

*ELIANA GABAS STUCHI PEREZ*

**DEFICIÊNCIA DA 5 $\alpha$ -REDUTASE TIPO 2:  
Importância da avaliação hormonal no  
diagnóstico, incluindo dosagem do  
hormônio anti-mülleriano**

*CAMPINAS*

*2005*

*i*

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**ELIANA GABAS STUCHI PEREZ**

**DEFICIÊNCIA DA 5 $\alpha$ -REDUTASE TIPO 2:  
Importância da avaliação hormonal no  
diagnóstico, incluindo dosagem do  
hormônio anti-mülleriano**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor  
em Clínica Médica, área de concentração em Clínica  
Médica.*

**Orientador:** Prof. Dr. Gil Guerra Júnior

**CAMPINAS**

**2005**

UNIDADE Be  
Nº CHAMADA UNICAMP  
P415d  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BC/ 64803  
PROC 16.P.00086.05  
C \_\_\_\_\_   
PREÇO 11,00  
DATA 2010/10/05  
Nº CPD \_\_\_\_\_  
Biblid 358823

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

P415d Perez, Eliana Gabas Stuchi  
Deficiência da 5 $\alpha$ -redutase tipo 2: importância da avaliação hormonal no diagnóstico, incluindo dosagem do hormônio anti-Mülleriano. / Eliana Gabas Stuchi Perez. Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Gil Guerra-Júnior  
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Testosterona. 2. Dihidrotestosterona. 3. Pseudohermafroditismo.
4. Síndrome de resistência androgênica. I. Guerra-Júnior, Gil.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
- III. Título.

CT/fcm  
Slp/fcm

---

**Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado**

---

---

**Orientador(a): Prof. Dr. Gil Guerra Júnior**

---

---

**Membros:**

---

1. Prof(a). Dr(a) Gil Guerra Júnior

*gil guerra jr*

2. Prof(a). Dr(a). Ângela Maria Spínola e Castro

*Angela*

3. Prof(a). Dr(a). Marília Martins Guimarães

*Marília Martins Guimarães*

4. Prof(a). Dr(a). Sofia Helena Valente de Lemos Marini

*Sofia Helena*

5. Prof(a). Dr(a). Lígia Vera Montali Assumpção

*Lígia V. Montali da Assumpção*

---

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 25/02/2005**

---

Bob Kristina

## **DEDICATÓRIA**

*A todos os pais de crianças com ambigüidade genital e aos seus filhos, para que eles possam encontrar quem diminua a sua angústia, com a possibilidade de tratamento ético, digno, adequado e eficiente.*

Tudo começou há 10 anos atrás.

Era o ano de 1995, eu era residente (R3) na Disciplina de Endocrinologia e Metabologia na Faculdade de Ciências Médicas (FCM) e Hospital de Clínicas (HC) da UNICAMP. Aprendendo sobre esta área fascinante da medicina, encontrei grandes **MESTRES** e amigos.

Eu iria me casar. Meu marido **SÉRGIO**, desde esta época, já estava ao meu lado e apoiando. Logo após casamento, iria fazer um estágio de dois meses em Paris no Hospital Necker, na área de Endocrinologia Pediátrica.

Eu estava empolgada com o **GIEDDS (Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo)**, este grupo de pesquisadores brilhantes que são exemplo de cooperação, dedicação e ética no trabalho diário com o paciente. Na época foi solicitado que apresentássemos um artigo relacionado a intersexo. Eis que por obra do “acaso” encontrei entre os fascículos do Journal (*Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*) um artigo do **Prof. Dr. RODOLFO REY** (1994): falava da dosagem do HAM em pacientes com insensibilidade androgênica. Ele trabalhava na equipe da **Profa. Dra. NATHALIE JOSSO**, que foi discípula do pioneiro embriologista **Dr. ALFRED JOST**, no INSERM, em Paris. Outra “coincidência”: Paris era meu destino dali a alguns meses. Alguém sugeriu, acho que foi a **Profa. Dra. MARIA TEREZA MATIAS BAPTISTA**, que sempre esteve presente como mestre e amiga, que eu fosse até lá conversar sobre a possibilidade de fazer um estudo em cooperação. Lá chegando, fui recebida em seu laboratório. Surgiu então o projeto para o Mestrado.

Em 1999, sob dedicada orientação do **Prof. Dr. GIL GUERRA JÚNIOR**, eu defendi a dissertação de Mestrado.

Num destes congressos encontrei novamente **Prof. Dr. RODOLFO REY**. Ele mostrou a importância dos achados da minha tese de mestrado e daí surgiu novo projeto para doutorado: avaliar o HAM em pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase,

sob orientação do **Prof. Dr. GIL GUERRA JÚNIOR**. Não podia perder esta oportunidade de trabalhar novamente com notável médico-pesquisador, amigo e orientador entusiasta.

Era o ano de 2001 e nasceu **MARIANA**, minha filha. Foi preciso redimensionar o tempo. Aí entrou a ajuda especial da avó **NEUSA** e do avô **JOSÉ**, meus sogros.

Contatamos então vários centros de investigação de ambigüidade genital. E neste nosso imenso Brasil, encontramos a cooperação da **Profa. Dra. MARIA BETÂNIA TORALLES** e de sua aluna **DANIELA NUNES SILVA**, da Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA, este berçário mágico da miscigenação do nosso povo. Sem esquecer do empenho do **Prof. Dr. DURVAL DAMIANI** e da **Dra. LEANDRA STEINMETZ** do Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo – SP. Sem o apoio e a cooperação destes doutores, e da permissão dos seus **PACIENTES**, razão deste estudo, que juntamente com os do **GIEDDS**, formaram a casuística deste estudo, nada poderia ter sido realizado.

As pessoas certas sempre cruzam nosso caminho e aí aparecem a **Profa. Dra. CHRISTINE HACKEL**, pesquisadora brilhante, do Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética Médica da FCM – UNICAMP, e **LUIS EDUARDO CHIMELLO OLIVEIRA**, seu incansável aluno de iniciação científica, que não pouparam esforços para os diagnósticos moleculares.

Encontrei também **LAURIONE CÂNDIDO OLIVEIRA** e sua equipe do Laboratório de Fisiologia do Departamento de Patologia Clínica da FCM – HC – UNICAMP, que muito ajudaram nas dosagens hormonais.

O apoio financeiro veio do **FAEP – UNICAMP** (nº 0106/2002) e do **CNPq** (nº 478264/2003-6). E o Laboratório **SERONO** Ltda. forneceu a gonadotrofina coriônica humana (Profasi hp ®) usada neste trabalho.

Assim, a todos que permitiram e participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho e desta história, e em especial aos meus pais, **VERA E ÂNGELO**, que me ensinaram a não desistir nunca, e aos meus irmãos, **DANIEL, LUCIANO E CAROLINA**, pelo exemplo de força e união,

Agradeço.

	<i>Pág.</i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xiv</i>
<b>1- REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
<b>HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO</b> .....	17
<b>DEFICIÊNCIA DE 5 A-REDUTASE TIPO 2</b> .....	27
<b>2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVO</b> .....	39
<b>3- CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	42
<b>CASUÍSTICA</b> .....	43
<b>MÉTODOS</b> .....	46
<b>4- RESULTADOS</b> .....	48
<b>5- DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>6- CONCLUSÕES</b> .....	62
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	64
<b>8- APÊNDICES</b> .....	78
<b>Apêndice 1- Termo de consentimento pós-informação</b> .....	79
<b>Apêndice 2- Diagnosis of 5<math>\alpha</math>-reductase type 2 deficiency: contribution of antiMüllerian hormone evaluation</b> .....	83
<b>Apêndice 3- New mutations, hotspots and founder effects in Brazilian patients with steroid 5<math>\alpha</math>-reductase deficiency type 2</b> .....	84
<b>Apêndice 4- Deficiência de 5<math>\alpha</math>-redutase tipo 2: experiências de Campinas (SP) e Salvador (BA)</b> .....	85



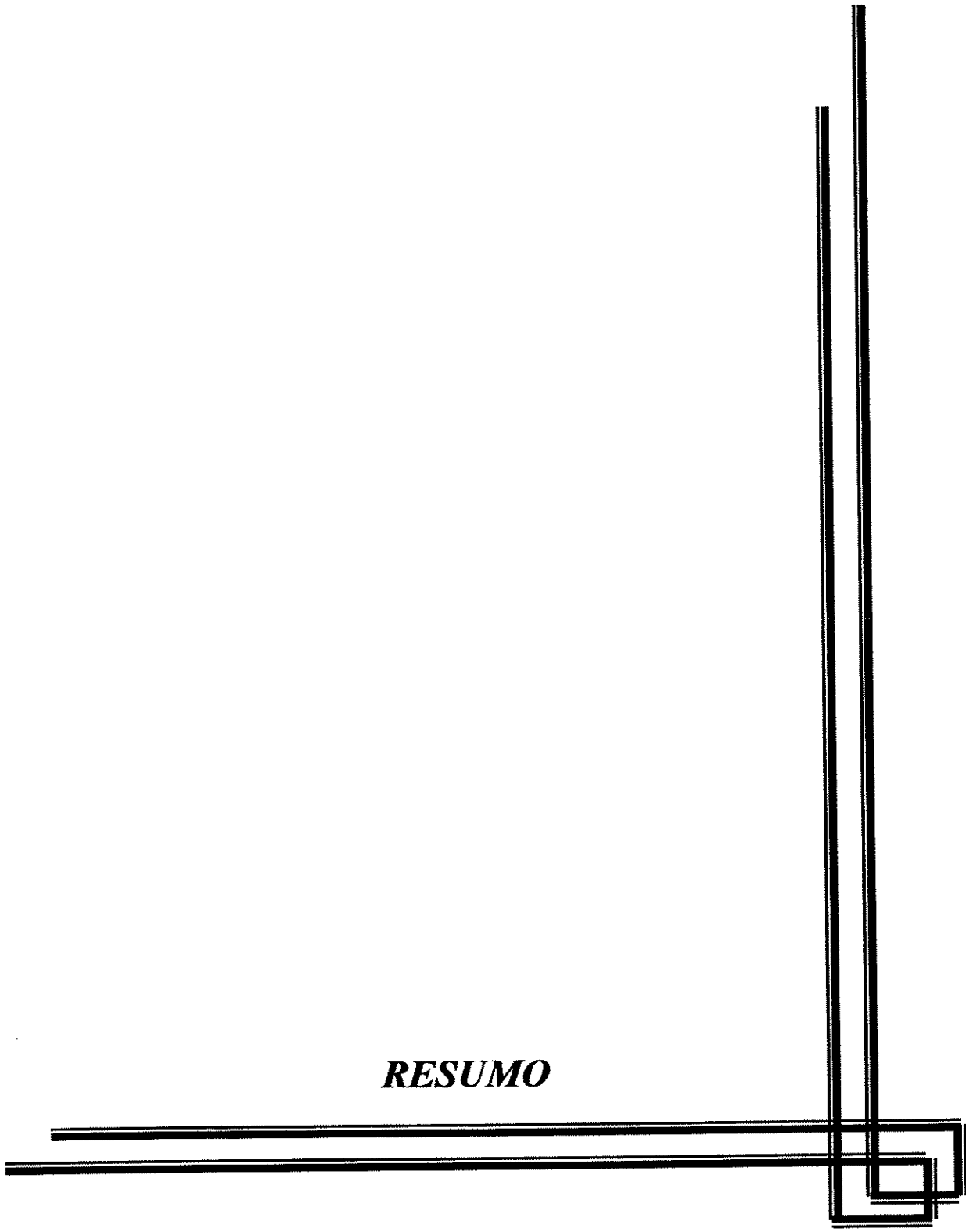
<b><i>ActRI</i></b>	Receptor tipo I da ativina
<b><i>ALK2</i></b>	Receptor tipo II da ativina semelhante a quinase 2
<b><i>ALK3</i></b>	Receptor tipo II da ativina semelhante a quinase 3
<b><i>ALK6</i></b>	Receptor tipo II da ativina semelhante a quinase 6
<b><i>BMPRI-A</i></b>	Receptor tipo 1A da proteína morfogenética óssea
<b><i>BMPRI-B</i></b>	Receptor tipo 1B da proteína morfogenética óssea
<b>cDNA</b>	Complementar do ácido desoxicorribonucleico
<b><i>DAX1</i></b>	Gene da hipoplasia adrenal congênita na região DDS (sexo reverso sensível a dosagem) no cromossomo X.
<b>DNA</b>	Ácido desoxicorribonucleico
<b>DHT</b>	Dihidrotestosterona
<b>ELISA</b>	Enzimaimunoensaio
<b>FCM</b>	Faculdade de Ciências Médicas
<b>FSH</b>	Hormônio folículo-estimulante
<b><i>GATA-4</i></b>	Fator de transcrição 4 que se liga a seqüência GATA do DNA
<b>GIEDDS</b>	Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo
<b>HAM</b>	Hormônio anti-Mülleriano
<b>HC</b>	Hospital de Clínicas
<b>hCG</b>	Gonadotrofina coriônica humana
<b>hMG</b>	Gonadotrofina da menopausa humana
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante

<b>NADPH</b>	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio
<b>PCR</b>	Reação de polimerização em cadeia
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Mensageiro do ácido ribonucléico
<b><i>SF-1</i></b>	Fator esteroideogênico – 1
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b><i>SOX9</i></b>	Gene da seqüência homóloga a região conservadora tipo 9 do SRY (região determinante sexual do cromossomo Y) que codifica proteínas de alta mobilidade
<b><i>SRD5A1</i></b>	Gene da enzima 5 $\alpha$ -redutase tipo 1
<b><i>SRD5A2</i></b>	Gene da enzima 5 $\alpha$ -redutase tipo 2
<b>T</b>	Testosterona total
<b><i>TGF-<math>\beta</math></i></b>	Fator beta de transformação e crescimento
<b><i>TNF-<math>\alpha</math></i></b>	Fator alfa de necrose tumoral
<b>UFBA</b>	Universidade Federal da Bahia
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>USP</b>	Universidade Estadual de São Paulo
<b><i>WT1</i></b>	Gene tipo 1 supressor do tumor de Wilms

	<i>Pág.</i>
<b>Tabela 1</b> Valores da relação T/DHT de controles normais citados na literatura, segundo idade, estágio puberal e presença de estímulo com gonadotrofina coriônica.....	33
<b>Tabela 2</b> Valores da relação T/DHT encontrados nos pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 citados na literatura, segundo idade, estágio puberal e presença de estímulo com gonadotrofina coriônica.....	35
<b>Tabela 3</b> Características clínicas e moleculares dos 14 pacientes com deficiência da 5 $\alpha$ -redutase tipo 2.....	45
<b>Tabela 4</b> Valores de T total, DHT e da relação T/DHT nos controles, de acordo com idade e estágio puberal.....	49
<b>Tabela 5</b> Dosagem hormonal dos 14 pacientes com deficiência 5 $\alpha$ -redutase 2...	51
<b>Tabela 6</b> Variação dos valores de T total, DHT e da relação T/DHT dos pacientes e controles.....	52
<b>Tabela 7</b> Valores de HAM de controles normais e de pacientes com insensibilidade androgênica, segundo REY et al. (1999) e dos 12 pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 deste estudo.....	61

	<i>Pág.</i>
<b>Gráfico 1</b>	Valores de T e da relação T/DHT dos controlos em relação à idade..... 50
<b>Gráfico 2</b>	Valores de T e da relação T/DHT dos pacientes em relação à idade..... 53
<b>Gráfico 3</b>	Valores de HAM dos pacientes e de controlos (média – 1 DP), descritos por REY et al. (1999), em relação à idade (anos)..... 54

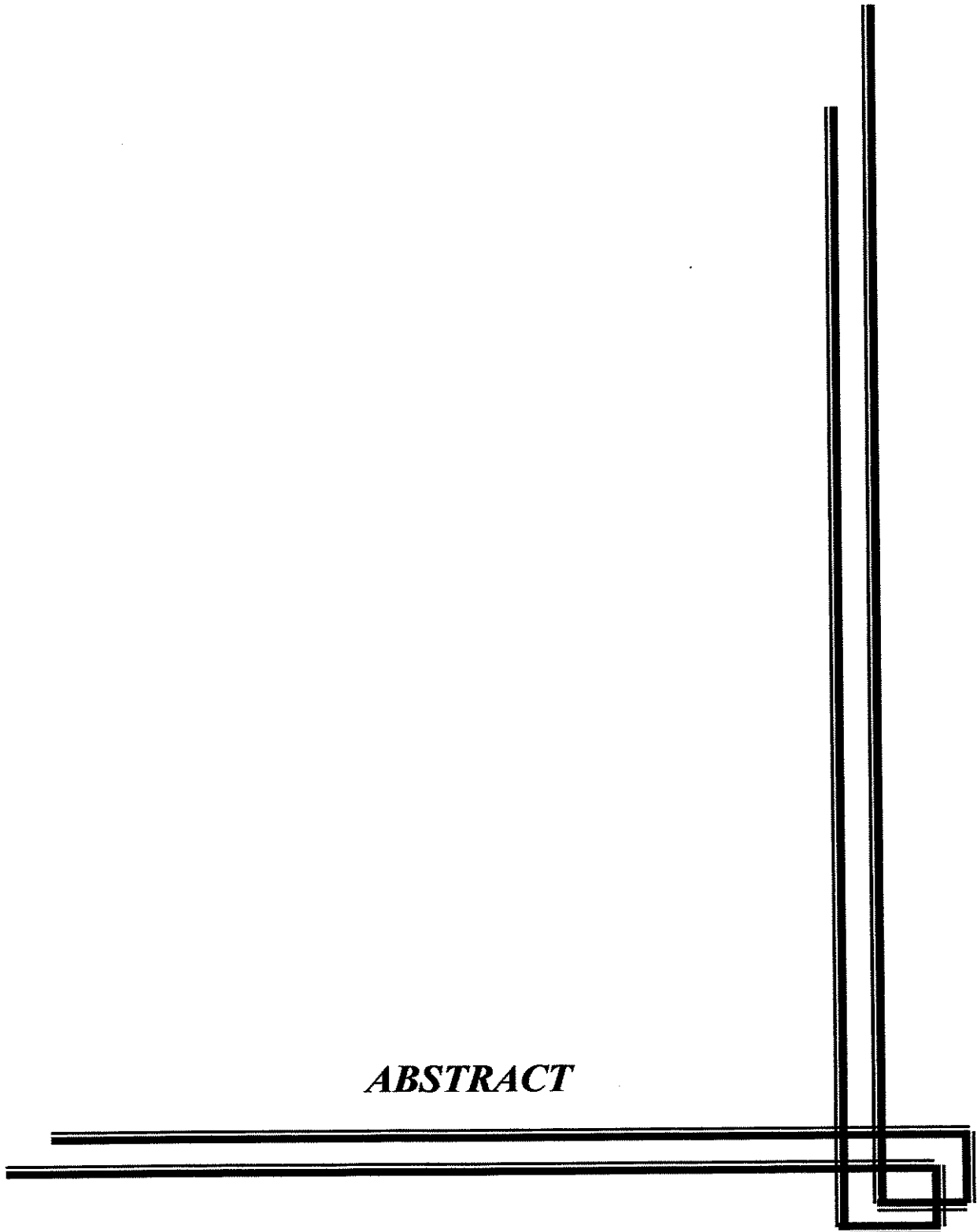
***RESUMO***



**STUCHI-PEREZ, E.G. Deficiência da 5 $\alpha$ -redutase tipo 2: importância da avaliação hormonal no diagnóstico, incluindo a dosagem do hormônio anti-mülleriano. [tese]** Campinas: Faculdade Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas; 2005. pg.

