Med Genet A.* 2023;191(2):592-8.
73. Aleck KA, Argueso L, Stone J, Hackel JG, Erickson RP. True hermaphroditism with partial duplication of chromosome 22 and without SRY. *Am J Med Genet.* 1999;85(1):2-4.
74. Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, et al. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet.* 2006;38(11):1304-9.
75. Tomaselli S, Megiorni F, De Bernardo C, Felici A, Marrocco G, Maggiulli G, et al. Syndromic true hermaphroditism due to an R-spondin1 (RSPO1) homozygous mutation. *Hum Mutat.* 2008;29(2):220-6.
76. Naasse Y, Bakhchane A, Charoute H, Jennane F, Bignon-Topalovic J, Malki A, et al. A Novel Homozygous Missense Mutation in the FU-CRD2 Domain of the R-spondin1 Gene Associated with Familial 46,XX DSD. *Sex Dev.* 2017;11(5-6):269-74.
77. Tallapaka K, Venugopal V, Dalal A, Aggarwal S. Novel RSPO1 mutation causing 46,XX testicular disorder of sex development with palmoplantar keratoderma: A review of literature and expansion of clinical phenotype. *Am J Med Genet A.* 2018;176(4):1006-10.
78. Mandel H, Shemer R, Borochowitz ZU, Okopnik M, Knopf C, Indelman M, et al. SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *Am J Hum Genet.* 2008;82(1):39-47.
79. Grinspon RP, Rey RA. Molecular Characterization of XX Maleness. *Int J Mol Sci.* 2019;20(23).
80. Domenice S, Machado AZ, Ferreira FM, Ferraz-de-Souza B, Lerario AM, Lin L, et al. Wide spectrum of NR5A1-related phenotypes in 46,XY and 46,XX individuals. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2016;108(4):309-20.
81. Bashamboo A, Donohoue PA, Vilain E, Rojo S, Calvel P, Seneviratne SN, et al. A recurrent p.Arg92Trp variant in steroidogenic factor-1 (NR5A1) can act as a molecular switch in human sex development. *Hum Mol Genet.* 2016;25(16):3446-53.
82. Igarashi M, Takasawa K, Hakoda A, Kanno J, Takada S, Miyado M, et al. Identical NR5A1 Missense Mutations in Two Unrelated 46,XX Individuals with Testicular Tissues. *Hum Mutat.* 2017;38(1):39-42.



83. Takasawa K, Igarashi M, Ono M, Takemoto A, Takada S, Yamataka A, et al. Phenotypic Variation in 46,XX Disorders of Sex Development due to the NR5A1 p.R92W Variant: A Sibling Case Report and Literature Review. *Sex Dev.* 2017;11(5-6):284-8.
84. Baetens D, Stoop H, Peelman F, Todeschini AL, Rosseel T, Coppieters F, et al. NR5A1 is a novel disease gene for 46,XX testicular and ovotesticular disorders of sex development. *Genet Med.* 2017;19(4):367-76.
85. Swartz JM, Ciarlo R, Guo MH, Abrha A, Weaver B, Diamond DA, et al. A 46,XX Ovotesticular Disorder of Sex Development Likely Caused by a Steroidogenic Factor-1 (NR5A1) Variant. *Horm Res Paediatr.* 2017;87(3):191-5.
86. Knarston IM, Robevska G, van den Bergen JA, Eggers S, Croft B, Yates J, et al. NR5A1 gene variants repress the ovarian-specific WNT signaling pathway in 46,XX disorders of sex development patients. *Hum Mutat.* 2019;40(2):207-16.
87. Pelletier J, Bruening W, Li FP, Haber DA, Glaser T, Housman DE. WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. *Nature.* 1991;353(6343):431-4.
88. McTaggart SJ, Algar E, Chow CW, Powell HR, Jones CL. Clinical spectrum of Denys-Drash and Frasier syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2001;16(4):335-9.
89. Gomes NL, de Paula LCP, Silva JM, Silva TE, Lerario AM, Nishi MY, et al. A 46,XX testicular disorder of sex development caused by a Wilms' tumour Factor-1 (WT1) pathogenic variant. *Clin Genet.* 2019;95(1):172-6.
90. Eozenou C, Gonen N, Touzon MS, Jorgensen A, Yatsenko SA, Fusee L, et al. Testis formation in XX individuals resulting from novel pathogenic variants in Wilms' tumor 1 (WT1) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(24):13680-8.
91. Sirokha D, Gorodna O, Vitrenko Y, Zelinska N, Ploski R, Nef S, Jaruzelska J, Kusz-Zamelczyk K, Livshits L. A Novel WT1 Mutation Identified in a 46,XX Testicular/Ovotesticular DSD Patient Results in the Retention of Intron 9. *Biology (Basel).* 2021;10(12):1248.
92. Kirino S, Yogi A, Adachi E, Nakatani H, Gau M, Iemura R, Yamano H, Kanamori T, Mori T, Sohara E, Uchida S, Okamoto K, Udagawa T, Takasawa K, Morio T, Kashimada K. Phenotypic Variation in 46,XX Disorders of Sex Development due to the 4th Zinc Finger Domain Variant of WT1: A Familial Case Report. *Sex Dev.* 2023 Feb 16.
93. Délot EC, Vilain E. Towards improved genetic diagnosis of human differences of sex development. *Nat Rev Genet.* 2021;22(9):588-602.
94. Audi L, Ahmed SF, Krone N, Cools M, McElreavey K, Holterhus PM, et al. Genetics in endocrinology: Approaches to molecular genetic diagnosis in the management of differences/disorders of sex development (DSD): position paper of EU COST Action BM 1303 'DSDnet'. *Eur J Endocrinol.* 2018;179(4):R197-r206.