As características clínicas de pacientes com deficiência da 5 $\alpha$ -redutase 2 são freqüentemente indistinguíveis de outras causas de pseudo-hermafroditismo masculino, especialmente as síndromes de insensibilidade androgênica; e o diagnóstico diferencial se torna mais difícil na ausência de casos semelhantes na família, quando não permitem estabelecer o modo de herança. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil hormonal, incluindo a dosagem sérica do hormônio anti-Mülleriano (HAM), em pacientes com diagnóstico molecular de deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2. Dados de 14 pacientes foram analisados de acordo com a idade e o estágio puberal. Ao exame físico inicial a ambigüidade genital. Prader grau III foi observada em 11 casos; ambas as gônadas eram palpáveis em todos os casos. Dois pacientes foram gonadectomizados previamente. Foram dosados LH, FSH, testosterona total (T), dihidrotestosterona (DHT) e HAM em todos os pacientes; e T e DHT em 20 controles. A idade variou de 21 dias a 29 anos; 7 pacientes já tinham iniciado a puberdade. Nos pacientes que ainda mantinham as gônadas, LH e FSH foram normais; T/DHT foi elevada em relação aos controles; todos os pacientes pré-púberes apresentaram HAM abaixo de -1 DP para a idade, enquanto que os púberes tiveram HAM compatível com o estágio puberal. Portanto, este estudo mostra a importância da dosagem sérica do HAM para dirigir a pesquisa molecular em pacientes 46,XY com ambigüidade genital e níveis normais ou elevados de T, particularmente nos casos pré-púberes; aqueles com HAM acima da média para a idade devem ter inicialmente avaliado o gene do receptor de andrógenos; se os valores de HAM estiverem abaixo da média, a análise do gene *SRD5A2* deve ser realizada.

*ABSTRACT*



**STUCHI-PEREZ, E.G.  $5\alpha$ -reductase type 2 deficiency: importance of hormonal profile evaluation in the diagnosis, including anti-müllerian hormone levels. [thesis]**  
Campinas: Faculdade Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas; 2005. pg.

The clinical features of  $5\alpha$ -reductase 2 deficiency patients are hardly distinguishable from those of the other causes of pseudohermaphroditism, especially androgen insensitivity syndromes; the diagnosis becomes even more difficult when family history is unremarkable and there are no clues to a pattern of inheritance. The aim of this study was to evaluate the hormonal profile, including anti-Müllerian hormone (AMH), in patients with molecular diagnosis of  $5\alpha$ -reductase 2 deficiency. Data from 14 patients have been analyzed according to age and pubertal stage. Sex ambiguity was rated as Prader III in 11 cases; both gonads were palpable in all but 2 patients, who had been previously submitted to gonadectomy. LH, FSH, testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT) and AMH serum levels were measured in all patients; T and DHT were also measured in 20 controls. The age range was 21 days to 29 years; 7 patients had reached puberty. In the patients who retained the gonads, LH and FSH levels were normal; T/DHT was elevated in all cases when compared to controls; all prepubertal patients had AMH levels  $< -1$  SD for age, while pubertal patients had AMH levels compatible with pubertal stage. This study shows the usefulness of AMH to direct molecular analysis in 46,XY patients with genital ambiguity and normal or elevated T levels, particularly in isolated prepubertal cases; those with AMH values above the mean should be screened for mutations in the androgen receptor gene; if values are below the mean, *SRD5A2* gene mutations should be investigated.



***1- REVISÃO DE LITERATURA***

## HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO

Em 1947, Alfred JOST descreveu seus clássicos experimentos com castração intra-uterina de fetos de coelho, que permitiram a compreensão de alguns dos mecanismos da diferenciação sexual. Estes experimentos demonstraram que a castração de embriões de coelhos masculinos causava efeitos na organogênese, na dependência do tempo em que ela era realizada. Demonstrou-se que fetos de ambos os sexos tinham genitália interna indiferenciada e que sua diferenciação dependia da ação testicular, pois o desenvolvimento dos ductos de Wolff ocorria na presença de cristais de testosterona (T), e a regressão dos ductos de Müller dependia de fator testicular diferente da T, hoje conhecido como substância inibidora de Müller ou hormônio anti-Mülleriano (HAM).

A castração de fetos femininos não impedia que este adquirisse uma estrutura feminina, não ocorrendo nenhum efeito sensível quando realizada com 23 dias, e com 21 dias apenas se observou diminuição no volume dos órgãos derivados de Müller, fato que também ocorria igualmente nos embriões dos dois sexos.

Demonstrou-se, também, que os efeitos da castração em embriões de coelhos ocorriam devido à ausência da secreção testicular, pois com a implantação de cristais de andrógenos no feto masculino castrado observou-se completo desenvolvimento dos ductos de Wolff, mas não ocorria inibição dos ductos de Müller. Os fetos femininos castrados, na presença de testículos implantados na cavidade vitelínica, se masculinizavam e os ductos de Müller regrediam.

JOST (1953) propôs, então, que outra substância testicular, isoladamente ou em conjunto com a T, teria efeito inibitório sobre os ductos de Müller, sendo este efeito muito mais localizado que o efeito de estabilização dos ductos de Wolff pela T. Cada testículo seria responsável pela substância que vai inibir o ducto de Müller do seu lado, não sendo possível para um testículo inibir o ducto de Müller do outro lado.

PICON (1969) demonstrou uma substância que inibe os derivados de Müller *in vitro* com cultura de trato genital de fetos de ratos Wistar incubados com testículos fetais de várias idades. Obteve a persistência dos ductos de Müller na cultura com feto masculino

de 14 dias sem testículo e a regressão dos ductos de Müller na cultura de feto feminino de 14 dias com testículo. Mostrou que a ação inibitória ocorre em tempo determinado do desenvolvimento do trato genital fetal, independentemente da idade do testículo associado à cultura, no entanto, após a data em que o trato genital sofre a influência gonadal, ocorre o desenvolvimento normal para o sexo com ou sem a presença de testículo.

A fonte de HAM limitada às células de Sertoli foi mostrada por BLANCHARD e JOSSO (1974), obtendo-se cultura de células de Sertoli pura, cuja atividade foi testada após sua transferência para superfície de membrana vitelínica com trato reprodutivo de fetos de ratos de 14,5 dias. Assim, o HAM pode ser considerado como marcador funcional das células de Sertoli fetais, coincidindo a atividade anti-Mülleriana com o período inicial de diferenciação testicular que envolve a organização das células intersticiais e de Sertoli, anterior à esteroidogênese (TRAN et al., 1977).

PICARD et al. (1978) evidenciaram a natureza glicoproteica do HAM, através de separação das proteínas obtidas de cultura de testículos fetais de bezerro, por filtração em gel, gradiente de sedimentação e preparação com foco elétrico. Obtiveram atividade anti-Mülleriana de uma substância glicoproteica com peso molecular de 124.000 Da que se dissociava, por redução de pontes dissulfídicas, em subunidades de peso molecular de 72.000 Da.

Finalmente, PICARD e JOSSO (1984) conseguiram a purificação do HAM, visualizando a glicoproteína por imunocromatografia com anticorpo monoclonal contra HAM, conseguindo multímeros de 145.000 a 235.000 Da de peso molecular, na ausência de condições de redução, e monômeros de 72.000 Da de peso molecular após redução de pontes dissulfídicas.

Assim, o testículo desempenha papel fundamental para diferenciação sexual, onde as células de Leydig secretam T, necessária para masculinização dos ductos de Wolff, seio urogenital e genitália externa, enquanto as células de Sertoli secretam o HAM, necessário para regressão dos ductos de Müller.

## Mecanismos moleculares

Com o seqüenciamento do HAM, definiu-se que se trata de uma glicoproteína de 140 Kd, constituída de dois dímeros de 70 Kd ligados com pontes dissulfídicas, cuja região carboxi-terminal (C-terminal) mostra homologia com a superfamília do “transforming growth factor beta” (TGF- $\beta$ ) (PEPINSKY et al., 1988). O gene humano do HAM de 2,75 Kb, dividido em 5 éxons, está localizado no cromossomo 19p13.3 e codifica uma proteína precursora de 560 aminoácidos com sítio de clivagem localizada no aminoácido 109 da porção C-terminal. A porção N-terminal é importante para a manutenção da atividade biológica da porção C-terminal do HAM, o que não é observado nos outros membros da família TGF- $\beta$ , cuja atividade biológica se concentra na porção C-terminal (PICARD et al., 1986; COHEN-HAGUENAUER et al., 1987; WILSON et al., 1993).

A produção do HAM pelas células de Sertoli inicia-se no feto humano masculino a partir da 7ª semana com a diferenciação destas células, sendo possível a visualização do seu RNAm através de hibridização *in situ* a partir da 8ª semana de gestação no sexo masculino, e visualização do HAM através de imunohistoquímica a partir de 8,5 semanas gestacionias, quando as primeiras células de Sertoli vão se formando ao redor das células germinativas e cordão sexual, mas ainda com arquitetura caótica. Entre a 8ª e 9ª semanas ocorre a regressão dos ductos de Müller, que se torna insensível ao HAM após este período. O RNAm é negativo no ovário no período fetal. A partir de 36 semanas de gestação, há relato de visualização do HAM em 1 folículo secundário, e passa a ser mais fortemente positivo nas células da granulosa de folículos secundários, terciários e antrais a partir de idades gestacionais mais avançadas (JOSSO et al., 1993, RAJPERT-DE MEYTS et al., 1999).

Existem vários elementos que parecem estar relacionados com a ativação do gene do HAM, promovendo sua expressão, como: *SOX9*, *SF-1*, *WT1* e *GATA-4*; ou inibindo-a, como: *DAX1* e *TNF $\alpha$*  (SWAIN e LOVELL-BADGE, 1999; LASALA et al., 2004).

Estudos *in vitro*, usando cultura de trato genital de ratos transgênicos, mostram que a expressão do HAM necessita do sítio de ligação do *SF-1* intacto para se manter. O *SOX9* parece estar relacionado com o início da expressão do HAM, já que em experimentos com ratos transgênicos observou-se que quando o sítio de ligação do *SF-1* está mutado, há início da expressão de HAM, até com regressão dos ductos de Müller nestes ratos, mas com níveis do HAM muito diminuídos, e quando a mutação encontra-se no sítio de ligação do *SOX-9* não há expressão de HAM com persistência de Müller (GIULI et al., 1997; ARANGO et al., 1999).

Através de imunohistoquímica em tecido gonadal de embriões humanos, observou-se uma correlação entre o início de expressão do HAM (6,5 semanas, iniciando diferenciação celular) e o *SOX-9*, cuja localização que era citoplasmática em células somáticas no sexo masculino e feminino antes de 6,5 semanas de gestação, a partir deste período se torna restrita ao núcleo das células de Sertoli e permanece citoplasmática no sexo feminino. Entre 7,5 e 8 semanas, com a diferenciação sexual evidente, o *SF-1* tem sua expressão diminuída em relação aos estágios anteriores e a expressão do *WT1* torna-se mais forte, sendo restrita ao núcleo das células de Sertoli. A expressão da proteína *GATA-4* foi observada após o HAM e formação do cordão sexual. Assim, a expressão do HAM seria iniciada pelo *SOX9*, mantida pelo *SF-1* (efeito sinérgico), e *WT1* e *GATA-4* teriam efeito posterior à iniciação (SANTA BARBARA et al., 2000; JOSSO et al., 2001).

É na 8ª semana de gestação que o HAM exerce sua ação na inibição dos ductos de Müller, período em que estes ductos são sensíveis ao HAM, sendo esta ação unilateral, já que o HAM se difunde célula a célula (JÉGOU, 1993; JOSSO et al., 1993).

A ação do HAM somente é possível na presença do seu receptor. O receptor tipo 2 do HAM consiste em uma proteína trans-membrana de 573 aminoácidos com atividade serina/treonina quinase. Seu gene de 8,2 Kb, localizado no braço longo do cromossomo 12, está arranjado em 11 éxons (éxons 1-3 codificam o domínio extra-celular, e o éxon 4, o segmento transmembrana) (DI CLEMENTE, et al., 1994; IMBEAUD et al., 1995; JOSSO et al., 1997). Após sua ligação com o receptor tipo 2 específico, 3 diferentes receptores tipo 1 são recrutados, mediando a resposta celular: *ALK6*, chamado *BMPRI-B*, *ALK2*, chamado *ActRI* e *ALK3*, também conhecido como *BMPRI-A*. Assim, para que ocorra

a sinalização intracelular, o receptor específico de HAM tipo 2 recruta o receptor do tipo 1, variando de acordo com o tecido ou célula alvo (JOSSO e DI CLEMENTE, 2003). A expressão do receptor de HAM tipo 2 se dá nas células mesenquimais dos ductos de Müller, segue uma cronologia crânio-caudal, explicando a o início da regressão mais proximal, e leva ao acúmulo de  $\beta$ -catequinas nestas células levando à apoptose do epitélio. A ausência do HAM ou mutações do receptor tipo 2 leva a estabilização dos ductos de Müller. Os receptores do HAM também estão presentes nas células da granulosa dos ovários e nas células de Sertoli e de Leydig nos testículos, e parecem ter papel na resposta da célula granulosa ao LH e FSH e na inibição da diferenciação das células de Leydig e da esteroidogênese (ALLARD et al., 2000; DI CLEMENTE et al., 2003; VISSER, 2003; XAVIER e ALLARD, 2003).

### **Monitorização e expressão do HAM pós-natal**

A monitorização do HAM no soro humano foi possível após o desenvolvimento de três ensaios (ELISA) descritos simultaneamente por três grupos diferentes (BAKER et al., 1990; HUDSON et al., 1990; JOSSO et al., 1990). Estes ensaios mostravam a tendência do HAM em aumentar até 1 ano de idade, apresentar uma leve queda até 5 a 6 anos e uma queda mais brusca com o desenvolvimento da puberdade, permanecendo indetectável na vida adulta.

Nos primeiros ensaios para detecção do HAM (sensibilidade de 0,5 ng/mL ou 3,5 pmol/L), este era praticamente indosável em mulheres normais, podendo estar aumentado em mulheres com tumor ovariano de células granulosas, sendo descrito também um caso raro de tumor ovariano de células de Sertoli-Leydig com HAM aumentado (GUSTAFSON et al., 1992; REY et al., 1994; LEE et al., 1996; REY et al., 1996). Em ELISA ultra-sensível (kit da “Immunotech”), recentemente desenvolvido, também um ensaio “sandwich-type”, que utiliza dois anticorpos monoclonais anti-HAM humano recombinante, com sensibilidade de 0,7 pmol/L (0,1 ng/mL), verificou-se os seguintes valores em mulheres normais (média  $\pm$  DP):  $22,8 \pm 19,6$  pmol/L (variação de 0,7 a 73,9) em meninas pré-púberes normais e  $13,7 \pm 18,8$  pmol/L (0,7 a 74,7) em mulheres adultas

normais. Como os níveis de HAM caem durante a vida fértil da mulher normal, com o avanço da idade, chegando a níveis indetectáveis na menopausa, e apresentam correlação com o número de folículos antrais pode ser usado como marcador de idade ovariana (DE VET et al., 2002). Em mulheres ooforectomizadas o HAM é indosável, e a verificação de níveis baixos de HAM em seguimento de mulheres que tiveram tumor ovariano de células da granulosa é indicativa de recorrência do tumor (LONG et al., 2000).

Um estudo com dosagem de HAM em cordão umbilical de recém-nascidos masculinos mostrou concentrações relativamente altas entre 25 e 31 semanas de gestação (média de  $86,4 \pm 36,1$  ng/mL), e, então, queda a partir de 32 semanas até termo (média  $24,2 \pm 14,0$  ng/mL) (SCHWINDT et al., 1997).

Ainda no sexo masculino, a produção do HAM tem um leve declínio durante período peri-natal, aumento em seguida e assim se mantendo até a puberdade. Durante a puberdade há diminuição do HAM coincidindo com o aumento de T intra-testicular e com início da meiose das células germinativas. Durante o período fetal e neonatal, o efeito inibitório do HAM pela T não é tão evidente, o que pode ser explicado pela baixa expressão de receptores androgênicos pelas células de Sertoli durante este período. Durante a puberdade a diminuição da síntese do HAM não é simultânea em todos os túbulos seminíferos: o nível de HAM diminui conforme há o aparecimento dos espermatócitos, enquanto os túbulos pré-meióticos continuam a produzir HAM. Este efeito negativo da célula germinativa que inicia a meiose parece ser independente da ação androgênica. O FSH isoladamente parece ter ação estimulatória sobre as células de Sertoli (REY et al., 1993; LEE et al, 1996; REY et al., 1996; AL-ATTAR et al., 1997; REY et al., 1999; GUIBOURDENCHE et al., 2003, LUKAS-CROISIER et al., 2003; REY et al, 2003).