95. Alhomaidah D, McGowan R, Ahmed SF. The current state of diagnostic genetics for conditions affecting sex development. *Clin Genet*. 2017;91(2):157-62.
96. Pinkel D, Gray JW, Trask B, van den Engh G, Fuscoe J, van Dekken H. Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:151-7.
97. Gao X, Chen G, Huang J, Bai Q, Zhao N, Shao M, et al. Clinical, cytogenetic, and molecular analysis with 46,XX male sex reversal syndrome: case reports. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(3):431-5.
98. Eijk-Van Os PG, Schouten JP. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®) for the detection of copy number variation in genomic sequences. *Methods Mol Biol*. 2011;688:97-126.
99. Nagy O, Kárteszi J, Hartwig M, Bertalan R, Jávorszky E, Erhardt É, et al. The importance of the multiplex ligation-dependent probe amplification in the identification of a novel two-exon deletion of the NR5A1 gene in a patient with 46,XY differences of sex development. *Mol Biol Rep*. 2019;46(5):5595-601.
100. Tannour-Louet M, Han S, Corbett ST, Louet JF, Yatsenko S, Meyers L, et al. Identification of de novo copy number variants associated with human disorders of sexual development. *PLoS One*. 2010;5(10):e15392.
101. O'Connell MA, Atlas G, Ayers K, Sinclair A. Establishing a Molecular Genetic Diagnosis in Children with Differences of Sex Development: A Clinical Approach. *Horm Res Paediatr*. 2023;96(2):128-143.
102. Achermann JC, Domenice S, Bachega TA, Nishi MY, Mendonca BB. Disorders of sex development: effect of molecular diagnostics. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(8):478-88.
103. Arboleda VA, Lee H, Sánchez FJ, Délot EC, Sandberg DE, Grody WW, et al. Targeted massively parallel sequencing provides comprehensive genetic diagnosis for patients with disorders of sex development. *Clin Genet*. 2013;83(1):35-43.
104. Baxter RM, Arboleda VA, Lee H, Barseghyan H, Adam MP, Fechner PY, et al. Exome sequencing for the diagnosis of 46,XY disorders of sex development. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(2):E333-44.
105. Wang H, Zhang L, Wang N, Zhu H, Han B, Sun F, et al. Next-generation sequencing reveals genetic landscape in 46, XY disorders of sexual development patients with variable phenotypes. *Hum Genet*. 2018;137(3):265-77.
106. Xu Y, Wang Y, Li N, Yao R, Li G, Li J, et al. New insights from unbiased panel and whole-exome sequencing in a large Chinese cohort with disorders of sex development. *Eur J Endocrinol*. 2019;181(3):311-23.
107. Eggers S, Sadedin S, van den Bergen JA, Robevska G, Ohnesorg T, Hewitt J, et al. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biol*. 2016;17(1):243.

108. Kim JH, Kang E, Heo SH, Kim GH, Jang JH, Cho EH, et al. Diagnostic yield of targeted gene panel sequencing to identify the genetic etiology of disorders of sex development. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;444:19-25.
109. Kim JW, Song SH, Sung SR, Shim SH. Exome sequencing for the patients with SRY-negative 46,XX testicular disorder of sex development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021;260:240-3.
110. Bashamboo A, Eozenou C, Jorgensen A, Bignon-Topalovic J, Siffroi JP, Hyon C, et al. Loss of Function of the Nuclear Receptor NR2F2, Encoding COUP-TF2, Causes Testis Development and Cardiac Defects in 46,XX Children. *Am J Hum Genet*. 2018;102(3):487-93.
111. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
112. Jian X, Liu X. In Silico Prediction of Deleteriousness for Nonsynonymous and Splice-Altering Single Nucleotide Variants in the Human Genome. *Methods Mol Biol*. 2017;1498:191-7.
113. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-81.
114. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013;Chapter 7:Unit7.20.
115. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010 Aug;7(8):575-6.
116. Shihab HA, Gough J, Mort M, Cooper DN, Day IN, Gaunt TR. Ranking non-synonymous single nucleotide polymorphisms based on disease concepts. *Hum Genomics*. 2014;8(1):11.
117. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*. 2014;46(3):310-5.
118. Davydov EV, Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLoS Comput Biol*. 2010;6(12):e1001025.
119. Stelzer G, Plaschkes I, Oz-Levi D, Alkelai A, Olender T, Zimmerman S, et al. VarElect: the phenotype-based variation prioritizer of the GeneCards Suite. *BMC Genomics*. 2016;17 Suppl 2(Suppl 2):444.
120. Quinodoz M, Royer-Bertrand B, Cisarova K, Di Gioia SA, Superti-Furga A, Rivolta C. DOMINO: Using Machine Learning to Predict Genes Associated with Dominant Disorders. *Am J Hum Genet*. 2017;101(4):623-9.
121. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.

122. Del Valle I, Buonocore F, Duncan AJ, Lin L, Barenco M, Parnaik R, et al. A genomic atlas of human adrenal and gonad development. *Wellcome Open Res.* 2017;2:25.
123. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D638-d46.
124. Bult CJ, Blake JA, Smith CL, Kadin JA, Richardson JE. Mouse Genome Database (MGD) 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D801-d6.
125. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3):441-8.
126. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.
127. Prader A. Genital findings in the female pseudo-hermaphroditism of the congenital adrenogenital syndrome; morphology, frequency, development and heredity of the different genital forms. *Helv Paediatr Acta.* 1954;9(3):231-48.
128. Maiato H, Fairley EA, Rieder CL, Swedlow JR, Sunkel CE, Earnshaw WC. Human CLASP1 is an outer kinetochore component that regulates spindle microtubule dynamics. *Cell.* 2003;113(7):891-904.
129. Upadhyay K, Loke J, O V, Taragin B, Ostrer H. Biallelic mutations in FLNB cause a skeletal dysplasia with 46,XY gonadal dysgenesis by activating  $\beta$ -catenin. *Clin Genet.* 2018;93(2):412-6.
130. Reinton N, Haugen TB, Orstavik S, Skålhegg BS, Hansson V, Jahnsen T, et al. The gene encoding the C gamma catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase is a transcribed retroposon. *Genomics.* 1998;49(2):290-7.
131. Nagaraja MR, Gubbala SP, Delphine Silvia CRW, Amanchy R. Molecular diagnostics of disorders of sexual development: an Indian survey and systems biology perspective. *Syst Biol Reprod Med.* 2019;65(2):105-20.
132. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D447-52.
133. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D523-d31.
134. Venselaar H, Te Beek TA, Kuipers RK, Hekkelman ML, Vriend G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:548.
135. Escalier D. Knockout mice in the service of reproduction. *Gynecol Obstet Fertil.* 2008;36(12):1224-9.