Pode ser observado em pacientes com puberdade atrasada valores maiores de HAM que os controles para a idade, e crianças com puberdade precoce que apresentam valores mais baixos que os controles. Um grande declínio de HAM é observado quando os valores séricos de testosterona se elevam acima de 6,7 nmol/L ou 1,9 ng/mL (correspondendo com estadio puberal P3), independentemente do nível de FSH, já que em puberdade precoce dependente ou independente de gonadotrofinas a evolução do HAM é a mesma (REY et al., 1993).

Esta relação do HAM com a T é confirmada nos casos de síndrome de insensibilidade androgênica, nos quais se observam valores elevados de T e gonadotrofinas no período da puberdade com HAM extremamente elevado nas formas completas da síndrome. Nas formas parciais os valores elevados de T inibem parcialmente o HAM, permanecendo, porém, ainda altos quando comparados aos controles da mesma idade (REY et al., 1994; REY et al., 1999).

No período pré-natal, quando a T e o HAM estão elevados, os andrógenos exercem pouca influência na maturação de túbulos seminíferos, não ocorrendo a formação de *tight junctions* e invaginações das células de Sertoli e o progresso da espermatogênese não ocorre além do estágio de espermatogônia (REY e JOSSO, 1996; AL-ATTAR et al., 1997).

No período após 1 ano de idade, apesar da T cair, o HAM também tem leve queda, mesmo nos casos de defeito de síntese ou de ação dos andrógenos, nos quais HAM volta a aumentar na puberdade. No tratamento da puberdade precoce ocorre diminuição de T com aumento de HAM, de 3 a 6 meses após a diminuição da T, sugerindo um mecanismo indireto da testosterona sobre as células de Sertoli na regulação da secreção de HAM (REY et al., 1993). Pode existir algum fator parácrino de regulação, já que em algum momento do período neonatal a expressão do receptor de andrógenos ainda está ausente nas células de Sertoli, mas está presente nas células peritubulares, ou ainda é possível existir alguma regulação direta da própria célula germinativa (JÉGOU, 1993; LINDZEY et al., 1994; MAJDIC et al., 1995; SHAN et al., 1995; REY e JOSSO, 1996; HONG et al., 2003).

As células da granulosa ovariana também são capazes de produzir HAM, imunorreativo e bioativo, assim como as células de Sertoli, demonstrando mais uma homologia entre estas duas células. A diferença existente entre elas é que no início da diferenciação testicular, no período fetal, as células de Sertoli produzem grande quantidade de HAM, enquanto as células da granulosa exibem ligeira imunorreatividade apenas em folículos com desenvolvimento mais avançado no feto e, após o nascimento, há produção de pequenas quantidades de HAM pelas células da granulosa de folículos de ovários maduros. Uma das funções do HAM nos folículos ovarianos pode ser a de inibir a meiose do oócito, como demonstrado em cultura de folículos de ratos com HAM (TRAN et al.,



1977; VIGIER et al., 1984; TAKAHASHI et al., 1986; BÉZARD et al., 1987; RAJPERT-DE MEYTS et al., 1999).

Assim, a expressão do HAM nos ovários se inicia apenas no período perinatal, permanece em níveis baixos durante a vida reprodutiva da mulher e se torna indetectável na menopausa. A dosagem do HAM na mulher pode ser usada como marcador da reserva ovariana, pois apresenta grande correlação com o número de folículos antrais (LEE et al., 1996; REY et al., 1996, DE VET et al., 2002; GRUIJTERS et al., 2003).

No sexo masculino, quando há alteração do gene do HAM ou do seu receptor ocorre a síndrome de persistência dos ductos de Müller (SPDM), apresentando-se como pseudo-hermafroditismo masculino onde há retenção das trompas e útero com masculinização externa normal. São descritas mutações presentes no gene do HAM em 45% dos casos e no gene do receptor tipo 2 do HAM em 39%. Em 15% dos casos não foi encontrada nenhuma mutação nestes dois genes, podendo estar presente em algum outro fator da cascata. Nestes casos a dosagem do HAM é extremamente útil, guiando a investigação molecular. A análise molecular mostrou presença de mutação no gene do receptor tipo 2 do HAM no grupo com HAM normal a alto, e no grupo com HAM baixo ou indetectável foi observado mutação no gene do HAM na maioria dos casos (IMBEAUD et al., 1995; IMBEAUD et al., 1996, JOSSO et al., 1997; PICARD e BELVILLE, 2002; STUCHI-PEREZ e GUERRA JR, 2002).

Anteriormente aos ensaios de HAM, a dosagem de T sérica era a única maneira de se verificar a presença de testículo em crianças com criptorquidismo ou a função das células de Leydig, em crianças com ambigüidade genital, sendo necessário muitas vezes o estímulo prolongado com hCG, especialmente após os primeiros 6 a 9 meses de vida até o início da puberdade (GRANT et al., 1976). Atualmente temos a opção de avaliar as células de Sertoli com a dosagem de HAM e inibina B.

A inibina B também pode ser dosada em mulheres, que apresentam valores séricos mais elevados na fase folicular (GROOME et al., 1996). No homem, há elevação do nascimento até o 1º ano de vida, com queda progressiva no 2º ano, permanecendo em valores baixos até a puberdade quando torna a se elevar, mantendo pico entre 20 e 29 anos,

diferentemente do HAM que diminui com a puberdade. Tem relação inversa com FSH, principalmente após a puberdade, período em que exerce inibição sobre o FSH (BYRD et al., 1998). Um estudo com crianças criptorquídicas até 4 anos de idade, mostrou valores basais elevados de FSH e baixos de inibina B em relação aos controles, sendo que, após os estímulos com hCG e hMG, as crianças criptorquídicas apresentaram relação inibina B/FSH mais baixa que os controles (LONGUI et al., 1998).

A presença de HAM detectável sugere existência de tecido testicular e quando em níveis normais para idade tem valor preditivo maior que a resposta da T ao teste de estímulo com hCG, para a presença de tecido testicular normal (MISRA et al., 2002). Os resultados baixos ou negativos devem ser interpretados com precaução, pois podem ocorrer variações individuais, mostrando-se negativo em disgenesias testiculares graves (JOSSO et al., 1991). Assim, pode-se diferenciar pseudo-hermafroditismo feminino de hermafroditismo verdadeiro em indivíduos 46,XX com a dosagem sérica de HAM. Os valores de HAM aparecem elevados nos casos de insensibilidade androgênica ou deficiência de síntese de testosterona, e, como estão diminuídos nos de disgenesia gonadal, são de grande utilidade na investigação diagnóstica dos casos de pseudo-hermafroditismo masculino (HARBISON et al., 1991; JOSSO et al., 1991; JOSSO, 1992; GUSTAFSON et al., 1993; JOSSO e REY, 1994; JOSSO, 1995).

REY et al. (1999) demonstraram uma grande utilidade da dosagem do HAM em pacientes com intersexo, utilizando-se o kit de ELISA da Immunotech ultra-sensível, em um trabalho onde foram analisados 107 pacientes. Nos casos com diferenciação testicular anormal observou-se HAM indetectável nos casos de disgenesia gonadal pura, porém nos casos de disgenesia gonadal parcial, disgenesia gonadal assimétrica ou hermafroditismo verdadeiro ocorreu grande variabilidade dos valores séricos de HAM, desde muito baixos nos casos de disgenesia testicular grave coexistindo com remanescentes Müllermanos presentes, até valores quase normais nos casos de disgenesias menos graves, sem persistência dos ductos de Müller. Já nos casos de diminuição da secreção de T ou da sua ação observou-se valores aumentados de HAM no primeiro ano de vida; no entanto, entre 1 e 9 anos de idade, os valores de HAM retornaram ao normal, mas mesmo assim mais elevados do que os valores encontrados em disgenesia gonadal. Na puberdade os valores de

HAM se elevam nos casos com aplasia de Leydig e insensibilidade total aos andrógenos, e nos casos de insensibilidade parcial apresentam níveis significativamente mais altos que os controles. Não houve nenhum caso de deficiência de 5  $\alpha$ -redutase 2 avaliado nesse estudo.

Em outro estudo multicêntrico na Europa, 67 pacientes com ambigüidade genital com tecido testicular e/ou cariótipo XY foram avaliados quanto à etiologia do intersexo, observando-se 12 casos de disgenesia testicular, 7 casos de hermafroditismo verdadeiro, 11 casos de insensibilidade parcial androgênica, 2 casos de defeito de síntese de T e 35 casos permaneceram como idiopáticos. A dosagem do HAM, utilizando-se o mesmo kit citado acima, mostrou-se com média elevada entre os pacientes com insensibilidade androgênica e baixa entre os distúrbios da determinação gonadal. A maioria dos pacientes não foi investigada em relação à mutação no gene da enzima 5  $\alpha$ -redutase 2 (MOREL et al., 2002).

A relação inversa do HAM com a T pode ser observada nas seguintes situações: atraso puberal, quando os níveis de HAM permanecem elevados até a ocorrência de aumento significativo de T; no hipogonadismo, onde o tratamento prolongado com hCG, levando ao aumento de T intra-testicular diminui o HAM; na insensibilidade androgênica completa, onde há altos níveis de T e gonadotrofinas com níveis também altos do HAM durante a puberdade, mostrando que a interação da T com HAM se dá através dos receptores androgênicos. Nas formas parciais os altos níveis de T podem inibir o HAM parcialmente, mas ainda assim tendem a apresentar níveis de HAM maiores que o controle para idade e estágio puberal, principalmente durante a infância e a puberdade. Assim, nos casos de insensibilidade androgênica o HAM tende a estar elevado, principalmente durante o primeiro ano de vida e na puberdade, período de maior influência da T (REY et al., 1993; REY et al., 1994; REY et al., 1999; YOUNG et al., 1999).

Realizamos recentemente um estudo no qual foram avaliadas 24 crianças com ambigüidade genital e cariótipo 46,XY, com dosagem sérica do HAM, e observamos que nos 4 casos suspeitos de deficiência de 5  $\alpha$ -redutase 2 os níveis do HAM foram baixos (STUCHI-PEREZ et al., 2000).

Neste estudo, os 4 pacientes com deficiência da 5 $\alpha$ -redutase 2 apresentaram valores séricos de gonadotrofinas e T normais, não sendo possível a realização do diagnóstico diferencial com os casos de insensibilidade androgênica. Este último grupo possuía ainda a relação T/DHT pouco acima do normal, dificultando ainda mais essa diferenciação diagnóstica. Nos pacientes com suspeita de deficiência da 5 $\alpha$ -redutase 2, diferentemente dos casos de insensibilidade androgênica, observamos que o HAM não estava elevado, indicando que a T não necessita ser metabolizada em DHT para modular a sua produção pelas células de Sertoli (PEREZ, 1999; PEREZ e GUERRA JR, 2000; STUCHI-PEREZ et al., 2000).

Apesar do pequeno número de pacientes, estes achados sugeriam que a determinação do HAM pode ser útil para distinguir entre insensibilidade androgênica e deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 nos pacientes com ambigüidade genital que apresentam valores normais ou elevados de T.

## **DEFICIÊNCIA DE 5 $\alpha$ -REDUTASE TIPO 2**

Em 1961, NOWAKOWSKI e LENS, descrevem uma forma de pseudo-hermafroditismo masculino separadamente da síndrome de feminilização testicular, chamada hipospadia perineoescrotal pseudovaginal. Estes casos se apresentavam com o corpo mais masculinizado, sem desenvolvimento de mama, aumento da musculatura, desenvolvimento de pilificação masculina normal durante a puberdade, e presença de epidídimo, ducto deferente, vesícula seminal. Já se observavam evidências de provável herança recessiva (consangüinidade e outros casos na família) e que a anomalia se dava apenas no seio urogenital.

Em 1974, WILSON et al., descreve 2 formas de pseudo-hermafroditismo masculino incompleto familiar. O tipo 1, com herança recessiva ligada ao X, fenótipo que variava desde falência completa da virilização (aspecto externo da genitália feminino com útero ausente – Síndrome de Reifenstein) até virilização completa, passando por fenótipos com vários graus de hipospadia, diminuição do falo, desenvolvimento de Wolff incompleto,

aparecimento de ginecomastia durante a puberdade (chamada de Síndrome de feminilização testicular), apresentava alterações hormonais com aumento dos níveis de T, estradiol e LH compatíveis com má ação T.

O tipo 2, apresentava-se com diferenças no fenótipo e na avaliação hormonal e tinha herança autossômica recessiva. As estruturas derivadas dos ductos de Wolff desenvolviam-se normalmente, enquanto o seio urogenital e o tubérculo genital apresentavam vários graus de masculinização, com hipospádia grave e vagina em fundo cego nos quadros típicos, por isso também chamada hipospádia pseudovaginal perineoescrotal. Durante a puberdade ocorria aumento do falo e não acontecia desenvolvimento da mama, como observado no tipo 1. Estes indivíduos, observados com incidência marcante em alguns vilarejos isolados da República Dominicana, apresentavam algumas características próprias: nasciam com ambigüidade genital grave (com testículo presente como massa inguinal ou labial, lábios escrotais não fundidos, com seio urogenital, vagina em fundo cego e falo pequeno), e eram criados como meninas. Durante a puberdade ocorria a masculinização com engrossamento da voz, aumento da massa muscular e do falus, tornando-se um pênis funcional, enrugamento e pigmentação do saco escrotal, com descida testicular, passando a ter ereção e ejaculação pelo orifício perineal, sem aumento das mamas. A próstata permanecia pequena e eles não apresentavam recessão temporal dos cabelos ou acne. A maioria apresentava mudança do comportamento sexual para masculino. A avaliação hormonal mostrava níveis normais de LH, T e estradiol, e a atividade da  $5\alpha$ -redutase estava diminuída nos tecidos do genital externo (SIMPSON et al., 1971; WALSH et al., 1974).

Embora estudos preliminares postulassem que a dihidrotestosterona (DHT) fosse um metabólito inativo da T, evidências indicavam que ela tinha um papel fundamental na diferenciação sexual masculina. Assim, a descrição de casos uma doença rara da diferenciação sexual masculina, inicialmente denominada de hipospádia períneo-escrotal pseudovaginal, foi associada a uma deficiência na atividade da enzima  $5\alpha$ -redutase e, conseqüentemente, ausência ou diminuição importante na secreção de DHT. Evidenciava-se nesta época que atividade da  $5\alpha$ -redutase estava bastante presente no seio urogenital e tubérculo genital, o que não ocorria nos ductos de Wolff. Deduzia-se que o

testículo produzia a T que age diretamente sobre os ductos de Wolff e serve como pré-hormônio para a formação da DHT, que é o mediador efetivo da virilização do seio urogenital e da genitália externa (WILSON, 1972; IMPERATO-MCGUINLEY et al., 1974; SIITERI e WILSON, 1974).

Tanto a DHT quanto a T ligam-se ao mesmo receptor nas células-alvo para desempenharem distintos papéis fisiológicos. Este receptor de andrógenos é uma proteína que apresenta 3 sítios funcionais em sua estrutura: o domínio de ativação da transcrição dos genes-alvo, o domínio de ligação ao DNA e o domínio de ligação ao hormônio. O complexo receptor-hormônio formado age na regulação da transcrição de genes por meio da ligação deste complexo aos sítios regulatórios dentro ou adjacentes aos genes sob seu controle. Porém, a intensidade da interação do receptor com os hormônios T e DHT não é equivalente. Esta diferença na ligação ao receptor é devida ao fato de que a dissociação do complexo T-receptor é 5 vezes mais rápida que a DHT, e esta tem afinidade pelo receptor 4 vezes maior. A fraca interação da T com o receptor é compensada pela alta concentração nos tecidos-alvo. Em altas concentrações a T interage com o receptor de maneira semelhante à DHT, aumentando a estabilidade da ligação. É importante salientar este fato que pode explicar porque os indivíduos com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase apresentam um grau de virilização mais intenso na puberdade que na embriogênese (GRINO et al., 1990; WILSON et al., 1993).

A virilização dos ductos de Wolff ocorre por ação parácrina da T. Nos tecidos urogenitais mais distantes da síntese de T, como o tubérculo genital, a quantidade deste hormônio não é suficiente para promover a virilização destas estruturas. Portanto, para a virilização dos genitais externos é necessária a conversão *in situ* da T em DHT. A conversão de T em DHT amplifica o sinal androgênico devido a maior interação da DHT com o receptor, devido ao complexo DHT-receptor ser mais estável e com *turnover* mais lento, e devido a DHT ser mais efetiva que a T na estabilização do receptor de andrógenos nas condições estruturais que transformam o receptor numa conformação adequada para a ligação aos sítios alvos de DNA.

Além de essencial para a formação do fenótipo masculino (diferenciação da genitália externa masculina) durante a embriogênese, a DHT é fundamental para o crescimento e manutenção de outros tecidos genitais dependentes de andrógenos, como a

próstata, o epidídimo e as vesículas seminais. Os indivíduos com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase apresentam próstata rudimentar ou ausente e vesículas seminais de tamanho reduzido. Conseqüentemente, os indivíduos com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase apresentam sêmen com volume diminuído e alta viscosidade, apesar de poder conter gametas normais (CAI et al., 1994; KATZ et al., 1997).

Além disso, a DHT controla também a expressão do gene da 5 $\alpha$ -redutase, ou seja, regula sua própria taxa de síntese de maneira positiva.

As enzimas 5 $\alpha$ -redutases compreendem uma pequena família de isoenzimas que participam do metabolismo dos hormônios esteróides. Estão localizadas na membrana nuclear e no retículo endoplasmático e agem sobre esteróides, como glicocorticóide, progesterona, mineralocorticóide e andrógeno, ou seja, todos os esteróides com a configuração 3-ceto, $\Delta^{4,5}$ . Estas enzimas utilizam como co-fator, o NADPH, para a redução de duplas ligações (ligação  $\Delta^{4,5}$ ) com adição de hidrogênio no carbono 5 (5 $\alpha$ ) do anel A de substratos esteróides. O NADPH é o primeiro substrato a se ligar na 5 $\alpha$ -redutase (antes da T) e o NADP<sup>+</sup> é o último a deixar a enzima. A ligação NADPH parece estabilizar a enzima dentro da célula, com uma regulação de *turnover* da 5 $\alpha$ -redutase pelas concentrações intracelulares do cofator NADPH (LEVY et al., 1990; RUSSELL e WILSON, 1994; WIGLEY et al., 1994).