136. Polanco JC, Wilhelm D, Davidson TL, Knight D, Koopman P. Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Hum Mol Genet.* 2010;19(3):506-16.
137. Selver Eklioglu B, Atabek ME, Akyurek N, Ari Yuca S, Piskin M. The 46XX Ovotesticular Disorders of Sexual Development with Dismorphic Features. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2015;28(6):e157-9.
138. Wenger AM, Guturu H, Bernstein JA, Bejerano G. Systematic reanalysis of clinical exome data yields additional diagnoses: implications for providers. *Genet Med.* 2017;19(2):209-14.
139. Rabbani B, Mahdieh N, Hosomichi K, Nakaoka H, Inoue I. Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J Hum Genet.* 2012;57(10):621-32.
140. Giese K, Pagel J, Grosschedl R. Distinct DNA-binding properties of the high mobility group domain of murine and human SRY sex-determining factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(8):3368-72.
141. Schepers GE, Teasdale RD, Koopman P. Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev Cell.* 2002 Aug;3(2):167-70.
142. Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol.* 2000;227(2):239-55.
143. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature.* 1994;372(6506):525-30.
144. Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Préhu MO, Puliti A, et al. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet.* 1998;18(2):171-3.
145. Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VI, Lützkendorf S, van de Kant HJ, Wegner M, et al. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development.* 2004;131(9):1891-901.
146. Lavery R, Chassot AA, Pauper E, Gregoire EP, Klopfenstein M, de Rooij DG, et al. Testicular differentiation occurs in absence of R-spondin1 and Sox9 in mouse sex reversals. *PLoS Genet.* 2012;8(12):e1003170.
147. Barrionuevo F, Georg I, Scherthan H, Lécureuil C, Guillou F, Wegner M, et al. Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. *Dev Biol.* 2009;327(2):301-12.
148. Sock E, Schmidt K, Hermanns-Borgmeyer I, Bösl MR, Wegner M. Idiopathic weight reduction in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor Sox8. *Mol Cell Biol.* 2001;21(20):6951-9.

149. O'Bryan MK, Takada S, Kennedy CL, Scott G, Harada S, Ray MK, et al. Sox8 is a critical regulator of adult Sertoli cell function and male fertility. *Dev Biol.* 2008;316(2):359-70.
150. Portnoi MF, Dumargne MC, Rojo S, Witchel SF, Duncan AJ, Eozenou C, et al. Mutations involving the SRY-related gene SOX8 are associated with a spectrum of human reproductive anomalies. *Hum Mol Genet.* 2018;27(7):1228-40.
151. Inoue K, Khajavi M, Ohyama T, Hirabayashi S, Wilson J, Reggin JD, et al. Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat Genet.* 2004;36(4):361-9.
152. Wilhelm D, Washburn LL, Truong V, Fellous M, Eicher EM, Koopman P. Antagonism of the testis- and ovary-determining pathways during ovotestis development in mice. *Mech Dev.* 2009;126(5-6):324-36.
153. Rahmoun M, Lavery R, Laurent-Chaballier S, Bellora N, Philip GK, Rossitto M, et al. In mammalian foetal testes, SOX9 regulates expression of its target genes by binding to genomic regions with conserved signatures. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(12):7191-211.
154. Südbeck P, Schmitz ML, Baeuerle PA, Scherer G. Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nat Genet.* 1996;13(2):230-2.
155. Haseeb A, Lefebvre V. The SOXE transcription factors-SOX8, SOX9 and SOX10-share a bi-partite transactivation mechanism. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(13):6917-31.
156. Mimori-Kiyosue Y, Grigoriev I, Lansbergen G, Sasaki H, Matsui C, Severin F, et al. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *J Cell Biol.* 2005;168(1):141-53.
157. Akhmanova A, Hoogenraad CC, Drabek K, Stepanova T, Dortland B, Verkerk T, et al. Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell.* 2001;104(6):923-35.
158. Gasca S, Canizares J, De Santa Barbara P, Mejean C, Poulat F, Berta P, et al. A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(17):11199-204.
159. Malki S, Berta P, Poulat F, Boizet-Bonhoure B. Cytoplasmic retention of the sex-determining factor SOX9 via the microtubule network. *Exp Cell Res.* 2005;309(2):468-75.
160. Muroyama A, Lechler T. Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells. *Development.* 2017;144(17):3012-21.
161. Jaillard S, Akloul L, Beaumont M, Hamdi-Roze H, Dubourg C, Odent S, et al. Array-CGH diagnosis in ovarian failure: identification of new molecular actors for ovarian physiology. *J Ovarian Res.* 2016;9(1):63.
162. van der Flier A, Sonnenberg A. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1538(2-3):99-117.

163. Krakow D, Robertson SP, King LM, Morgan T, Sebald ET, Bertolotto C, et al. Mutations in the gene encoding filamin B disrupt vertebral segmentation, joint formation and skeletogenesis. *Nat Genet.* 2004;36(4):405-10.
164. Tew SR, Hardingham TE. Regulation of SOX9 mRNA in human articular chondrocytes involving p38 MAPK activation and mRNA stabilization. *J Biol Chem.* 2006;281(51):39471-9.
165. Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, et al. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.* 2004;18(9):1072-87.
166. Loke J, Pearlman A, Radi O, Zuffardi O, Giussani U, Pallotta R, et al. Mutations in MAP3K1 tilt the balance from SOX9/FGF9 to WNT/ $\beta$ -catenin signaling. *Hum Mol Genet.* 2014;23(4):1073-83.
167. Murakami S, Kan M, McKeehan WL, de Crombrughe B. Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(3):1113-8.
168. Woods A, Wang G, Beier F. RhoA/ROCK signaling regulates Sox9 expression and actin organization during chondrogenesis. *J Biol Chem.* 2005;280(12):11626-34.
169. Jeon YJ, Choi JS, Lee JY, Yu KR, Ka SH, Cho Y, et al. Filamin B serves as a molecular scaffold for type I interferon-induced c-Jun NH2-terminal kinase signaling pathway. *Mol Biol Cell.* 2008;19(12):5116-30.
170. Ostrer H. Disorders of sex development (DSDs): an update. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(5):1503-9.
171. Bjerregaard VA, Schönewolf-Greulich B, Juel Rasmussen L, Desler C, Tümer Z. Mitochondrial Function in Gilles de la Tourette Syndrome Patients With and Without Intragenic IMMP2L Deletions. *Front Neurol.* 2020;11:163.
172. Lu B, Poirier C, Gaspar T, Gratzke C, Harrison W, Busija D, et al. A mutation in the inner mitochondrial membrane peptidase 2-like gene (Immp2l) affects mitochondrial function and impairs fertility in mice. *Biol Reprod.* 2008;78(4):601-10.
173. Li J, Xu H, Liu X, Cai Y, Lan X. Insight into the Possible Formation Mechanism of the Intersex Phenotype of Lanzhou Fat-Tailed Sheep Using Whole-Genome Resequencing. *Animals (Basel).* 2020;10(6).
174. Ledig S, Röpke A, Wieacker P. Copy number variants in premature ovarian failure and ovarian dysgenesis. *Sex Dev.* 2010;4(4-5):225-32.
175. Norling A, Lindén Hirschberg A, Iwarsson E, Persson B, Wedell A, Barbaro M. Novel candidate genes for 46,XY gonadal dysgenesis identified by a customized 1 M array-CGH platform. *Eur J Med Genet.* 2013;56(12):661-8.

176. Beebe SJ, Oyen O, Sandberg M, Frøysa A, Hansson V, Jahnsen T. Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis--representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Endocrinol.* 1990;4(3):465-75.
177. van Dam S, Vösa U, van der Graaf A, Franke L, de Magalhães JP. Gene co-expression analysis for functional classification and gene-disease predictions. *Brief Bioinform.* 2018;19(4):575-92.



## **ANEXOS**

**Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO \_ HCFMUSP**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:.....  
 NOME DO PAI:.....  
 NOME DA MAE:.....  
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE No:.....  
 DATA DE NASCIMENTO: ...../...../..... SEXO: M  F   
 ENDEREÇO:..... No.....  
 COMPLEMENTO.....  
 BAIRRO:..... CIDADE:.....  
 CEP:..... TELEFONE (.....).....

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

**II- DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA**

1- **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** “ PESQUISA DE MUTAÇÕES NO STRAB8 EM PACIENTES PORTADORES DE DISTÚRBIOS DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL 46,XX”.

2- **PESQUISADOR:** Berenice Bilharino Mendonça  
**CARGO/FUNÇÃO:** Médica.... **INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº:** 20305  
**UNIDADE DO HCFMUSP:** Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento - Laboratório de Hormônios LIM42

3- **AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**  
 SEM RISCO  RISCO MINIMO  RISCO MEDIO   
 RISCO BAIXO  RISCO MAIOR   
 (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4- **DURAÇÃO DA PESQUISA:** 12 meses

Rubrica do sujeito da pesquisa ou responsável: ..... Rubrica do pesquisador:  
 .....

---

### III- REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

- 1- **Justificativa e os objetivos da pesquisa:** Convidamos você para participar de um estudo que consiste na procura de alterações na sequência codificadora e promotora do gene Stra8 que poderia ser a causa das alterações do desenvolvimento dos ovários.
- 2- **Procedimentos que serão realizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que serão experimentais:** você terá que colher uma amostra de sangue (10ml) para extração de DNA e estudo do gene, o sangue será coletado através de uma picada com agulha estéril descartável na veia do braço.
- 3- **Desconforto e riscos esperados:** O desconforto dessa coleta é a dor da picada e eventualmente o aparecimento de um pequeno hematoma (mancha arroxeadada em torno da picada) que desaparecerá um pouco menos de uma semana.
- 4- **Benefícios que poderão ser obtidos:** Contribuir para melhor compreensão de sua doença. Este trabalho pode dar fundamentos para tratamento futuro de outros pacientes com o mesmo problema que você apresenta.

---

### IV- ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE A GARANTIA DO SUJEITO DA PESQUISA:

- 1- **Acesso a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados a pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas:** Você terá acesso a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados a pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.
- 2- **Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo a continuidade da assistência.** Você terá total liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar de estudo, sem que isto traga prejuízo a continuidade da assistência.
- 3- **Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.** Esclarecemos que todos os seus dados são confidenciais e serão mantidos em sigilo, garantindo assim sua privacidade.
- 4- **Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos a saúde, decorrentes da pesquisa.** Você terá disponibilidade de assistência ao HCFMUSP no serviço de Endocrinologia da disciplina de Endocrinologia e Metabologia por eventuais danos à saúde, decorrentes desta pesquisa.
- 5- **Viabilidade de indenizações por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.** Não se aplica.

---

### V- INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRENCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Profa. Dra Berenice Bilharino de Mendonça e/ou Elaine M. Frade Costa  
Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 155, 2º andar, bloco 6. Telefones: (11) 3069-7512 ou (11) 3069-6330.

---

### VI- OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES: não há

---

### VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_ .

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador (carimbo ou nome legível)

## Anexo B - Estudos moleculares previamente realizados nos pacientes que compõem a casuística

ID	Pesquisa do Gene <i>SRY</i> / Resultado	MLPA (Intersex P185)			<i>Array-CGH</i> *
		<i>DAX-1</i>	<i>WNT4</i>	<i>SOX9</i>	
P 1	✓ Negativa				não identificou ganhos ou perdas de segmentos
P 2	✓ Negativa				não identificou ganhos ou perdas de segmentos
P 3	✓ Negativa	Normal	Normal	Normal	
P 4	✓ Negativa	Normal	Normal	Normal	
P 5	✓ Negativa	Normal	Normal	Normal	duplicação 15q26.1 (93571267-93586680)x3 - Provavelmente benigna
P 6	✓ Negativa				
P 7a	✓ Negativa				não identificou ganhos ou perdas de segmentos
P 7b	✓ Negativa				
P 8	✓ Negativa	Normal	Normal	Normal	não identificou ganhos ou perdas de segmentos
P 9	✓ Negativa	Normal	Normal	Normal	
P 10	✓ Negativa	Normal	Normal	Normal	
P 11	✓ Negativa	Normal	Normal	Normal	deleção 20p11.21 (25331954_25492224)x1 - VUS
P 12	✓ Negativa	Normal	Normal	Normal	
P 13	✓ Negativa	Normal	Normal	Normal	
P 14	✓ Negativa	Normal	Normal	Normal	não identificou ganhos ou perdas de segmentos
P 15	✓ Negativa				
P 16	✓ Negativa				
P 17	✓ Negativa				
P 18	✓ Negativa				
P 19	✓ Negativa	Normal	Normal	Normal	
P 20	✓ Negativa	Normal	Normal	Normal	
P 21	✓ Negativa				
P 22	✓ Negativa	Normal	Normal	Normal	duplicação 2q14.2 (120166608-120284200)x3- VUS
P 23	✓ Negativa				não identificou ganhos ou perdas de segmentos

P, Paciente; MLPA, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; *Array-CGH*, Híbridação Genômica Comparativa (\*Rastreamento de rearranjos cromossômicos não balanceados por microarranjo genômico); VUS, *Variant of Uncertain Significance*.