Informações sobre as propriedades bioquímicas, farmacológicas e fisiológicas da 5 $\alpha$ -redutase eram limitadas pela localização intramembrana desta enzima hidrofóbica e pela perda de atividade enzimática durante o processo de solubilização da proteína em tecidos genitais *in vivo*. A expressão de RNAm de fígado de rato em ovócitos de *Xenopus laevis* permitiu o isolamento de clones de cDNA correspondentes à 5 $\alpha$ -redutase de esteróides. Esse cDNA isolado de rato foi utilizado posteriormente como sonda para o rastreamento de uma biblioteca de cDNA de próstata humana, permitindo assim a caracterização de dois genes que codificam duas isoenzimas da 5 $\alpha$ -redutase: gene 5 $\alpha$ -redutase tipo 1 (*SRD5A1*) e gene 5 $\alpha$ -redutase tipo 2 (*SRD5A2*), assim denominados de acordo com a ordem cronológica em que foram descobertos, respectivamente por ANDERSSON et al. (1989) e ANDERSSON e RUSSELL (1990).

Os genes *SRD5A1* e *SRD5A2* apresentam um mesmo arcabouço genético composto por 5 éxons e 4 íntrons e sítios de *splicing* idênticos, com 47% de similaridade entre as seqüências nucleotídicas. Ambas as isoenzimas são proteínas de membrana, o que pode ser confirmado pela distribuição de muitos aminoácidos hidrofóbicos (LABRIE et al, 1992; THIGPEN et al., 1992; RUSSELL e WILSON, 1994; RUSSELL et al., 1994).

A isoenzima tipo 1 é uma proteína hidrofóbica de 259 aminoácidos com baixa afinidade por substratos esteróides, uma atividade ótima em pH básico, com expressão preferencial pós-natal no fígado e em pele não-genital, cujo gene localiza-se em 5p15.5. (THIGPEN et al., 1992; RUSSELL e WILSON, 1994).

O gene *SRD5A2* localiza-se em 2p22-p23, seu produto é uma proteína de 254 aminoácidos, exibindo alta afinidade por substratos esteróides, uma atividade ótima em pH ácido, e expressão elevada, antes e após o nascimento, em tecidos genitais (THIGPEN et al., 1992; MORISSETTE et al., 1996).

De modo geral, as isoenzimas tipo 1 e 2 são expressas em quase todo o corpo humano. Entretanto, cada qual apresenta um padrão de expressão preferencial, tanto do ponto de vista de intensidade de expressão, quanto do tecido envolvido. A isoenzima tipo 1 se expressa preferencialmente na pele e no fígado, enquanto que a tipo 2, nos tecidos genitais, como testículo, epidídimo, próstata e vesículas seminal (THIGPEN et al., 1993; EICHELER et al., 1994). Ainda não é bem conhecida a função da isoenzima tipo 2 em outros tecidos onde se expressa, pois estes tecidos parecem não estar afetados quando não há atividade desta isoforma da enzima. Contudo, a expressão da 5 $\alpha$ -redutase 2 no SNC faz supor que esta isoenzima seja fundamental para a diferenciação sexual do cérebro. A 5 $\alpha$ -redutase 2 é expressa em regiões e em um período críticos da diferenciação sexual do cérebro, quando estão elevadas as concentrações de andrógenos e a ligação ao receptor (MELCANGI et al., 1998; POLETTI et al., 1998).

Diante destas características distintas, o papel da isoenzima tipo 2 na etiologia do pseudo-hermafroditismo masculino por deficiência da 5 $\alpha$ -redutase foi evidenciado e confirmado pela identificação de mutações no seu gene nos pacientes afetados por esta



doença e na ausência de mutações no *SRD5A1* (ANDERSSON et al., 1991; RUSSELL e WILSON, 1994).

A deficiência da 5 $\alpha$ -redutase 2 é uma doença com padrão de herança autossômico recessivo que resulta numa forma específica de pseudo-hermafroditismo masculino no qual a conversão de T em DHT está comprometida porque é nula ou defeituosa a atividade da enzima 5 $\alpha$ -redutase tipo 2 em razão de mutações no gene *SRD5A2* (RUSSELL et al., 1994)

Os afetados são indivíduos com sexo genético masculino que, ao nascimento, apresentam ambigüidade da genitália externa e virilização na puberdade. A heterogeneidade da manifestação fenotípica é tão grande que, ao nascimento, os indivíduos podem apresentar desde genitália externa quase feminina com gônadas palpáveis ou não, passando pelo mais variados graus de ambigüidade (freqüentemente com hipospadias graves e seio urogenital) até um fenótipo quase masculino normal com criptorquidia. Quando não orquiectomizados, apresentarão virilização durante a puberdade, caracterizada por crescimento fático, pigmentação, aumento do volume testicular e descida testicular, rugosidade e aumento do volume escrotal, desenvolvimento de massa muscular e adiposidade de característica andróide, engrossamento da voz, porém com poucos pêlos corporais, em especial faciais, pouca acne, ausência ou diminuição da recessão temporal dos cabelos, da próstata e das vesículas seminais. Caracteristicamente, estes pacientes não apresentam ginecomastia na puberdade, diferentemente de outras causas de pseudo-hermafroditismo masculino, em especial as insensibilidades androgênicas. A infertilidade pode ocorrer devido à seqüela da criptorquidia não tratada e pela diminuição do volume e aumento da viscosidade do sêmen (QUIGLEY et al., 1995; SINNECKER et al., 1996; FORTI et al., 1996).

Concomitante à virilização física, os afetados, geralmente criados como mulheres, freqüentemente enfrentam também a indefinição ou mudança masculina da identidade psicossocial (IMPERATO-MCGUINLEY et al., 1979, WILSON et al., 1993).

O diagnóstico laboratorial baseia-se no aumento da relação T/DHT basal ou pós-estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG), na dosagem urinária diminuída de metabólitos 5 $\alpha$ -reduzidos, e quantificação da atividade da 5 $\alpha$ -redutase em cultura de

fibroblastos de pele da região genital, que apesar de mais específicas, de alto custo e de difícil realização, não confirmam o diagnóstico, o que somente ocorre com a identificação da alteração molecular no gene *SRD5A2* (SAENGER, et al., 1978; GREENE et al., 1987; WILSON et al., 1993).

A dosagem de T e de DHT, e relação T/DHT, são os exames de triagem mais utilizados. Na Tabela 1 observam-se os valores da relação T/DHT em controles normais citados na literatura. São descritos valores de até 17 sem estímulo com hCG e de em torno de 30 após estímulo (IMPERATO-MCGUINLEY et al., 1974; PETERSON et al., 1977; PANG et al., 1979; MENDONÇA et al., 1996).

**Tabela 1-** Valores da relação T/DHT de controles normais citados na literatura, segundo idade, estágio puberal e presença de estímulo com gonadotrofina coriônica.

Referências	0-1Ano	Pré-púbere Basal	Pré-púbere após hCG	Pós-púbere	Método T/DHT
Imperato-McGinley (1974)				14,0	Isótopo duplo
Peterson (1977)			3,0-26 (n = 8)	8,0 – 16,0 (n = 18)	RIA + cromato
Pang (1979)	1,5 – 17,0 (n = 40)	4,9 ± 2,8 (n = 18)	11 ± 4,4 (n = 20)		RIA + cromato
Imperato-McGinley (1986)	1,6 – 10,0* 1,7 – 9,5** (n = 15/13)				RIA + cromato
El-Awady (1989)		0,3 – 2,5 (n = 6)	4,6 – 11,5 (n = 6)		<sup>125</sup> I – RIA/ <sup>3</sup> H-RIA + extração
Cai (1996)				12 ± 3	RIA + cromato
Mendonça (1996)			14,0 ± 5,0 (n = 6)	14,0 ± 5,2* 21,0 ± 9,7** (n = 8)	<sup>3</sup> H-RIA + cromato + extração
Hiort (1996b)		3,0 – 10,0 (n = 4)	4,0 – 11,0 (n = 4)		RIA + cromato

\* Basal; \*\*Pós-estímulo hCG; RIA= radioimunoensaio

Os valores da relação T/DHT em pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase tipo 2 descritos na literatura variam do normal a valores próximos de 300 (Tabela 2). Há uma grande variação entre os valores basais e após hCG no mesmo paciente, portanto, para que a relação T/DHT tenha relevância, é importante que seja feita com um valor significativo de testosterona a importância da T com estímulo para a relação T/DHT. (PETERSON *et al.*, 1977; WILSON *et al.*, 1993; CAI *et al.*, 1996; HIORT *et al.*, 1996b; MENDONÇA *et al.*, 1996; GAD *et al.*, 1997; AHMED & HUGHES, 2000; VILCHIS *et al.*, 2000; MAZEN *et al.*, 2003). É importante ressaltar que não são todos os trabalhos que utilizaram pacientes com diagnóstico molecular confirmado da doença.

Assim, quando o indivíduo tiver mais de 6 meses de idade e ainda sem o desenvolvimento da puberdade deve ser feito estímulo com hCG, que apresenta resultados semelhantes ao da aplicação de T na avaliação da conversão de T em DHT (GREENE *et al.*, 1987). A seguir são citados alguns dos protocolos descritos para estímulo com hCG na avaliação da relação T/DHT: 3.300 UI/dia, por 3 dias (IMPERATO-MCGINLEY *et al.*, 1986); 1.500 UI/dia, por 5 dias (EL-AWADY *et al.*, 1989); 5.000 UI em dose única em comparação com 1.500 UI/d por 5 dias em 3 pacientes com resultados semelhantes (HIORT, 1996b); 6.000 UI em dose única em pacientes pós-púberes e 50-100 UI/kg/dia por 4 dias em pacientes pré-púberes (MENDONÇA *et al.*, 1996); e 1.500 UI/dia por 4 dias (MAZEN *et al.*, 2003).

**Tabela 2-** Valores da relação T/DHT encontrados nos pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 citados na literatura, segundo idade, estadio puberal e presença de estímulo com gonadotrofina coriônica.

Referências	0-1Ano	Pré-púbere basal	Pré-púbere após hCG	Pós-púbere	Método T/DHT
Imperato-McGinley (1974)				40 (n = 4)	Isótopo duplo
Peterson (1977)			74 – 162 (n = 4)	35 – 84 (n = 24)	RIA + cromato
Pang (1979)			27 – 50 (n = 1)		RIA + cromato
Imperato-McGinley (1986)	14 – 32* 20 – 62** (n = 3)				RIA + cromato
El-awady (1989)	2 – 6* 95 – 289** (n = 3)	1 – 9 (n = 7)	29 – 100 (n = 7)		<sup>125</sup> I-RIA/ <sup>3</sup> H-RIA + extração
Thigpen (1992)#			28 – 44 (n = 3)	23 – 96 (n = 5)	Não relatado
Mendonça (1996)#			36 – 46 (n = 3)	25 – 83* 35 – 94** (n = 10)	<sup>3</sup> H-RIA + cromato + extração
Cai (1996)#				31-59 (n = 3)	RIA + cromato
Hiort (1996b)#		3 – 15 (n = 4)	12 – 35 (n = 4)		RIA + cromato
Gad (1997)			20 – 110 (n = 8)		<sup>3</sup> H-RIA (DPC)
Vilchis (2000)#	16 (n = 1)		18 (n = 1)	17-27* 33** (n = 2/1)	Não relatado
Mazen (2003)#	1 – 9* 9 – 99** (n = 3)	1 (n = 1)	35 (n = 1)	18 – 40* 160** (n = 2/1)	RIA (DPC) + cromato

\*Basal; \*\*Pós-estímulo hCG; #diagnóstico molecular confirmado; RIA= radioimunoensaio

AHMED e HUGHES (2000) em uma revisão da avaliação de pacientes com pseudo-hermafroditismo masculino comparou 2 protocolos de estímulo com hCG realizados em 41 pacientes: 1.000 UI/dia ou 1.500 UI/dia, por 3 dias consecutivos com aumento de 2,6 e 6,5 vezes nos níveis de T, respectivamente, sem diferença significativa. A relação T/DHT de 66 pseudo-hermafroditas masculinos após hCG variou de 1 a 17, e de 12,5 a 73 nos pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2. Também neste estudo, observou-se que o maior incremento da T nos pacientes pseudo-hermafroditas masculinos após estímulo com hCG aconteceu nos 8 pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2.

Os métodos preferencialmente utilizados para a investigação molecular do gene *SRD5A2* baseiam-se na amplificação de seus éxons pela reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) seguida por diferentes estratégias para o rastreamento de mutações nas múltiplas cópias dos fragmentos de DNA gerados *in vitro*. (HIORT et al., 1996a; HIORT et al., 1996b).

O estudo molecular das mutações do gene *SRD5A2* possibilitou a identificação de dois domínios funcionais da enzima 5 $\alpha$ -redutase tipo 2: um domínio de ligação ao cofator NADPH e um domínio de ligação ao substrato esteróide (T). As mutações que afetam a ligação à T estão mapeadas nas extremidades amino- e carboxi-terminal do gene (nos éxons 1 e 5), enquanto que as mutações que afetam a ligação ao NADPH são mais numerosas, concentrando-se principalmente nos éxons 3 e 4 (RUSSELL e WILSON, 1994; WIGLEY et al., 1994; VILCHIS et al., 1997).

De modo geral, as mutações que causam substituições de aminoácidos podem conduzir à formação de: (1) enzima com afinidade diminuída pelo NADPH ou pela T, (2) enzima com estabilidade reduzida e (3) enzima com alteração no pH ótimo de sua atividade. Existem ainda mutações que levam à formação de enzimas não funcionais, resultantes de deleções completas ou parciais do gene, da introdução de códons de parada prematuros, de mutações nos sítios de *splicing* (emendas) ou de inserções ou deleções de 1 a 3 pares de bases que alteram o quadro de leitura. Esta amplitude de causas justifica a heterogeneidade fenotípica que é própria da doença (WILSON et al., 1993).

As mutações do gene *SRD5A2* já foram descritas em mais de 50 famílias distribuídas em 22 grupos étnicos. Grande parte dos casos pertence a famílias geográfica ou socialmente isoladas e endocruzadas da República Dominicana, da Turquia e da Nova Guiné (RUSSELL e WILSON, 1994). Em pacientes brasileiros, a mutação Q126R parece ser uma das mais comuns em descendentes de portugueses, enquanto que a mutação G183S tem sido relatada em pacientes com ancestrais negróides (FERRAZ et al., 1998; FERRAZ et al., 1999).

Como esperado em doenças com padrão de herança autossômico recessivo causadas por um loco com mutações relativamente raras, a taxa de consangüinidade é elevada e mais de dois terços dos pacientes são homozigotos para a mutação. Por outro lado, a freqüência relativamente elevada de heterozigotos compostos (~32%) sugere que a freqüência de portadores na população em geral seja maior do que se imaginava previamente (RUSSELL et al., 1994).

Quando a deficiência da 5 $\alpha$ -redutase é diagnosticada ao nascimento ou no período neonatal, a definição do sexo de criação ainda não está clara. Enquanto que na maioria dos casos de ambigüidade genital diagnosticados nesta idade são conduzidos baseados em grande parte no grau de virilização genital, o mesmo não pode ser feito em relação à deficiência da 5 $\alpha$ -redutase pelo fato de ser freqüentemente observada a mudança do comportamento sexual para o masculino nos casos criados no sexo feminino, quando não orquiectomizadas precocemente (WILSON et al., 1993).

Para os indivíduos criados como homens, deve-se corrigir as alterações genitais, realizar a orquidopexia e, quando a virilização na puberdade não for satisfatória, indicar a suplementação androgênica. O medicamento ideal seria o enantato de DHT a cada 4 a 6 semanas, que ainda não está comercializado, sendo apenas usado em estudos experimentais. Uma segunda alternativa é a suplementação com doses supra-fisiológicas de T de depósito, porém não se tem definidos os riscos desta terapêutica ao longo prazo. A terceira alternativa é a administração de andrógeno que não necessita de 5 $\alpha$ -redução para ser ativo, como a nandrolona (19-nortestosterona), e uma quarta alternativa é o uso de DHT em creme tópico genital, com bons resultados ao curto prazo, e resultados ainda indefinidos

ao longo prazo. Um número considerável de homens com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase se casam e desejam ter filhos. No entanto, devido à diminuição do volume e aumento da viscosidade do sêmen, apesar do número normal de espermatozóides, a infertilidade é a regra (IMPERATO MC-GINLEY et al., 1992; MENDONÇA et al., 1996; IMPERATO MC-GINLEY e ZHU, 2002). Em 1997, KATZ et al. descreveram a aplicação do esperma de um homem infértil com esta doença no útero de sua esposa. Ela teve 3 filhos em 2 gestações, sendo a segunda com gêmeos, todos os 3 heterozigotos para mutação paterna no gene *SRD5A2*.

Nas pacientes criadas como mulheres é necessária a gonadectomia precoce e a correção cirúrgica da genitália externa, além da reposição estrogênica na puberdade. O suporte psicológico e/ou psiquiátrico cuidadoso é fundamental para o êxito desta definição.

***2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVO***



Uma vez que a diferenciação sexual masculina normal envolve um maior número de eventos geneticamente determinados que a feminina, as ambigüidades genitais com cariótipo 46, XY apresentam uma maior complexidade para uma definição etiológica, como as anomalias de diferenciação gonadal (hermafroditismo verdadeiro e disgenesia gonadal) e os pseudo-hermafroditismos masculinos (defeitos de síntese, ação ou metabolismo dos andrógenos) (MIGEON et al., 2004).

O quadro clínico da deficiência da 5 $\alpha$ -redutase pode ser indistinguível das outras causas de pseudo-hermafroditismo masculino, em especial das insensibilidades androgênicas, principalmente na falta de casos semelhantes na família, quando não se pode avaliar o padrão de herança, e, antes da puberdade, na ausência de virilização e ginecomastia (QUIGLEY et al., 1995; IMPERATO-MCGINLEY e ZHU, 2002).