## **Anexo C - Termo de assentimento do biobanco do laboratório de hormônios e genética molecular LIM/42 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP**

### **TERMO DE ASSENTIMENTO**

No Laboratório de Hormônios e Genética Molecular do LIM/42 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM/42-HCFMUSP), nós fazemos pesquisas. Com as pesquisas queremos encontrar maneiras de melhorar a vida de pessoas doentes, e às vezes até descobrimos novos tratamentos, ou exames que ajudem a descobrir que doença a pessoa tem.

Você está sendo convidado (a) a responder às perguntas deste questionário de forma totalmente voluntária. Antes de concordar em doar seu material é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Os pesquisadores deverão responder a todas as suas dúvidas antes de você concordar em participar. Você tem o direito de desistir de doar o seu material a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

Para realização de seu tratamento ou da pesquisa em que concordou participar, foram solicitados exames de laboratório de rotina ou para pesquisa. Depois de fazer esses exames, vai sobrar um pouco de material (sangue, urina, fezes ou outros) que normalmente seria desprezado. Nós estamos solicitando sua autorização para guardar esse material excedente no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular do LIM/42 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM/42-HCFMUSP).

Se você concordar, esse material biológico (sangue, urina, fezes ou outros) ficará guardado no Biobanco LIM/42-HCFMUSP. Nesse Biobanco trabalham pessoas bem treinadas, que irão cuidar das amostras que serão guardadas em freezer para a realização de pesquisas futuras. O seu material poderá ser utilizado para sequenciamento de exons (exoma) e / ou sequenciamento de todos os seus genes. As informações dos seus dados individuais serão colocadas em um banco de dados de acesso controlado. Isso significa que somente os pesquisadores que solicitarem e obtiverem permissão para usar as informações para um projeto de pesquisa específico poderão acessar as informações. Os dados genômicos e as informações de saúde não terão a identificação com o seu nome ou outra informação que possa ser usada para identificá-lo. Os pesquisadores que tiverem acesso as informações no banco de dados concordarão em não tentar te identificar.

Seu material será identificado apenas por código, seu nome e as informações sobre você serão guardados em outro local. As informações que serão registradas sobre você são: idade, sexo, onde você mora, se você tem alguma doença, resultados de exames, entre outras. Apenas os responsáveis pelo Biobanco terão acesso a estas informações.

Você pode conversar sobre nossa proposta com seu(s) pai(s) e amigo(s). Você pode decidir se quer autorizar ou não depois de ter conversado, não é preciso decidir imediatamente. Pode haver algumas palavras que você não entenda ou coisas que você precisa de explicações mais detalhadas. Por favor, peça que a qualquer momento eu explico novamente. Não tenha

pressa de decidir se deseja ou não que seu material biológico fique guardado no Biobanco LIM42-HCFMUSP e seja usado para futuras pesquisas. Ninguém ficará bravo com você se você disser não; a escolha é sua. Você pode dizer “sim” agora e mudar de ideia depois e tudo continuará bem. Isso não vai prejudicar os cuidados que você recebe.

Se você quiser retirar seu consentimento, você ou seus pais (responsáveis legais) devem informar os responsáveis pelo Biobanco por escrito.

**Entendo que a interpretação clínica dos resultados é realizada com base no conhecimento médico/científico disponível até a data de análise do exame, nas informações clínicas do relatório médico e no tipo de estudo solicitado. À medida que novas descobertas científicas forem publicadas, contribuindo para maior conhecimento médico sobre a hipótese diagnóstica ou se acaso surgirem novos sinais clínicos, a interpretação dos resultados pode mudar. Neste caso, o médico responsável pelo paciente poderá solicitar a reanálise dos dados obtidos no exame.**

**Compreendo que através da realização deste exame poderão ser obtidas informações genéticas do indivíduo estudado ou dos membros de sua família que não estão relacionadas com a preocupação médica para a qual este exame foi solicitado. Caso sejam identificadas variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas que afetem algum dos genes selecionados pelo Colégio Americano de Genética Médica e Genômica como de notificação obrigatória (ACMG) Tabela 1, concordo que elas sejam informadas como achados incidentais. Se você NÃO DESEJA receber estas informações, por favor, indique sua opção colocando suas iniciais aqui: \_\_\_\_\_**

Ao assinar este documento, dou meu consentimento para realizar o teste de sequenciamento do exoma.

Este Termo foi revisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, que avalia projetos de pesquisa (s) e assegura que os mesmos não tragam nenhum dano ao(s) participante(s) da(s) pesquisa(s). Se você precisar de mais informações sobre este Termo ou sobre os seus direitos, fale com este Comitê de Ética que fica na Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Cerqueira César - 05403-010 - São Paulo - SP - Brasil - E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br. O horário de atendimento é de segunda à sexta-feira, das 8h às 16 horas.

Se você quiser falar com o Biobanco LIM/42-HCFMUSP, o endereço é Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 255. CEP 05403-000 São Paulo -SP –Brasil. Telefones: (55+11) 2661-7512 ou 2661-6148. Fax: (55+11) 2661-7519. E-mail beremen@usp.br O horário de atendimento é de segunda à sexta-feira, das 9 às 16 horas. A utilização de seu material biológico (sangue, entre outros) deverá ser aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sendo que seu nome não aparecerá quando os resultados da pesquisa forem apresentados em eventos científicos e/ ou publicados em revistas científicas.

Solicito que manifeste o seu desejo quanto às seguintes alternativas:

- ( ) I- Necessidade de novo consentimento a cada pesquisa
- ( ) II- Dispensa de novo consentimento a cada pesquisa

Você prefere que outra pessoa o represente e seja consultada a cada nova pesquisa?

- ( ) Sim ( ) Não.

Se sim, qual o nome da pessoa e como podemos entrar em contato (endereço, telefone, e-mail, grau de parentesco ou de relação com o participante da pesquisa).

Você poderá saber, a qualquer tempo, as informações sobre resultados de pesquisa realizados com o seu material biológico.

Você não receberá nenhum pagamento, nem terá que pagar nada, para que seu material biológico fique guardado no Biobanco LIM42-HCFMUSP e utilizado para pesquisas.

Este Termo deverá ser assinado em duas vias idênticas, sendo que uma ficará com você e uma ficará guardada no Biobanco.

Se você autorizar que seu material biológico fique guardado no Biobanco LIM42-HCFMUSP, para fins de pesquisa(s), seu(s) responsável(is) também terá(ão) que concordar assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Mas caso você não deseje autorizar, mesmo que seu(s) responsável(is) concorde(m), o seu material biológico não será guardado no Biobanco LIM42-HCFMUSP.