A virilização durante a puberdade e freqüente mudança da identificação psicossocial dos pacientes com deficiência da 5 $\alpha$ -redutase tipo 2, não gonadectomizados antes da puberdade, diferentemente dos casos com insensibilidade androgênica, reforçam a importância do diagnóstico precoce para escolha do sexo de criação (QUIGLEY et al., 1995; SINNECKER et al., 1996; IMPERATO-MCGINLEY e ZHU, 2002).

O diagnóstico da deficiência da 5 $\alpha$ -redutase é confirmado com a identificação da alteração molecular no gene *SRD5A2*. As alterações hormonais encontradas, que servem como triagem, são o aumento da relação T/DHT basal ou pós-estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG), que nem sempre é observado; a dosagem urinária diminuída de metabólitos 5 $\alpha$ -reduzidos; e a quantificação da atividade da 5 $\alpha$ -redutase em cultura de fibroblastos de pele da região genital, que apesar de mais específicas, e de alto custo são de difícil realização (WILSON et al., 1993).

A avaliação do HAM tem se mostrado de grande auxílio na avaliação de pacientes com ambigüidade genital, sendo encontrados valores elevados nos casos de insensibilidade androgênica. Já em pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2, foi relatada apenas em um estudo anterior do nosso grupo no qual 4 casos suspeitos para esta doença apresentaram valores de HAM abaixo da média, podendo indicar que a T não necessita ser

metabolizada em DHT para modular a secreção de HAM pelas células de Sertoli (PEREZ, 1999; PEREZ e GUERRA JR, 2000; REY et al., 1994; REY et al, 1999; STUCHI-PEREZ et al., 2000).

Portanto, o **objetivo** deste estudo foi avaliar as dosagens hormonais, incluindo a dosagem do HAM, de casos com diagnóstico molecular de deficiência de 5  $\alpha$ -redutase 2 em diferentes períodos da vida, do lactente ao adulto.

### ***3- CASUÍSTICA E MÉTODOS***

## CASUÍSTICA

Com o objetivo de selecionar um número maior de pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 foram contatados vários centros de investigação diagnóstica de intersexo. Foram incluídos neste estudo 14 casos de deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2, onde o diagnóstico foi confirmado com o encontro de mutação em pelo menos um dos alelos do gene *SRD5A2*. Todos os pacientes ou responsáveis incluídos no estudo autorizaram a pesquisa por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (Anexo 1).

A análise molecular do gene *SRD5A2* foi realizada no Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP. Após a extração do DNA de linfócitos de sangue periférico, realizou-se a amplificação dos 5 éxons do gene *SRD5A2* pela reação de PCR (KATZ et al., 1995) e seqüenciamento automático (*ABI Automated DNA Sequencer 377* - Perkin-Elmer).

As características clínicas dos 14 casos confirmados de deficiência de 5 $\alpha$ -redutase estão descritas na Tabela 3. Foram avaliadas 13 famílias, sendo 8 casos acompanhados no Departamento de Pediatria da Universidade Federal da Bahia (UFBA), em Salvador – BA (casos 1 a 7 – Tabela 3); 1 na Unidade de Endocrinologia Pediátrica da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo – SP (caso 8 – Tabela 3) e 5 no Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo (GIEDDS) da FCM – UNICAMP, em Campinas – SP (casos 9 a 13 – Tabela 3). A idade na época desta avaliação variou de 21 dias a 29 anos, sendo 2 casos até 3 meses de idade (casos 9 e 10), 4 pré-púberes (casos 1a,1b,2 e 8), 4 em puberdade (casos 4,5,11 e 13), 2 adultos (casos 7 e 12) e 2 gonadectomizados (casos 3 e 6).

Dez dos 14 casos, ou os próprios pacientes ou pelo menos um de seus pais, nasceram na Bahia (famílias 1-7,9 e 10), e os demais 4 em São Paulo. Quanto às características raciais observou-se que a maioria tinha origem afro-europeia (principalmente os casos com origem na BA), sendo apenas 3 casos de origem europeia (casos 8, 12 e 13).

Dez apresentavam sexo social masculino e 4 feminino (casos 1a,1b,6 e 7); 6 famílias com história de consaguinidade entre os pais (famílias 1,6,9-11 e 13) e 2 com história de outros casos de ambigüidade genital (famílias 1 e 10); as pacientes 1a e 1b são primas em 1º grau.

Quanto ao exame físico inicial, onze pacientes apresentavam ambigüidade genital com Prader grau III, 2 grau II e um com grau IV. Todos tinham história prévia de gônadas palpáveis, sendo que 7 apresentavam 1 ou 2 gônadas em região inguinal (4 pacientes bilateralmente e 3 com apenas a gônada direita criptorquídica). Duas pacientes haviam sido gonadectomizadas anteriormente à coleta do sangue para avaliação hormonal (casos 3 e 6). Em apenas em três pacientes foi observada a presença de próstata através de ultra-sonografia (casos 5,6 e 11).

Nove famílias apresentaram homozigose para mutação no gene *SRD5A2*, sete com substituição de aminoácidos, sendo 4 com G183S (casos 1,4,7 e 9), 2 com R246W (casos 10 e 11) e 1 com G196S (caso 13), e as outras 2 com alterações na fase de leitura, seja por perda de um nucleotídeo, del642T (caso 6) ou inserção de um nucleotídeo, 217\_218insC (caso 5). Em duas famílias foi observada heterozigose composta por uma mutação de troca de sentido em um dos alelos associada a uma mutação em sítio doador de *splicing* (Q126R/IVS3+1G>A) (caso 3) ou à perda de um nucleotídeo no outro (Q126R/del418T) (caso 12). Em dois casos, somente uma alteração molecular deletéria foi detectada, tratando-se, portanto, de heterozigotos para mutações no gene *SRD5A2* que levam à substituição de aminoácidos, como A207D (caso 2) e R246W (caso 8).

Foram também avaliados 20 indivíduos acompanhados no Hospital de Clínicas (HC) da UNICAMP por doenças agudas infecciosas, em fase de resolução, com pelo menos 15 dias após o término do tratamento, considerados como controles para dosagens séricas de T total, DHT e da relação T/DHT. Estes controles foram 3 lactentes, 8 pré-púberes, 5 adolescentes e 4 adultos.

**Tabela 3-** Características clínicas e moleculares dos 14 pacientes com deficiência da 5 $\alpha$ -redutase tipo 2.

	Idade	Origem /Etnia	Sexo de criação	Consanguinidade/ História familiar**	Genitalia externa***	Testículos D/E	Próstata	Gene SRD5A2
1a	2an6m	BA/ AE	F	+/+	II	I/I	-	Homo G183S
1b	5an2m	BA/ AE	F	+/+	II	I/I	-	Homo G183S
2	8an5m	BA/ AE	M	-/-	III	I/I	-	Hetero A207D
3	15an	BA /AE	M	-/-	III	S/S#	-	Q126R e IVS3+1G>A
4	16an	BA/ AE	M	-/-	III	S/S	-	Homo G183S
5	19an	BA/ AE	M	-/-	III	S/S	+	Homo 217_218insC
6	19an	BA/ AE	F	+/-	III	I/S#	+	Homo 642delT
7	27an	BA/ AE	F	-/-	III	I/S	-	Homo G183S
8	2an9m	SP/ EU	M	-/-	IV	S/S	-	Hetero R246W
9	21d	BA/ AE	M	+/-	III	S/S	-	Homo G183S
10	3m	BA/ AE	M	+/+	III	S/S	-	Homo R246W
11	18an4m	SP/ AE	M	+/-	III	I/I	+	Homo R246W
12	29an	SP/ EU	M	-/-	III	S/S	-	418delT e Q126R
13	16an	SP/ EU	M	+/-	III	I/S	-	Homo G196S

= Estado do Brasil onde os pais nasceram; \*\* = história de consanguinidade entre os pais e casos similares na família; \*\*\* = graus de ambigüidade sexual segundo PRADER (1954); # = antes da gonadectomia; an = anos; m = meses; d = dias; BA = Bahia; SP = São Paulo; AE = afro-europeu; EU = europeu; a e b = primas em primeiro grau; F = feminino; M = masculino; + = presente; - = ausente; D = direito; E = esquerdo; I = inguinal; S = escrotal; Homo = homozigose; Hetero = heterozigose.

## MÉTODOS

A avaliação hormonal de todos os casos e do grupo de 20 controles foi realizada no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP. Dos casos foram dosados HAM, LH, FSH, T e DHT; e dos controles, T e DHT.

A determinação sérica do HAM foi feita por ensaio imunoenzimático utilizando-se *kit* comercializado pela Immunotech, Marseille, França. O limite de sensibilidade deste ensaio foi de 2,75 pmol/L (1 ng/mL = 7 pmol/L). Foram utilizados para comparação os valores normais de HAM, de acordo com a idade estágio puberal, dosado com o mesmo método e *kit* e publicados por REY et al. (1999) e GUIBOURDENCHE et al. (2003).

As demais determinações hormonais também foram realizadas com *kits* comerciais disponíveis:

LH: Eletroquimioluminescência (Roche Elecsys 2010), limite de detecção de 0,1 a 200 UI/L. Os valores normais basais para o sexo masculino no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Patologia Clínica da FCM – UNICAMP são pré-púberes de 0,2 a 1,4 UI/L e púberes de 1,7 a 8,6 UI/L.

FSH: Eletroquimioluminescência (Roche Elecsys 2010), limite de detecção de 0,1 a 200 UI/L. Os valores normais basais para o sexo masculino no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Patologia Clínica da FCM – UNICAMP são pré-púberes de 0,2 a 3,8 UI/L e púberes de 1,5 a 12,4 UI/L.

T: Eletroquimioluminescência (Roche Elecsys 2010), limite de detecção de 0,02 a 15 ng/mL; alta correlação com radioimunoensaio disponível ( $r = 0,96$ ). Os valores normais basais para o sexo masculino no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Patologia Clínica da FCM – UNICAMP são pré-púberes de 0,02 a 0,7 ng/mL e púberes de 2,2 a 15 ng/mL, e pós-estímulo maior que 1,5 ng/mL.

DHT: Radioimunoensaio de fase sólida, com procedimento técnico de extração com n-hexano (DSL - 9600), limite de detecção de 0,025 a 2,5 ng/mL. Os valores normais basais para o sexo masculino no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Patologia Clínica da FCM – UNICAMP são pré-púberes de inferiores a 0,06 e púberes de 0,05 a 0,65 ng/mL.

Todos os pacientes pré-púberes e dois dos 8 controles, também pré-púberes, após os 6 meses de idade, foram submetidos à estímulo com hCG (Profasi® – Serono, 2.000 UI, IM por 3 dias consecutivos e coleta no 4º dia) para coleta das amostras de T total e DHT.

A análise dos resultados foi feita de forma descritiva, com cálculos de média, mediana e desvio-padrão.



## ***4- RESULTADOS***

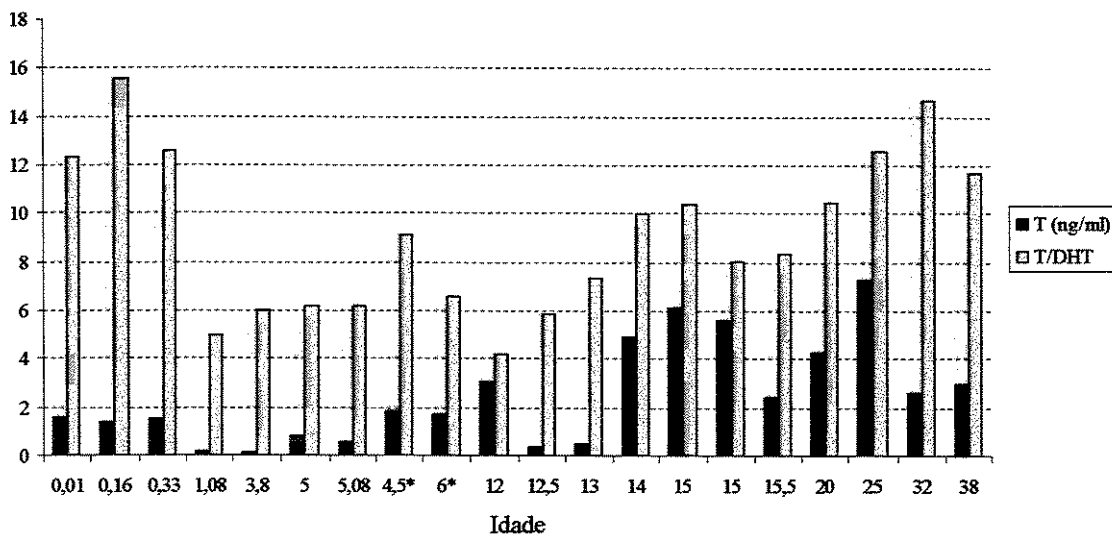
As dosagens de T total, DHT e a relação T/DHT dos 20 controles normais são mostradas na Tabela 4. Os maiores valores de T ocorreram nos controles púberes e adultos. Os menores valores de T ocorreram nos pré-púberes sem estímulo com hCG. Os valores de T dos lactentes foram comparáveis com os dos pré-púberes após hCG. A DHT variou de forma semelhante à T. A relação T/DHT apresentou seus maiores valores nos lactentes (15,5) e nos adultos (14,6).

**Tabela 4-** Valores de T total, DHT e da relação T/DHT nos controles, de acordo com idade e estágio puberal.

	Idade*	T (ng/mL)	DHT (ng/mL)	T/DHT
<b>Lactentes</b>	6d	1,6	0,13	12,3
	2m	1,4	0,09	15,55
	4m	1,55	0,12	12,9
<b>Pré-púberes basal</b>	1an1m	0,2	0,04	5,0
	3an10m	0,12	0,02	6,0
	5an	0,8	0,12	6,6
	5an1m	0,56	0,09	6,2
	12an6m	0,41	0,07	5,8
<b>Pré-púberes após hCG</b>	13an	0,5	0,07	7,1
	4an6m	1,82	0,2	9,1
	6an	1,71	0,26	6,57
<b>Púberes</b>	12an (G3P3)	3,05	0,72	4,23
	14an (G3P3)	4,91	0,49	10,02
	15an (G3P4)	6,1	0,59	10,3
	15an (G4P4)	5,62	0,7	8,02
	15an6m (G4P4)	2,4	0,286	8,39
<b>Adultos</b>	20an (G5P5)	4,3	0,41	10,48
	25an (G5P5)	7,3	0,58	12,58
	32an (G5P5)	2,63	0,18	14,6
	38an (G5P5)	3,0	0,256	11,7

\* idade na avaliação hormonal e estágio puberal (MARSHALL e TANNER, 1969); T = testosterona; DHT = dihidrotestosterona; an = anos; d = dias; m = meses

O Gráfico 1 mostra os valores de testosterona e da relação T/DHT dos controles um a um. Podemos observar que as concentrações de T seguiram o esperado para idade e estágio puberal, sendo que valores mais elevados foram encontrados até 6 meses de idade, caíram durante a infância e tenderam a se elevar após início da puberdade. A relação T/DHT tendeu a acompanhar os valores de T, e quanto maior a T maior a relação T/DHT.



**Gráfico 1-** Valores de T e da relação T/DHT dos controles em relação à idade (anos).

As dosagens hormonais dos pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 são mostradas na Tabela 5, de acordo com a idade e o desenvolvimento puberal.

Na maioria dos pacientes, com as gônadas presentes, os valores de LH observados estiveram dentro da faixa esperada para idade e estágio puberal (quando comparados com os valores utilizados como normais no Laboratório de Fisiologia da Patologia Clínica da FCM – UNICAMP); já os pacientes 11 e 12 mostraram valores de LH ligeiramente aumentados. Os pacientes 5, 11, 12 e 13 apresentaram FSH elevados. Nos pacientes com gonadectomia prévia os valores de LH e FSH estavam bastante elevados.

**Tabela 5-** Dosagem hormonal dos 14 pacientes com deficiência 5 $\alpha$ -redutase 2.

	Idade*	Estádio puberal**	LH (U/L)	FSH (U/L)	T (ng/mL)	DHT (ng/mL)	T/DHT	HAM (pmol/L)	HAM*** (M – 1DP)
9	21d	P1	3,8	0,7	14,3	0,08	179	174,0	253,0/ 258,3
10	3m	P1	5,5	4,4	7,0	0,05	140	220,0	253,0/ 441,7
1 <sup>a</sup>	2an6m	P1	< 0,1	2,5	1,5	0,03	50	60,0	188,0/ 383,6
8	2an9m	P1	< 0,1	0,9	8,7	0,03	290	136,0	188,0/ 383,6
1b	5an2m	P1	< 0,1	2,1	4,1	0,03	136	57,2	188,0/ 400,4
2	8an5m	P1	< 0,1	0,1	1,3	0,06	22	60,0	188,0/ 286,3
4	16an	P4	3,2	2,7	15,0	0,08	187	6,0	8,0
13	16an	P3	5,3	13,4	4,9	0,06	83	16,0	8,0
5	19an	P4	6,8	36,3	15,0	0,14	107	8,8	6,0
11	18an4m	P4	9,7	35,0	15,0	0,05	300	8,0	6,0
7	27an	P5	3,9	9,4	15,0	0,06	250	<2,75	4,0
12	29an	P5	8,9	15,6	15,0	0,04	375	4,0	4,0
3 <sup>#</sup>	15an	P1	19,2	68,1	NR	NR	NR	<2,75	<2,75
6 <sup>#</sup>	19an	P5	64,1	169,2	NR	NR	NR	<2,75	<2,75

\* idade durante avaliação hormonal; \*\* estágio dos pêlos pubianos de acordo com MARSHALL e TANNER (1969); \*\*\* valores da média – 1 desvio-padrão de HAM segundo REY et al. (1999) e GUIBOURDENCHE et al. (2003); <sup>#</sup> Gonadectomia anterior à avaliação hormonal; T = testosterona; DHT = dihidrotestosterona; HAM = hormônio anti-mülleriano; NR= não realizado; an = anos; d = dias; m = meses

A Tabela 6 compara os resultados de T, DHT, e da relação T/DHT com os controles.

**Tabela 6-** Variação dos valores de T total, DHT e da relação T/DHT dos pacientes e controles.

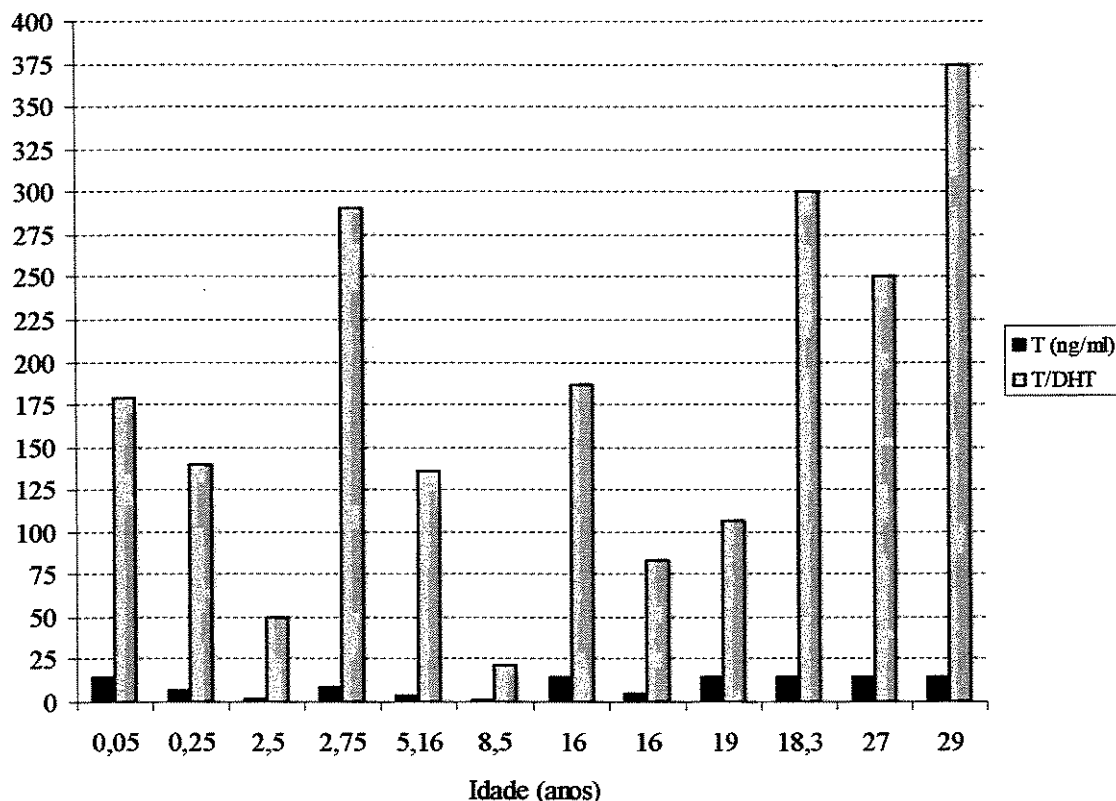
	T (ng/mL)		DHT (ng/mL)		T/DHT	
	Pacientes	Controles	Pacientes	Controles	Pacientes	Controles
Lactentes (n = 3/2)	7,0 - 14,3	1,4 - 1,6	0,05 - 0,08	0,09 - 0,13	179-140	12,3 - 15,5
Pré-púberes (basal) (n = 6)		0,1 - 0,8		0,02 - 0,12		5,0 - 7,1
Pré-púberes após hCG (n = 4/2)	1,3 - 8,7	1,7 - 1,8	0,03-0,06	0,2 - 0,3	22-290	6,7 - 9,0
Púberes (n = 4/5)	4,9 - 15	2,4 - 6,1	0,05 - 0,14	0,29 - 0,72	83-300	4,2 - 10,3
Adultos (n = 2/4)	15	2,6 - 7,3	0,04 - 0,06	0,18 - 0,58	250-375	10,5 - 14,6

n = número de pacientes/controles

Os valores de T nos pacientes foram normais a elevados, sendo alta nos 2 pacientes até 3 meses de idade e normal a elevada nos demais pacientes pré-púberes após o estímulo com hCG. Em todos os pacientes em puberdade ou adultos os valores encontraram-se no limite superior do método, ou seja 15 ng/mL, com exceção do paciente 13, com pubarca grau 3, com valor de 4,9 ng/mL; assim, todos os adultos e 4 dos 5 pacientes púberes tiveram T bem maior que os controles púberes e adultos. Todos os valores de DHT foram mais baixos em comparação com os controles. A maioria dos pacientes pré-púberes apresentou valores de DHT próximos do limite inferior de sensibilidade do método, variando de 0,03 a 0,06 ng/mL e nos púberes ou adultos, variou de 0,04 a 0,14 ng/mL. Portanto, todos os valores da relação T/DHT dos pacientes foram, no geral, bastante elevadas em relação aos controles normais. Em apenas dois pacientes a relação não se mostrou tão elevada: no paciente 2 foi de 22, e no paciente 1a foi de 50, sendo estes dois pacientes os que apresentaram os menores valores de T (1,3 e 1,5 ng/mL, respectivamente).

O Gráfico 2 mostra os valores de T e da relação T/DHT nos 12 pacientes que apresentavam testículo durante a avaliação hormonal. Observamos que os valores de T acompanharam a idade, sendo mais elevados até 6 meses e após a puberdade. Os valores

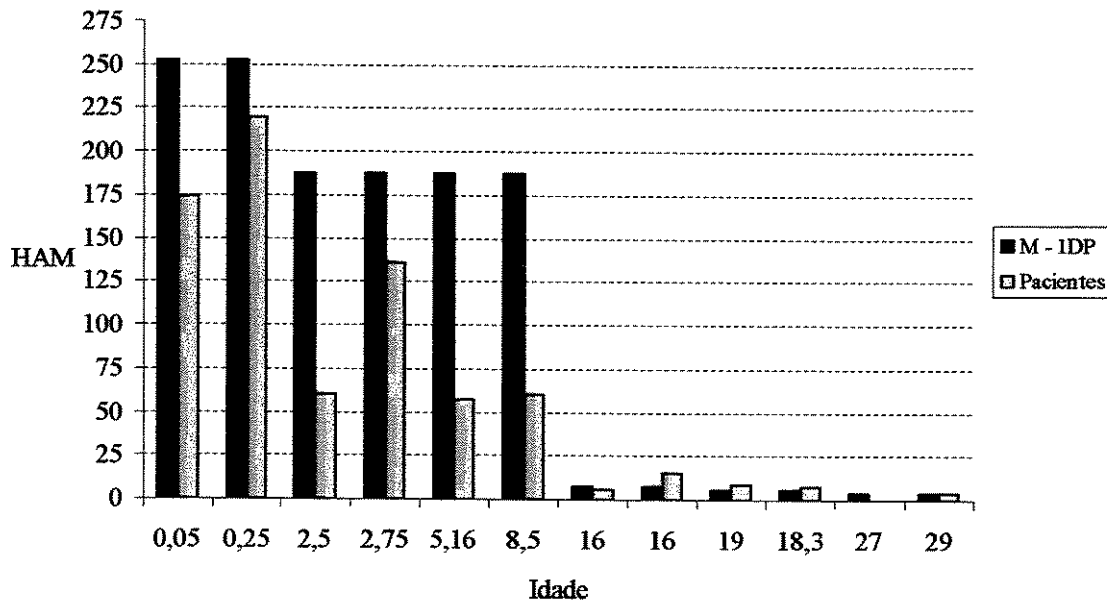
da relação T /DHT foram muito mais elevados quando comparados com os controles e também apresentaram relação com os níveis de T.



**Gráfico 2-** Valores de T e da relação T/DHT dos pacientes em relação à idade.

Na Tabela 5 estão os valores de HAM de cada paciente e a comparação com a média menos 1 DP dos valores descritos por REY et al. (1999) e GUIBOURDENCHE et al. (2003) em controles normais. Em todos os pacientes pré-púberes, os valores encontrados foram menores do que aqueles observados nos 2 estudos descritos na literatura para indivíduos normais da mesma idade. Nos pacientes púberes e adultos, os valores encontrados foram muito baixos, correspondendo praticamente ao limite inferior do ensaio. Como esperado, nos pacientes gonadectomizados, os valores de HAM foram indetectáveis.

O Gráfico 3 mostra os valores de HAM dos 12 pacientes em relação aos controles descritos por REY et al (1999). Os valores de HAM dos pacientes foram mais elevados até 6 meses, apresentando ligeira queda a partir de 2 anos e queda um pouco mais acentuada a partir do desenvolvimento da puberdade. Esta variação dos níveis de HAM é a mesma observada em indivíduos masculinos normais de acordo com a idade e estágio puberal, com a diferença que os pacientes pré-púberes aqui descritos apresentaram valores inferiores à média menos 1 DP para os controles descritos (REY et al., 1999; GUIBOURDENCHE et al., 2003) .



**Gráfico 3-** Valores de HAM dos pacientes e de controles (média – 1 DP), descritos por REY et al. (1999), em relação à idade (anos).

## *5- DISCUSSÃO*



A diferenciação sexual masculina envolve maior número de eventos geneticamente determinados que a feminina. Indivíduos com ambigüidade genital, cariótipo 46,XY apresentam diagnóstico etiológico complexo incluindo anomalias da diferenciação gonadal (hermafroditismo verdadeiro e disgenesia gonadal) e pseudo-hermafroditismo masculino. No grupo de pseudo-hermafroditismo masculino estão os casos de defeito de síntese, ação ou metabolismo de andrógenos, e neste último grupo, estão as insensibilidades androgênicas e a deficiência da 5 $\alpha$ -redutase 2 (MIGEON et al., 2004).

Nos casos de insensibilidade androgênica na forma parcial e de deficiência da enzima 5 $\alpha$ -redutase 2, os quadros clínico e laboratorial podem ser muito semelhantes, em especial antes da puberdade, fazendo com que a diferenciação seja realizada somente pelo estudo molecular. Há muitos relatos de casos de deficiência da 5 $\alpha$ -redutase 2 criados como mulheres e que freqüentemente enfrentam na puberdade a indefinição ou mudança masculina da identidade psicossocial, o que freqüentemente não ocorre na insensibilidade androgênica. É possível que a exposição de receptores de andrógenos cerebrais à T influencie no comportamento masculino, daí a importância da precisão e precocidade no diagnóstico (WILSON et al., 1993; QUIGLEY et al., 1995; AMMINI et al., 2002; IMPERATO-MCGINLEY e ZHU, 2002).

Frente a um caso de ambigüidade genital, com cariótipo 46,XY, sem história de consangüinidade ou casos semelhantes na família, fora da puberdade, e com valor de T normal ou elevada, os dados que podem auxiliar na diferenciação entre deficiência da 5 $\alpha$ -redutase 2 e insensibilidade androgênica são a relação T/DHT e a avaliação molecular dos respectivos genes.

A avaliação molecular é necessária para a confirmação diagnóstica dos casos, particularmente em indivíduos gonadectomizados e em alguns casos pré-púberes, pois a dosagem hormonal depende da estimulação gonadal adequada, o que nem sempre é possível de se alcançar em pacientes que não atingiram a puberdade (SINNECKER et al., 1996; IMPERATO-MCGINLEY e ZHU, 2002). Assim, somente os pacientes que apresentavam mutação em um ou mais alelos do gene *SRD5A2* foram incluídos neste estudo.

Pode-se observar nesta casuística que 9 das 13 famílias apresentaram mutações em homozigose, destas 6 relatavam consangüinidade. Como esperado em doenças com padrão de herança autossômico recessivo, causadas por mutações relativamente raras, a taxa de consangüinidade nesta casuística foi elevada. Outras 2 famílias apresentaram 2 mutações diferentes, caracterizando um quadro de heterozigose composta. Nos demais 2 casos encontrou-se apenas um alelo mutante, permitindo-se supor a existência de mutações em seqüências intrônicas ou em região promotora, que não foram estudadas no presente trabalho. Além disso, em função da metodologia utilizada, não é possível excluir a possibilidade de deleção parcial ou total de um dos alelos. Fenômenos epigenéticos (tais como metilação da região promotora) que bloqueiem a transcrição do gene também devem ser considerados. Contudo, a região promotora do gene *SRD5A2* ainda não foi devidamente caracterizada quanto às seqüências reguladoras que poderiam ser importantes no controle de sua expressão, restando esta questão em aberto para futuras investigações.

A mutação G183S ocorreu em 4 famílias, todas procedentes da Bahia, enquanto que a mutação R246W ocorreu em 3 famílias, 2 de São Paulo e 1 da Bahia, e a mutação Q126R em 2 famílias em heterozigose composta, sendo 1 da Bahia e 1 de São Paulo. Em pacientes brasileiros, a mutação Q126R parece ser uma das mais comuns em descendentes de portugueses, enquanto que a mutação G183S tem sido relatada em pacientes com ancestrais negróides (FERRAZ et al., 1998) e a R246W em caucasóides europeus. As mutações del642T, 217\_218insC e IVS3+1G/A foram descritas pela primeira vez neste grupo de pacientes.

Quanto à avaliação hormonal dos pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 deste estudo, que apresentavam gônadas, foi observado que as concentrações de LH foram ligeiramente elevadas em 2 dos 12 pacientes (pacientes 11 e 12) e as de FSH foram elevadas em 4 dos 12 pacientes (pacientes 5, 11, 12 e 13), mesmo com os valores elevados de T que 3 dos 4 pacientes apresentavam. Estes achados são concordantes com o que é relatado na literatura onde os valores de LH e FSH encontrados em pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 podem variar do normal a aumentados, mas com um aumento mais discreto do LH quando comparado aos valores observados em pacientes com insensibilidade androgênica. Este fato pode ser explicado pela falta da inibição sobre a

secreção de gonadotrofinas pelas baixas concentrações de DHT nos pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 e pela não ação da T nos receptores androgênicos dos gonadotrofos na insensibilidade androgênica, onde a falta desta inibição é mais intensa (WILSON et al., 1993; QUIGLEY et al, 1995; IMPERATO-MCGINLEY e ZHU, 2002). Em um destes pacientes foi observada a presença de criptorquidia bilateral não corrigida (paciente 11), o que pode explicar também o aumento de LH e FSH neste paciente. Os outros 2 pacientes apresentavam gônadas tópicas (pacientes 5 e 12), e a criptorquidia unilateral estava presente em outro (13).

Os valores de T dos pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 foram em geral mais elevados que os valores de T dos controles, fato já relatado na literatura: pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 apresentam maior resposta de T ao estímulo com hCG (AHMED e HUGHES, 2000; IMPERATO-MCGINLEY e ZHU, 2002). O valor máximo da T nos controles foi de 7,3 ng/mL, enquanto que nos pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2, a T chegou ao limite superior do método (15 ng/mL).

Para que a relação T/DHT tenha relevância, é importante que seja feita com um valor significativo de T. Assim, quando o indivíduo tem mais de 6 meses de idade e ainda sem o desenvolvimento da puberdade deve ser feito estímulo com hCG, que apresenta resultados semelhantes ao da aplicação de T na avaliação da conversão de T em DHT (GREENE et al., 1987). A dose que foi utilizada (2000 UI/d, por 3 dias consecutivos) é semelhante às descritas na literatura (IMPERATO-MCGINLEY et al., 1986; EL-AWADY et al., 1989; HIORT, 1996b; MENDONÇA et al., 1996; MAZEN et al., 2003).

Apenas dois pacientes apresentaram a T em concentrações não muito elevadas. Foram eles os pacientes 1a e 2 (T = 1,5 e 1,3 ng/mL), que apresentavam gônadas em região inguinal bilateral sem correção até 2 anos de idade.

Tanto nos controles como nos pacientes avaliados, a relação T/DHT se mostrou proporcional ao nível de T, ou seja, quanto maior a T maior tende ser a relação T/DHT.

Os valores da relação T/DHT dos controles normais deste estudo, cujo valor máximo observado foi de 15,5, foram bastante compatíveis com o que há na literatura onde são descritos valores de até 17 sem estímulo com hCG e de em torno de 30 após estímulo,

mesmo com alguma diferença da metodologia (IMPERATO-MCGUINLEY et al., 1974; PETERSON et al., 1977; PANG et al., 1979; MENDONÇA et al., 1996).

Na maioria dos trabalhos relatados na literatura foi utilizado o radioimunoensaio, enquanto que neste trabalho utilizou-se a eletroquimioluminescência para dosagem de T, que apresenta alta correlação com os radioimunoensaios usados atualmente. Assim, é possível comparar os resultados da T e da relação T/DHT deste trabalho com o que há descrito na literatura.

A maioria dos pacientes desta casuística apresentou a relação T/DHT bastante elevada em relação ao controle, sendo que em apenas um paciente (caso 2), esta relação foi discretamente elevada, com resultado igual a 22. Este paciente apresentou o menor nível de T (1,3 ng/ml) e no estudo molecular ele é heterozigoto simples. No restante dos pacientes, que apresentaram T maior que 1,5 ng/ml, a relação T/DHT foi maior que 50. Talvez seja este o menor valor de T necessário para que a relação T/DHT seja representativa.

Os valores da relação T/DHT em paciente com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 descritos na literatura variam do normal a valores próximos de 300. Há uma grande variação entre os valores basais e após hCG no mesmo paciente, ressaltando a importância da T com estímulo para a relação T/DHT. (PETERSON *et al.*, 1977; WILSON et al., 1993; CAI *et al.*, 1996; HIORT *et al.*, 1996; MENDONÇA *et al.*, 1996; GAD *et al.*, 1997; AHMED & HUGHES, 2000; VILCHIS *et al.*, 2000; MAZEN *et al.*, 2003). Em geral, os valores encontrados neste trabalho são mais elevados.

Explicações para estes resultados mais elevados da relação T/DHT nestes pacientes em relação aos demais da literatura podem ser dadas pela inclusão de apenas indivíduos com diagnóstico molecular confirmado e pela gravidade dos casos, pois todos, a exceção de um (caso 8), apresentavam hipospádia perineal. Apenas após a clonagem do gene *SRD2A2* (ANDERSSON e RUSSELL, 1990; LABRIE et al, 1992) é que os trabalhos passaram a apresentar pacientes com o diagnóstico molecular confirmado (Tabela 2 - revisão de literatura). Outra hipótese que também pode explicar tais resultados foram os valores elevados de T encontrados nestes pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2.