Obrigado por ler e/ou ouvir estas informações. Se você concordar que seu material biológico fique guardado no Biobanco LIM42-HCFMUSP e seja usado para pesquisas, assine abaixo.

Nome da criança/adolescente: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome da pessoa que obteve o consentimento: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome do responsável pelo Biobanco: Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça

Assinatura \_\_\_\_\_

## **Anexo D - Termo de assentimento do biobanco do laboratório de hormônios e genética molecular LIM/42 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP**

### **TERMO DE ASSENTIMENTO**

No Laboratório de Hormônios e Genética Molecular do LIM/42 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM/42-HCFMUSP), nós fazemos pesquisas. Com as pesquisas queremos encontrar maneiras de melhorar a vida de pessoas doentes, e às vezes até descobrimos novos tratamentos, ou exames que ajudem a descobrir que doença a pessoa tem.

Você está sendo convidado (a) a responder às perguntas deste questionário de forma totalmente voluntária. Antes de concordar em doar seu material é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Os pesquisadores deverão responder a todas as suas dúvidas antes de você concordar em participar. Você tem o direito de desistir de doar o seu material a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

Para realização de seu tratamento ou da pesquisa em que concordou participar, foram solicitados exames de laboratório de rotina ou para pesquisa. Depois de fazer esses exames, vai sobrar um pouco de material (sangue, urina, fezes ou outros) que normalmente seria desprezado. Nós estamos solicitando sua autorização para guardar esse material excedente no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular do LIM/42 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM/42-HCFMUSP).

Se você concordar, esse material biológico (sangue, urina, fezes ou outros) ficará guardado no Biobanco LIM/42-HCFMUSP. Nesse Biobanco trabalham pessoas bem treinadas, que irão cuidar das amostras que serão guardadas em freezer para a realização de pesquisas futuras. O seu material poderá ser utilizado para sequenciamento de éxons (exoma) e / ou sequenciamento de todos os seus genes. As informações dos seus dados individuais serão colocadas em um banco de dados de acesso controlado. Isso significa que somente os pesquisadores que solicitarem e obtiverem permissão para usar as informações para um projeto de pesquisa específico poderão acessar as informações. Os dados genômicos e as informações de saúde não terão a identificação com o seu nome ou outra informação que possa ser usada para identificá-lo. Os pesquisadores que tiverem acesso as informações no banco de dados concordarão em não tentar te identificar.

Seu material será identificado apenas por código, seu nome e as informações sobre você serão guardados em outro local. As informações que serão registradas sobre você são: idade, sexo, onde você mora, se você tem alguma doença, resultados de exames, entre outras. Apenas os responsáveis pelo Biobanco terão acesso a estas informações.

Você pode conversar sobre nossa proposta com seu(s) pai(s) e amigo(s). Você pode decidir se quer autorizar ou não depois de ter conversado, não é preciso decidir imediatamente. Pode haver algumas palavras que você não entenda ou coisas que você precisa de explicações mais detalhadas. Por favor, peça que a qualquer momento eu explico novamente. Não tenha



pressa de decidir se deseja ou não que seu material biológico fique guardado no Biobanco LIM42-HCFMUSP e seja usado para futuras pesquisas. Ninguém ficará bravo com você se você disser não; a escolha é sua. Você pode dizer “sim” agora e mudar de ideia depois e tudo continuará bem. Isso não vai prejudicar os cuidados que você recebe.

Se você quiser retirar seu consentimento, você ou seus pais (responsáveis legais) devem informar os responsáveis pelo Biobanco por escrito.

**Entendo que a interpretação clínica dos resultados é realizada com base no conhecimento médico/científico disponível até a data de análise do exame, nas informações clínicas do relatório médico e no tipo de estudo solicitado. À medida que novas descobertas científicas forem publicadas, contribuindo para maior conhecimento médico sobre a hipótese diagnóstica ou se acaso surgirem novos sinais clínicos, a interpretação dos resultados pode mudar. Neste caso, o médico responsável pelo paciente poderá solicitar a reanálise dos dados obtidos no exame.**

**Compreendo que através da realização deste exame poderão ser obtidas informações genéticas do indivíduo estudado ou dos membros de sua família que não estão relacionadas com a preocupação médica para a qual este exame foi solicitado. Caso sejam identificadas variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas que afetem algum dos genes selecionados pelo Colégio Americano de Genética Médica e Genômica como de notificação obrigatória (ACMG) Tabela 1, concordo que elas sejam informadas como achados incidentais. Se você NÃO DESEJA receber estas informações, por favor, indique sua opção colocando suas iniciais aqui: \_\_\_\_\_**

Ao assinar este documento, dou meu consentimento para realizar o teste de sequenciamento do exoma.

Este Termo foi revisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, que avalia projetos de pesquisa (s) e assegura que os mesmos não tragam nenhum dano ao(s) participante(s) da(s) pesquisa(s). Se você precisar de mais informações sobre este Termo ou sobre os seus direitos, fale com este Comitê de Ética que fica na Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Cerqueira César - 05403-010 - São Paulo - SP - Brasil - E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br. O horário de atendimento é de segunda à sexta-feira, das 8h às 16 horas.

Se você quiser falar com o Biobanco LIM/42-HCFMUSP, o endereço é Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 255. CEP 05403-000 São Paulo -SP –Brasil. Telefones: (55+11) 2661-7512 ou 2661-6148. Fax: (55+11) 2661-7519. E-mail beremen@usp.br O horário de atendimento é de segunda à sexta-feira, das 9 às 16 horas. A utilização de seu material biológico (sangue, entre outros) deverá ser aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sendo que seu nome não aparecerá quando os resultados da pesquisa forem apresentados em eventos científicos e/ ou publicados em revistas científicas.

Solicito que manifeste o seu desejo quanto às seguintes alternativas:

- ( ) I- Necessidade de novo consentimento a cada pesquisa
- ( ) II- Dispensa de novo consentimento a cada pesquisa

Você prefere que outra pessoa o represente e seja consultada a cada nova pesquisa?

- ( ) Sim ( ) Não.

---

Se sim, qual o nome da pessoa e como podemos entrar em contato (endereço, telefone, e-mail, grau de parentesco ou de relação com o participante da pesquisa).

---

Você poderá saber, a qualquer tempo, as informações sobre resultados de pesquisa realizados com o seu material biológico.