Mesmo assim, na presença de um paciente pseudo-hermafrodita masculino com relação T/DHT normal, o diagnóstico de deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 não pode ser descartado totalmente. Estes resultados mostram a necessidade do estímulo com hCG, nos pacientes fora da puberdade, para aumentar a T e tornar a relação T/DHT representativa e não falsamente normal ou baixa.

O fato de que a secreção do HAM apresenta relação inversa com a T também ficou confirmada nos resultados deste estudo, o qual mostra de forma inédita a dosagem do HAM baixa em pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2. Todos os valores de HAM dos pacientes pré-púberes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 foram abaixo de -1DP da média em relação aos controles normais, segundo REY et al. (1999) e mais baixos ainda que os descritos por GUIBOURDENCHE et al. (2003). Apesar dos valores nos pacientes adultos e púberes não estarem abaixo de -1DP dos valores normais descritos por REY et al. (1999), todos foram abaixo da média.

Estes resultados confirmam a hipótese de que o aumento da T, na presença de receptores androgênicos íntegros, inibe a secreção de HAM pelas células de Sertoli sem precisar da conversão de T para DHT. Entretanto, o fato das concentrações do HAM em pacientes pré-púberes estarem diminuídas em relação aos controles pode não estar totalmente resolvida. Talvez isto aconteça por um aumento de produção intra-testicular de T (diminuição da inibição de LH pela DHT diminuída) que ocorre nos pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2, mesmo num período em que o testículo deveria estar quiescente, mas que coincide com o aumento progressivo da expressão dos receptores de andrógenos nas células de Sertoli (AL-ATTAR et al., 1997).

Quando comparados os valores encontrados nos pacientes deste estudo em relação àqueles com insensibilidade androgênica descritos REY et al. (1999) (Tabela 7), observa-se que todos os valores de HAM dos pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 foram mais baixos, especialmente em relação às formas completas de insensibilidade androgênica, mas também em relação às formas parciais.

**Tabela 7-** Valores de HAM de controles normais e de pacientes com insensibilidade androgênica, segundo REY et al. (1999) e dos 12 pacientes com deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2 deste estudo.

Idade	n	Controles	n	IA	n	SDR5A2
		M $\pm$ DP		M $\pm$ DP		Varição
<15d	6	229 $\pm$ 145	6	708 $\pm$ 443 (C+P)	0	-
15d – 1a	22	495 $\pm$ 202	12	1056 $\pm$ 591 (C+P)	2	174 – 220
1 – 9a	47	430 $\pm$ 242	13	391 $\pm$ 199 (C+P)	4	60 – 136
>9a	84	132 $\pm$ 128	6	147 $\pm$ 75 (P)	6	<2.75 – 16*
			7	1172 $\pm$ 700 (C)		

IA= síndrome de insensibilidade androgênica; P= forma parcial; C= forma completa; SDR5A2 = deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2; \*excluídos os pacientes gonadectomizados

Assim, a inclusão da dosagem do HAM na avaliação hormonal pode ser decisiva para guiar a investigação molecular, direcionando a suspeita diagnóstica em pacientes com ambigüidade genital, cariótipo 46,XY e T normal ou elevada: aqueles com valores de HAM acima da média para idade e estágio puberal devem ser encaminhados para análise molecular do gene do receptor de andrógenos e pacientes com valores de HAM abaixo da média para idade e estágio puberal devem ser encaminhados para análise do gene *SRD5A2*.

## ***6- CONCLUSÕES***

Os dados deste estudo permitem concluir que os pacientes com alteração molecular no gene *SRD5A2*:

- 1- apresentam valores de T e da relação T/DHT maiores que os controles em qualquer período da vida, desde que adequadamente estimulados;
- 2- que apresentam T maior que 1,5 ng/mL têm também relação T/DHT maior ou igual a 50, sugerindo o diagnóstico de deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2;
- 3- e apresentam o HAM abaixo de -1DP da média, especialmente antes do início da puberdade.



## ***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

AL-ATTAR, L.; NOËL, K.; DUTERTRE, M.; BELVILLE, C.; FOREST, M.G.; URGOYNE, P.S.; et al. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. **J Clin Invest**, 100: 1335-43, 1997.

AHMED, S.F.; HUGHES, A. Pituitary-gonadal axis in male undermasculinisation. **Arch Dis Child**, 82: 54-58, 2000.

ALLARD, S.; ADIN, P.; GOUÉDARD L; DI CLEMENTE, N.; JOSSO, N.; ORGEBIN-CRIST, M.C. et al. Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of  $\beta$ -catenin. **Development** 127: 3349-60, 2000.

AMMINI, A.C.; GUPTA, R.; KAPOOR, A.; KARAK, A.; KRIPLANI, A.; GUPTA, D.K. et al. Etiology, clinical profile, gender identity and long-term follow up of patients with ambiguous genitalia in India. **J Pediatr Endocrinol Metab**, 15: 423-30, 2002.

ANDERSSON, S.; BERMAN, D.M.; JENKINS, E.P.; RUSSELL, D.W. Deletion of steroid 5  $\alpha$ -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. **Nature**, 354: 159-61, 1991.

ANDERSSON, S.; BISHOP, R.W.; RUSSELL, D.W. Expression cloning and regulation of steroid 5 $\alpha$ -reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation. **J Biol Chem**, 264: 16249-55, 1989.

ANDERSSON, S.; RUSSELL D.W. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 $\alpha$ -reductases. **Proc. Natl Acad Sci USA**, 87: 3640-4, 1990.

ARANGO, N.A.; LOVELL-BADGE, R.; BEHRINGER, R. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. **Cell**, 99: 409-19, 1999.

BAKER, M.L.; METCALFE, S.A.; HUSTON, J.M. Serum levels of Müllerian inhibiting substance in boys from birth to 18 years, as determined by enzyme immunoassay. **J Clin Endocrinol Metab**, 70: 11-5, 1990.

BÉZARD, J.; VIGIER, B.; TRAN, D.; MAULÉON P.; JOSSO N. Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. **J Reprod Fert**, 80: 509-16, 1987.

BLANCHARD, M.G.; JOSSO, N. Source of the anti-Müllerian hormone synthesized by the fetal testis: Müllerian-inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in tissue culture. **Pediatr Res**, 8: 968-71, 1974.

BYRD, W.; BENNETT, M.J.; CARR, B.C.; DONG, Y.; WIANS, F.; RAINEY, W. Regulation of biological active dimeric inhibin A and B from infancy to adulthood in male. **J Clin Endocrinol Metab**, 83: 2849-54, 1998.

CAI, L.-Q.; FRATIANNI, C.M.; GAUTIER, T.; IMPERATO-MCGINLEY, J. Dihydrotestosterone regulation of semen in male pseudohermaphrodites with 5 alpha-reductase-2 deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, 79: 409-14, 1994.

CAI, L.-Q.; ZHU, Y.S.; KATZ, M.D.; HERRERA, C.; BAÉZ, J.; DEFILLO-RICART, M. et al. 5 $\alpha$ -reductase gene mutation in the Dominican Republic. **J Clin Endocrinol Metab**, 81: 1730-5, 1996.

COHEN-HAGUENAUER, O.; PICARD, J.Y.; MATTÉL, M.G.; SERERO, S.; NGUYEN, V.C.; DE TAND, M.F. et al. Mapping of the gene for anti-Müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. **Cytogenet Cell Genet**, 44: 2-6, 1987.

DE VET, A.; LAVEN, J.S.E.; DE JONG, F.H.; THEMME, A.P.N.; FAUSER, B.C.J.M. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. **Fertil Steril**, 77: 357-62, 2002.

DI CLEMENTE, N.; JOSSO, N.; GOUÉDARD, L.; BELVILLE, C. Components of the anti-Müllerian hormone signaling pathway in gonads. **Mol Cell Endocrinol** 211: 9-14, 2003.

DI CLEMENTE, N.; WILSON, C.; FAURE, E.; BOUSSIN, L.; CARMILLO, P.; TIZARD, R. et al. Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. **Mol Endocrinol**, 8: 1006-20, 1994.

- EICHELER, W.; TUOHIMAA, P.; VILJA, P.; ADERMANN, K.; FORSSMANN, W.G.; AUMÜLLER, G. Immunocytochemical localization of human 5 $\alpha$ -reductase 2 with polyclonal antibodies in androgen target and non-target human tissues. **J Histochem Cytochem**, 42: 667-75, 1994.
- EL-AWADY, M.; SALAM, M.A.; GAD, Y.Z.; EL-SABAN. Dihydrotestosterone regulates plasma sex-hormone-binding globulin in prepubertal males. **Clin Endocrinol**, 30: 279-84, 1989.
- FERRAZ, L.F.C.; GUERRA-JUNIOR, G.; BAPTISTA, M.T.M.; MACIEL-GUERRA, A.T.; HACKEL, C. Detection of Gly-196-Ser mutation in 5 $\alpha$ -reductase type II gene in a Brazilian patient with female assignment and behavior. **J Pediatr Endocrinol Metab**, 11: 465-6, 1998.
- FERRAZ, L.F.C.; BAPTISTA, M.T.M.; MACIEL-GUERRA, A.T.; GUERRA-JUNIOR, G.; HACKEL, C. New frameshift mutation in the 5 $\alpha$ -reductase type 2 gene in a Brazilian patient with 5 $\alpha$ -reductase deficiency. **Am J Med Genet**, 87: 221-5, 1999.
- FORTI, G.; FALCHETTI, A.; SANTORO, S.; DAVIS, D.L.; WILSON, J.D.; RUSSELL, D.W. Steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency: virilization in early infancy may be due to partial function of mutant enzyme. **Clin Endocrinol**, 44: 477-82, 1996.
- GAD, Y.Z.; NASR, H.; MAZEN, I.; SALAH, N.; RIDI, R.E. 5  $\alpha$ -reductase deficiency in patients with micropenis. **J Inher Metab Dis**, 20: 95-101, 1997.
- GIULLI, G.; SHEN, W.H.; INGRAHAM, H.A. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Müllerian inhibiting substance, in vivo. **Development** 124: 1799-807, 1997.
- GRANT, D.B.; LAURANCE, B.M.; ATHERDEN, S.M.; RYNESS, J.: HCG stimulation test in children with abnormal sexual development. **Arch Dis Child**, 51: 596-601, 1976.
- GREENE, S.; ZACHMANN, M.; MANELLA, B.; HESSE, B.; HOEPFFNER, W.; WILLGERODT, H. et al. Comparison of two tests to recognize or exclude 5 alpha-reductase deficiency in prepubertal children. **Acta Encocrinol (Copenh)**, 114: 113-7, 1987.

GRINO, P.B.; GRIFFIN, J.E.; WILSON, J.D. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. **Endocrinology**, 126: 1165-72, 1990.

GROOME, N.P.; ILLINGWORTH, P.J.; O'BRIEN, M.; PAL, R.; RODGER, F.E.; MATHER, J.P. et al. Measurement of dimeric inhibin-B throughout the human menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab**, 81: 1401-5, 1996.

GRUIJTERS, M.J.G.; VISSER, J.A.; DURLINGER, A.L.; THEMME, A.P.N. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. **Mol Cell Endocrinol**, 211: 85-90, 2003.

GUIBOURDENCHE, J.; LUCIDARME, J.; CHEVENNE, D; RIGAL, M; NICOLAS, M.; LUTON, D. et al. Anti-Müllerian hormone levels in serum from human foetuses and children: pattern and clinical interest. **Mol Cell Endocrinol**, 211: 55-63, 2003.

GUSTAFSON, M.L.; LEE, M.M.; ASMUNDSON, L.; MACLAUGHLIN, D.T.; DONAHOE, P.K. Müllerian inhibiting substance in the diagnosis and management of intersex and gonadal abnormalities. **J Pediatr Surg**, 28: 439-44, 1993.

GUSTAFSON, M.L.; LEE, M.M.; SCULLY, R.E.; MONCURE, A.C.; HIRAKAWA, T.; GOODMAN, A. et al. Müllerian inhibiting substance as a marker for ovarian sex-cord tumor. **N Engl J Med**, 326: 466-71, 1992.

HARBISON, M.D.; MAGID, M.L.; JOSSO, N.; MININBERG, D.T.; NEW, M.I. Anti-Müllerian hormone in three intersex conditions. **Ann Génét**, 3-4: 226-32, 1991.

HIORT, O.; SINNECKER, G.H.G.; WILLENBRING, H.; LEHNERS, A.; ZÖLLNER, A.; STRUVE, D. Nonisotopic single strand conformation analysis of the 5 $\alpha$ -reductase type 2 gene for the diagnosis of 5 $\alpha$ -reductase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, 81: 3415-8, 1996a.

HIORT, O.; WILLENBRIG, H.; ALBERS, N.; HECKER, W.; ENGERT, J.; DIBBELT, L. et al. Molecular genetic analysis and human chorionic gonadotropin stimulation tests in the diagnosis of prepubertal patients with partial 5 $\alpha$ -reductase deficiency. **Eur J Pediatr**, 155: 445-51, 1996b.

HONG, C.Y.; PARK, J.H.; SEO, K.H.; KIM, J.M.; IM, S.Y.; LEE, J.W. et al. Expression of MIS in the testis is down regulated by Tumor Necrosis Factor Alpha through the negative regulation of SF-1 Trans activation by NP- $\kappa$ B. **Mol Cell Biol**, 23: 6000-12, 2003.

HUDSON, P.L.; DOUGAS, I.; DONAHOE, P.K.; CATE, R.L.; EPSTEIN, J.; PEPINSKY, R.B. et al. An immunoassay to detect human Mullerian inhibiting substance in males and females during normal development. **J. Clin Endocrinol Metab**, 70:16-22, 1990.

IMBEAUD, S.; BELVILLE, C.; MESSIKA-ZEITOUN, L.; REY, R.; CLEMENTE, N.; JOSSO, N. et al. A 27 base-pair deletion of the anti-Müllerian type II receptor gene is the most common cause of the persistent Müllerian duct syndrome. **Hum Mol Genet**, 5: 1269-77, 1996.

IMBEAUD, S.; FAURE, E.; LAMARRE, I.; MATTÉI, M.G.; DI CLEMENTE, N.; TIZARD, R. et al. Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor. **Nat Genet**, 11: 382-8, 1995.

IMPERATO-MCGINLEY, J.; GAUTIER, T.; PICHARDO, M.; SHACKLETON, C. The diagnosis of 5 $\alpha$ -reductase deficiency in infancy. **J Clin Endocrinol Metab**, 63: 1313-8, 1986.

IMPERATO-MCGINLEY, J.; GAUTIER, T.; ZIRINSKY, K.; HOOM, T.; PALOMO, O.; STEIN, E. et al. Prostate visualization studies in males homozygous and heterozygous for 5 $\alpha$ -reductase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, 75: 1022-6, 1992.

IMPERATO-MCGINLEY, J.; PETERSON, R.E.; GAUTIER, T.; STURLA, E. Androgens and the evolution of male-gender identity among male pseudohermaphrodites with 5 $\alpha$ -reductase deficiency. **N Engl J Med**, 300: 1233-7, 1979.

IMPERATO-MCGINLEY, J.; ZHU, Y.S. Androgens and male physiology the syndrome of 5 $\alpha$ -reductase-2 deficiency. **Mol Cell Endocrinol**, 198: 51-9, 2002.

JÉGOU, B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. **Int. Rev. Cytol.**, 147: 25-96, 1993.

- JOSSO, N. Hormonal regulation of sexual differentiation. **Semin Perinatol**, 16: 279-88, 1992.
- JOSSO, N. Paediatric applications of anti-Müllerian hormone research. **Horm Res**, 43: 243-8, 1995.
- JOSSO, N.; BOUSSIN, L.; KINBELMANN, B.; NOHOUL-FÉKÉTÉ, C.; PICARD, J.Y. Anti-Müllerian hormone and intersex states. **Trends Endocrinol Metab**, 2: 227-33, 1991.
- JOSSO, N.; CATE, R.; PICARD, J.Y.; VIGIER, B.; DI CLEMENTE, N.; WILSON, C. et al. Anti-Müllerian hormone: the Jost factor. **Rec Prog Horm Res**, 48: 1-59, 1993.
- JOSSO, N.; DI CLEMENTE, N. Transduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF- $\beta$  family. **Trends Endocrinol Metab** 14: 91-7, 2003.
- JOSSO, N.; DI CLEMENTE, N.; GOUÉDARD, L. Anti-Müllerian hormone and its receptors. **Mol Cel Endocrinol**, 179: 25-32, 2001.
- JOSSO, N.; LEGEAL, L., FORREST, M.G.; CHAUSSAIN, J.L.; BRAUNER, R. An enzyme linked immunoassay for anti-Müllerian hormone: a new tool form the evaluation of testicular function in infants and children. **J Clin Endocrinol Metab**, 70: 23-7, 1990.
- JOSSO, N.; PICARD, J.Y.; IMBEUD, S.; DI CLEMENTE, N.; REY, R. Clinical aspects and molecular genetics of the persistent Müllerian duct syndrome. **Clin Endoc**, 47: 137-44, 1997.
- JOSSO, N.; REY, R. L'hormone anti-Müllérienne en clinique humaine. **Contracept Fertil Sex**, 22: 661-3, 1994.
- JOST, A. Recherches sur la differenciation sexuelle de l'embryon de lapin. **Arch Anat Microsc Morphol Exp**, 36:271-315, 1947.
- JOST, A. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. **Recent Prog Horm Res**, 8: 379-418, 1953.