Você não receberá nenhum pagamento, nem terá que pagar nada, para que seu material biológico fique guardado no Biobanco LIM42-HCFMUSP e utilizado para pesquisas.

Este Termo deverá ser assinado em duas vias idênticas, sendo que uma ficará com você e uma ficará guardada no Biobanco.

Se você autorizar que seu material biológico fique guardado no Biobanco LIM42-HCFMUSP, para fins de pesquisa(s), seu(s) responsável(is) também terá(ão) que concordar assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Mas caso você não deseje autorizar, mesmo que seu(s) responsável(is) concorde(m), o seu material biológico não será guardado no Biobanco LIM42-HCFMUSP.

Obrigado por ler e/ou ouvir estas informações. Se você concordar que seu material biológico fique guardado no Biobanco LIM42-HCFMUSP e seja usado para pesquisas, assine abaixo.

Nome da criança/adolescente: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome da pessoa que obteve o consentimento: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome do responsável pelo Biobanco: Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça

Assinatura \_\_\_\_\_

### Anexo E - Critérios de classificação de patogenicidade dos programas *in silico* utilizados na filtragem das VCF

Ferramenta	Classificação	Critérios patogênicos	Endereço
Modelo de predição para alteração do sítio de <i>súplice</i>			
<b><i>dbscSNV_ADA_SCORE</i></b>	Entre 0 e 1	> 0,7	
<b><i>dbscSNV_RF_SCORE</i></b>			
Modelo de predição de patogenicidade			
<b>SIFT</b>	T: tolerado; D: deletério	D	<a href="http://sift.jcvi.org/">http://sift.jcvi.org/</a>
<b>CADD</b>	Numérico	$\geq 15$	<a href="http://cadd.gs.washington.edu/">http://cadd.gs.washington.edu/</a>
<b>Mutation Assessor</b>	L: efeito leve, M: moderado; H: alto	M e H	<a href="http://mutationassessor.org/">http://mutationassessor.org/</a>
<b>Mutation Taster</b>	N e P: não deletério/polimorfismo; A e D: deletério	A e D	<a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a>
<b>PROVEAN</b>	N: neutro; D: deletério	D	<a href="http://provean.jcvi.org/index.php">http://provean.jcvi.org/index.php</a>
<b>Polyphen-2</b>	B: benigno; P: possivelmente patogênico, D: deletério	P e D	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2</a>
<b>FATHMM</b>	T: tolerado; D: deletério	D	<a href="http://fathmm.biocompute.org.uk/">http://fathmm.biocompute.org.uk/</a>
Modelo par grau de conservação do aminoácido envolvido			
<b>GERP</b>	Entre -12.3 a 6.17	$\geq 2$	<a href="http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html">http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html</a>

## Anexo F - Tabela com os critérios utilizados para qualificar as variantes alélicas segundo o American College of Medical Genetics (ACMG)

<b>Critério muito forte para patogenicidade</b>	
PVS1	Variante <i>nonsense</i> , <i>frameshift</i> , em sítios de <i>splice</i> canônicos $\pm 1$ ou 2 codons de iniciação ou deleção de 1 ou vários éxons (null variant) em um gene no qual variantes com perda de função (LoF) são mecanismos conhecidos de doença.
<b>Critérios fortes para patogenicidade</b>	
PS1	Troca de aminoácidos já estabelecida como patogênica, independente da troca do nucleotídeo
PS2	Variante de novo em um paciente com doença sem história familiar (com paternidade confirmada)
PS3	Presença de estudos funcionais ( <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> ) bem estabelecidos que suportem o efeito prejudicial no gene ou sua prole
PS4	A prevalência da variante nos indivíduos afetados é significativamente maior quando comparada com a prevalência em controles
<b>Critérios moderados para patogenicidade</b>	
PM1	Variante localizada em uma região <i>hotspot</i> para mutações e/ou região importante já estabelecida com um domínio funcional da proteína, sem variantes descritas como benignas
PM2	Variante ausente nos bancos de dados populacionais (1000Genomes, gnomAD), ou presente em frequência extremamente baixa, para casos recessivos.
PM3	Variante detectada em trans com uma variante patogênica para as doenças recessivas
PM4	Modificação no tamanho da proteína causada por deleções ou inserções <i>in-frame</i> em região não repetitiva ou por variantes que perdem o códon de parada (tipo <i>stop-loss</i> )
PM5	Nova variante <i>missense</i> em um aminoácido que uma variante <i>missense</i> diferente já foi estabelecida com patogênica
PM6	Variante considerada <i>de novo</i> , sem confirmação de paternidade.
<b>Critérios fracos para patogenicidade</b>	
PP1	Segregação de uma variante (em um gene conhecido como causador da doença) com a doença em uma família com vários membros afetados
PP2	Variante <i>missense</i> em um gene com baixa taxa de variantes <i>missense</i> benignas e no qual esse tipo de variante é considerado um mecanismo de doença
PP3	Várias ferramentas computacionais suportam a evidência de efeito deletério no gene ou proteína (conservação evolutiva, impacto no <i>splicing</i> )
PP4	O fenótipo do paciente ou a história da família são bastante específicos de uma doença monogênica
PP5	Variante recém-publicada como patogênica, porém o laboratório não apresenta condições de fazer um estudo funcional independente
<b>Critérios fracos para benignidade</b>	
BP1	Variante <i>missense</i> em um gene no qual variantes com perda de função ( <i>LoF</i> ) são mecanismos conhecidos de doença
BP2	Variantes detectadas em trans com uma variante patogênica dominante com penetrância completa ou observada em cis com uma variante patogênica em qualquer herança
BP3	Deleções ou inserções <i>in frame</i> em região repetitivas sem função conhecida
BP4	Várias ferramentas computacionais sugerem ausência de efeito deletério no gene ou proteína (conservação evolutiva, impacto no <i>splicing</i> )
BP5	Variante encontrada em um caso com base molecular alternativa para a doença
BP6	Variante recém-publicada como benigna, porém o laboratório não apresenta condições de fazer um estudo funcional independente
BP7	Variante sinônima cujas ferramentas de predição <i>in silico</i> não predizem impacto na sequência consenso de <i>splicing</i> nem a criação de um novo sítio, e o nucleotídeo não é conservado
<b>Critérios fortes para benignidade</b>	
BS1	A frequência do alelo é maior que a esperada para a doença
BS2	Variante para a doença recessiva (em homocigose), dominante (em heterocigose) ou ligada ao X (hemizigose), com penetrância completa e de início precoce, observada em indivíduo adulto saudável
BS3	Presença de estudos funcionais ( <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> ) bem estabelecidos mostrando ausência de efeito prejudicial para a proteína ou <i>splicing</i>
BS4	Ausência de segregação nos indivíduos afetados na família
<b>Critério benigno por si só</b>	
BA1	Frequência alélica maior que 5% nos bancos de dados populacionais (1000Genomes, gnomAD)

Fonte: adaptado de Richards *et al.*<sup>126</sup>. PVS: critério muito forte para patogenicidade; PS: critério forte para patogenicidade; PM critério moderado para patogenicidade; PP, critério fraco para patogenicidade; BP critério fraco para benignidade; BS critério forte para benignidade; BA, critério benigno por si só. LoF: perda de função (de loss of function); 1000Genomes: 1000Genomes Project; gnomAD: *Genome Aggregation Database*.

## Anexo G - Normas para combinação dos critérios do ACMG/AMP para classificação das variantes alélicas

### Classificação de acordo com a combinação dos critérios ACMG

#### Variante patogênica

- (I) 1 critério muito forte para patogenicidade (PVS1) e
  - (a)  $\geq 1$  critério fortes para patogenicidade ( PS1- PS4) ou
  - (b)  $\geq 2$  critérios moderados para patogenicidade ( PM1- PM6) ou
  - (c) 1 critério moderado para patogenicidade (PM1-PM6) e 1 critério fraco para patogenicidade (PP1-PP5) ou
  - (d)  $\geq 2$  critérios fracos para patogenicidade ( PP1- PP5) ou
- (II)  $\geq 2$  critérios fortes para patogenicidade ( PS1-PS4) ou
- (III) 1 critério forte para patogenicidade ( PS1- PS4) e
  - (a)  $\geq 3$  critérios moderados para patogenicidade ( PM1-PM6) ou
  - (b) 2 critérios moderados para patogenicidade ( Pm1-PM6) e  $\geq 2$  critérios fracos para patogenicidade (PP1- PP5) ou
  - (c) 1 critério moderado para patogenicidade ( PM1- PM6) e  $\geq 4$  critérios fracos para patogenicidade (PP1- PP5)

#### Variante provavelmente patogênica

- (I) 1 critério muito forte para patogenicidade (PVS1) e 1 critério moderado para patogenicidade ( PM1- PM6) ou
- (II) 1 critério forte para patogenicidade ( PS1- PS4) e 1 ou 2 critérios moderados para patogenicidade ( Pm1- PM6) ou
- (III) 1 critério forte para patogenicidade ( PS1-PS4) e  $\geq 2$  critérios fracos para patogenicidade ( PP1- PP5) ou
- (IV)  $\geq 3$  critérios moderados para patogenicidade ( PM1- PM6) ou
- (V) 2 critérios moderados para patogenicidade ( Pm1- Pm6) e  $\geq 2$  critérios fracos para patogenicidade ( PP1- PP5) ou
- (VI) 1 critério moderado para patogenicidade ( PM1- PM6) e  $\geq 4$  critérios fracos para patogenicidade (PP1- PP5)

#### Variante de significado incerto

- (I) Outra combinação de critérios não mencionada acima ou
- (II) Critérios para benignidade e patogenicidade contraditórios

#### Variante provavelmente benigna

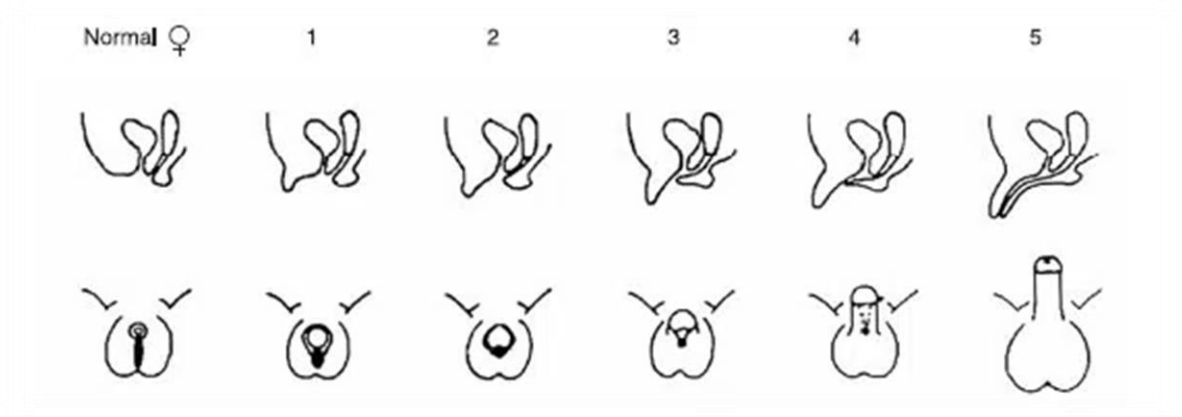
- (I) 1 critério forte para benignidade ( BS1- BS4) e 1 critério fraco para benignidade (BP1- BP7)  
ou
- (II)  $\geq 2$  critérios fracos para benignidade

#### Variante benigna

- (I) 1 critério benigno por si só (BA1) ou
- (II) 2 critérios fortes para benignidade ( BS1- BS4)

Fonte: adaptado de Richards *et al.*<sup>126</sup>. PVS: critério muito forte para patogenicidade; PS: critério forte para patogenicidade; PM critério moderado para patogenicidade; PP, critério fraco para patogenicidade; BP critério fraco para benignidade; BS critério forte para benignidade; BA, critério benigno por si só.

## Anexo H - Classificação de Prader para os graus de atipia genital em indivíduos com cariótipo 46,XX



Grau 1 = Genitália de aspecto feminino, apenas com pequeno aumento do falo; Grau 2 = aumento do falo associado a fusão posterior das saliências labioescrotales, sem seio urogenital; Grau 3 = importante aumento do falo, associado á fusão quase completa das saliências labioescrotales e presença de seio urogenital com abertura perineal; Grau 4 = falo de aspecto peniano, associado a fusão completa das saliências labioescrotales e presença de seio urogenital com abertura perineal na base do falo; Grau 5 = falo de aspecto peniano bem desenvolvido, associado a fusão completa das saliências labioescrotales e presença de seio urogenital com abertura no corpo do falo ou balânica.  
 Fonte: adaptado de Prader<sup>127</sup>.