- KATZ, M.D.; KLIGMAN, I.; CAI, L.-Q.; ZHU, Y.-S.; FRATIANNI, C.M.; ZERVOUDAKIS, I. et al. Paternity by intrauterine insemination with sperm from a man with 5 $\alpha$ -reductase-2 deficiency. *N Engl J Med*, 336: 994-7, 1997.
- LABRIE, F.; SUGIMOTO, Y.; LUU-THE, V.; SIMARD, J.; LACHANCE, Y.; BACHVAROV, D. et al. Structure of human type II 5 $\alpha$ -reductase gene. *Endocrinology*, 131:1571-3, 1992.
- LASALA, C.; CARRÉ-EUSÈBE, D.; PICARD, J.Y.; REY, R. Subcellular and Molecular Mechanisms Regulating Anti-Müllerian hormone gene expression in mammalian and nonmammalian species. *DNA Cell Biol*, 23: 572-85, 2004.
- LEE, M.M.; DONAHOE, P.K.; HASEGAWA, T.; SILVERMAN, B.; CRIST, G.B.; BEST, S. et al. Müllerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*, 81: 571-6, 1996.
- LEVY, M.A.; BRANDT, M.; GREWAY, A.T. Mechanistic studies with solubilized rat liver steroid 5 $\alpha$ -reductase: elucidation of the kinetic mechanism. *Biochemistry*, 29: 2808-15, 1990.
- LINDZEY, J.; KUMAR, M.V.; GROSSMAN, M.; YOUNG, C.; TINDALL, D.J. Molecular mechanisms of androgen action. *Vit Horm*, 49: 383-432, 1994.
- LONG, W.Q.; RANCHIN, V.; PAUTIER, P.; BELVILLE, C.; DENIZOT, P.; CAILLA, H. et al. Detection of minimal levels of serum anti-Müllerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 540-4, 2000.
- LONGUI, C., A.; ARNHOLD, I., J., P.; MENDONÇA, B., B.; D'OSVALDO, A., F.; BLOISE, W. Serum inhibin levels before and after gonadotropin stimulation in cryptorchid boys under age 4 years. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 11: 687-92, 1998.
- LUKAS-CROISIER, C.; LASALA, C.; NICAUD, J.; BEDECARRÁS, P.; KUMAR, T.R.; DUTERTRE, M. et al. Follicle-stimulating hormone increases testicular anti-Müllerian hormone (AMH) production through Sertoli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated activation of the AMH gene. *Mol Endocrinol*, 17: 550-61, 2003.



MAJDIC, G.; MILLAR, M.R.; SAUNDERS, P.T.K. Immunolocalisation of androgen receptor to interstitial cells in fetal rat testes and to mesenchymal and epithelial cell of associated ducts. **J Endocrinol**, 147: 285-93, 1995.

MARSHALL, W.A.; TANNER, J.M. Variation in pattern of pubertal changes in boys. **Ach Dis Child**, 44: 291-303, 1969.

MAZEN, I.; GAD, Y.Z.; HAFEZ, M.; SULTAN, C.; LUMBROSO S. Molecular analysis of 5 $\alpha$ -reductase type 2 gene in eight unrelated Egyptians children with suspected 5 $\alpha$ -reductase deficiency: prevalence of the G34R mutation. **Clin Endocrinol**, 58: 627-31, 2003.

MELCANGI, R.C.; POLETTI, A.; CAVARRETTA, I.; CELOTTI, F.; COCIAGO, A.; MAGNAGHI, V. et al. The 5 $\alpha$ -reductase in the central nervous system: expression and modes of control. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 65: 295-9, 1998.

MENDONÇA, B.B.; INACIO, M.; COSTA, E.M.F.; ARNHOLD, I.J.P.; SILVA, F.A.Q.; NICOLAU, W. et al. Male pseudohermaphroditism due to steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. **Medicine**, 75: 64-76, 1996.

MIGEON, C.J.; BERKOVITZ, G.D.; WISNIEWSKI, A.B. Sex determination, differentiation, and identity. **N Engl J Med**, 350: 2204-6, 2004.

MISRA, M.; MACLAUGHLIN, D.; DONAHOE, P.K.; LEE, M. Measurement of Müllerian inhibiting substance facilitates management of boys with microphallus and cryptorchidism. **J Clin Endocrinol Metab**, 87: 3598-602, 2002.

MOREL, Y.; REY, R.; TEINTURIER, C.; NICOLINO, M.; MICHEL-CALEMARD, L.; MOWSZOWICZ, I. et al. Aetiological diagnosis of male sex ambiguity: a collaborative study. **Eur J Pediatr** 161: 49-59, 2002.

MORISSETE, J.; DUROCHER, F.; LEBLANC, J.-F.; NORMAND, T.; LABRIE, F.; SIMARD, J. Genetic linkage mapping of the human steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 gene (SRD5A2) close to D2S352 on chromosome region 2p23→p22. **Cytogenet Cell Genet**, 73: 304-7, 1996.

NOWAKOWSKI, H.; LENZ, W. Genetic aspects in male hypogonadism. **Recent Prog Horm Res** 17: 53-95, 1961.

PANG, S.; LEVINE, L.S.; CHOW, D.; SAGIANI, F.; SANNER, P.; NEW, M. Dihydrotestosterone and its relationship to testosterone in infancy and childhood. **J Clin Endocrinol Metab**, 48: 821-6, 1979.

PEPINSKY, B.R.; SINCLAIR, L.K.; CHOW, E.P.; MATTALIANO, R.J.; MANGANARO, T.F.; DONAHOE, P.K. et al. Proteolytic processing of Müllerian inhibiting substance produces a transforming growth factor- $\beta$ -like fragment. **J Biol Chem**, 263: 18961-4, 1988.

PEREZ, E.G.S. **Avaliação funcional das células de Leydig e de Sertoli em 24 casos de ambigüidade genital com cariótipo 46,XY.**- Campinas, 1999 (Tese-Mestrado-Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas).

PEREZ, E.G.S.; GUERRA JR, G. Hormônio anti-Mülleriano: revisão e contribuição para a investigação das ambigüidades genitais. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 44: 425-433, 2000.

PETERSON, R.; IMPERATO-MCGINLEY, J.; GAUTIER, T.; STURLA, E. Male pseudohermaphroditism due to steroid  $5\alpha$ -reductase deficiency. **Am J Med**, 62: 170-91, 1977.

PICARD, J.Y.; BELVILLE, C. Génétique et pathologie moléculaire de l'hormone anti-Müllerienne et son récepteur. **J Soc Biol**, 196: 217-21, 2002.

PICARD, J.Y.; BENAROUS, R.; GUERRIER, D.; JOSSO, N.; NAHN, A. Cloning and expression of cDNA for anti-Müllerian hormone. **Proc Natl Acad Sci USA**, 83: 5464-8, 1986.

PICARD, J.Y.; JOSSO, N. Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. **Mol Cell Endocrinol**, 34: 23-39, 1984.

PICARD, J.Y.; TRAN, D.; JOSSO, N. Biosynthesis of labeled anti-Müllerian hormone by fetal testes: evidence for the glycoprotein nature of the hormone and for its disulfide-bonded structure. **Mol Cell Endocrinol**, 12: 17-30, 1978.

PICON, R. Action du testicule foetal sur le développement in vitro des canaux de Müller chez le rat. **Arch Anat Microsc Morphol Exp**, 58: 1-19, 1969.

POLETTI, A.; COSCARELLA, A.; NEGRI-CESI, P.; COLCIAGO, A.; CELOTTI, F.; MARTINI, L. 5 $\alpha$ -reductase isozymes in the central nervous system. **Steroids**, 63: 246-51, 1998.

PRADER, A. Der genital befund beim pseudohermaphroditismus femininus des kongenitalen adrenogenitalen syndrome. **Helv Paediatr Acta**, 9: 231-48, 1954.

QUIGLEY, C.; DE BELLIS, A.; MARSCHKE, K.B.; EL-AWADY, M.; WILSON, E. M.; FRENCH, F.S. Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspective. **Endoc Rev**; 6: 271-321, 1995.

RAJPERT-DE MEYTS, E; JORGENSEN, N.; GRAEM, N.; MÜLLER, J.; CATE, R.; SKAKKEBAEK, N.E. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. **J Clin Endocrinol Metab**, 84: 3836-44, 1999.

REY, R.A.; BELVILLE, C.; NHOUL-FÉKÉTÉ, C.; MICHEL-CALEMARD, L.; FOREST, M.G.; LAHLOU, N. et al. Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum antimüllerian hormone measurement. **J Clin Endocrinol Metab**, 84: 627-31, 1999.

REY, R.A.; JOSSO, N. Regulation of anti-Müllerian hormone secretion. **Eur J Endocrinol**, 135: 144-52, 1996.

REY, R.A.; LHOMMÉ, C.; MARCILLAC, I.; LAHLOU, N.; DUVILLARD, P.; JOSSO, N. et al. Antimüllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumors of ovary: Comparative study with serum  $\alpha$ -inhibin and estradiol. **Am J Obstet Gynecol**, 174: 958-65, 1996.

REY, R.A.; LORDEREAU-RICHARD, I.; CAREL, J.C.; BARBET, P.; CATE, R.L.; ROGER, M. et al. Anti-Müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. **J Clin Endocrinol Metab**, 77:1220-6, 1993.

REY, R.A.; LUKAS-CROISIER, C.; LASALA, C.; BEDECARRÁS, P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. **Mol Cell Endocrinol**, 211: 21-31, 2003.

REY, R.A.; MEBARKI, F.; FOREST, M.G.; MOWAZOWICS, I.; CATE, R.L.; MOREL, Y. et al. Anti-Müllerian hormone in children with androgen insensitivity. **J Clin Endocrinol Metab**, 79:960-4, 1994.

RUSSELL, D.W.; WILSON, J.D. Steroids 5 $\alpha$ -reductase : two genes/two enzymes. **Annu Rev Biochem**, 63: 25-61, 1994.

RUSSELL, D.W.; BERMAN, D.M.; BRYANT, J.T.; CALA, K.M.; DAVIS, D.L.; LANDRUM, C.P. et al. The molecular genetics of steroid 5 $\alpha$ -reductases. **Recent Prog Horm Res**, 49: 275-84, 1994.

SAENGER, P.; GOLDMAN, A.S.; LEVINE, L.S.; KORTH-SCHUTZ, S.; MUECKER, E.C.; KATSUMATA, M. et al. Prepubertal diagnosis of steroid 5 alpha-reductase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, 46:627-34, 1978.

SANTA BARBARA, P.; MONIOT, B.; POULAT, F.; BERTA, P. Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. **Dev Dyn** 217: 293-8, 2000.

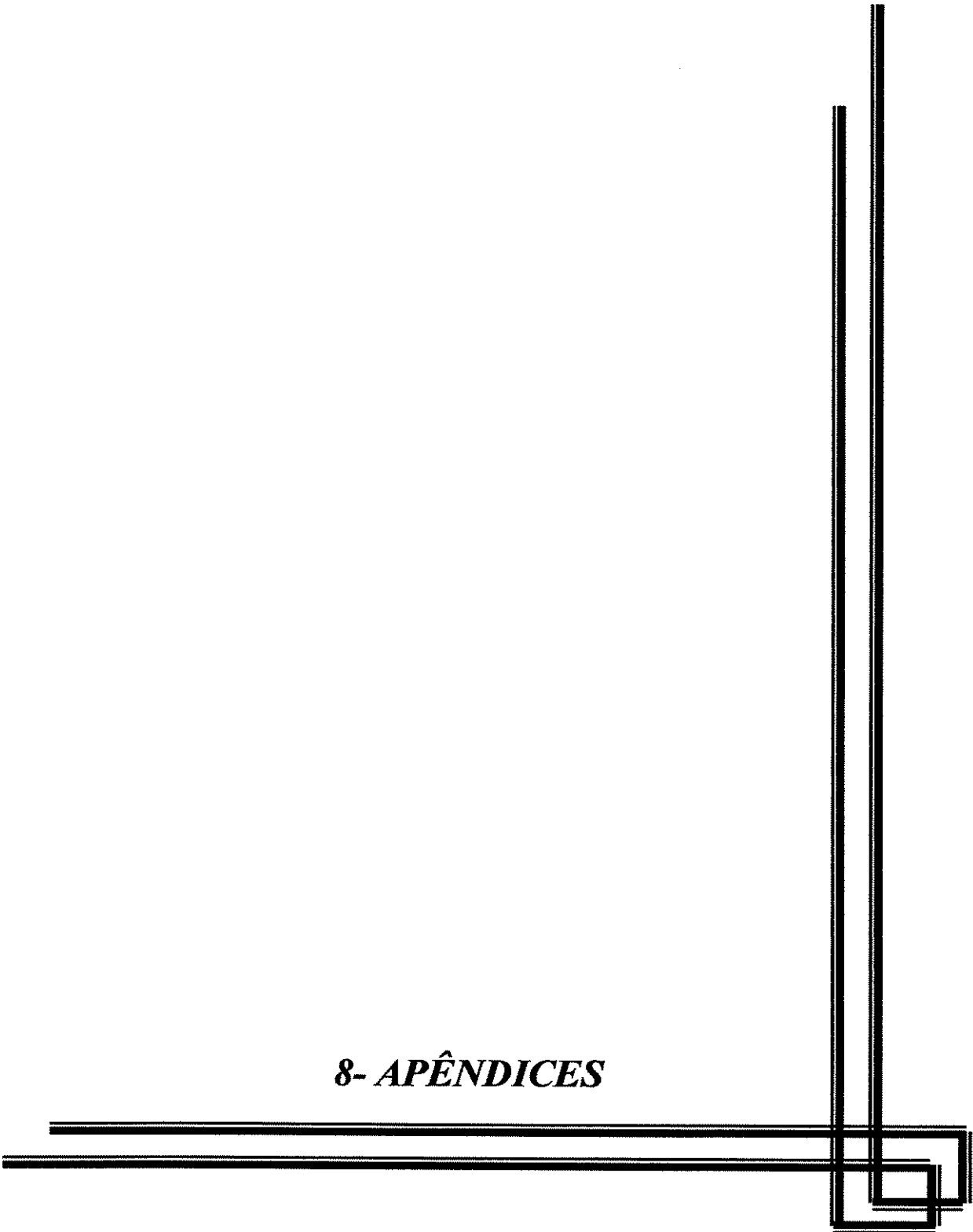
SCHWINDT, B.; DOYLE, L.W.; HUTSON, J.M. Serum levels of Müllerian inhibiting substance in preterm and term male neonates. **J Urol**, 158: 610-12, 1997.

SHAN, L.X.; ZHU, L.J.; BARDIN, C.W.; HARDY, M.P. Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig and Sertoli cells by in situ hybridization. **Endocrinology**, 136: 3856-62, 1995.

- SIITERI, P.K.; WILSON, J.D. Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. **J Clin Endocr Metab** 38:113-25, 1974.
- SIMPSON, J.L.; NEW, M.; PETERSON, R.E.; GERMAN, J. Pseudovaginal perineoscrotal hypospadias (PPSH) in sibs. **Birth Defects Orig Artic Ser**, 7: 140-4, 1971.
- SINNECKER, G.H.G.; HIORT, O.; DIBBELT, L.; ALBERS, N.; DORR, H.G.; HAUSS, H. et al. Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. **Am J Med Genet**, 63: 223-30, 1996.
- STUCHI-PEREZ, E.G.; LUKAS-CROISIER, C.; CASTRO, M.; BAPTISTA, M.T.M.; SCOLFARO, M.R.; MARQUES-DE-FARIA, A.P. et al. Evaluation of the tubular and interstitial functions of the testis in 46,XY patients with ambiguous genitalia. **J Pediatr Endocrinol Metab**, 13: 605-12, 2000.
- STUCHI-PEREZ, E.G.S.; GUERRA JR, G. Persistência dos ductos de Müller. In: MACIEL-GUERRA, A.T.; GUERRA JR,G. **Menino ou Menina? Os distúrbios da Diferenciação do Sexo**. Barueri –SP: Manole, 2002. p. 143-154.
- SWAIN, A.; LOVELL-BADGE, R. Mammalian Sex determination: a molecular drama. **Gen Dev**, 13: 755-67, 1999.
- TAKAHASHI, M.; KOIDE, S.S.; DONAHOE, P.K. Müllerian inhibiting substance as oocyte meiosis inhibitor. **Mol Cell Endocrinol**, 47: 225-34, 1986.
- THIGPEN, A.E.; DAVIS, D.L.; MILATOVICH, A.; MENDONÇA, B.B.; IMPERATO-MCGINLEY, J.; GRIFFIN, J.E.; et al. Molecular genetics of 5 $\alpha$ -reductase deficiency. **J Clin Invest**, 90: 799-809, 1992.
- THIGPEN, A.E.; SILVER, R.I.; GUILYARDO, J.M.; CASEY, M.L.; MCCONNELL, J.D.; RUSSELL, D.W. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozyme expression. **J Clin Invest**, 92: 903-10, 1993.
- TRAN, D.; MEUSY-DESSOLLE, N.; JOSSO, N. Anti-Müllerian hormone is a marker of foetal Sertoli cells. **Nature**, 269: 411-2, 1977.
- VIGIER, B.; PICARD, J.Y.; TRAN, D.; LEGEAI, L.; JOSSO, N. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and Granulosa cells. **Endocrinology**, 114: 1315-20, 1984.

- VILCHIS, F.; CANTO, P.; CHÁVEZ, B.; ULLOA-AGUIRRE, A.; MÉNDEZ, J.P. Molecular analysis of the 5 $\alpha$ -steroid reductase type 2 gene in a family with deficiency of the enzyme. **Am J Med Genet**, 69: 69-72, 1997.
- VILCHIS, F.; MÉNDEZ, J.P.; CANTO, P.; LIEBERMAN, E; CHÁVEZ, B. Identification of missense mutations in the SRD5A2 gene from patients with steroid 5  $\alpha$ -reductase 2. **Clin Endocrinol**, 52: 383-387, 2000.
- VISSER, J.A. AMH signaling: from receptor to target gene. **Mol Cell Endocrinol**, 211: 65-73, 2003
- WALSH, P.C.; MADDEN, J.D.; HARROD, M.J.; GOLDSTEIN, J.L.; MACDONALD, P.C.; WILSON, J.D. Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2. **N Engl J Med**, 291: 944-9, 1974.
- WIGLEY, W.C.; PRIHODA, J.S.; MOWSZOWICZ, I.; MENDONÇA, B.B.; NEW, M.I.; WILSON, J.D. et al. Natural mutagenesis study of the human steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 isozyme. **Biochemistry**, 33: 1265-70, 1994.
- WILSON, C.A.; DI CLEMENTE, N.; EHRENFELS, C.; PEPINSKY, R.B.; JOSSO, N.; VIGIER, B. et al. Müllerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor- $\beta$  superfamily. **Mol Endocrinol**, 7: 247-57, 1993.
- WILSON, J.D. Recent studies on the mechanism of action of testosterone. **N Engl J Med**, 287: 1284-91, 1972.
- WILSON, J.D.; GRIFFIN, J.E.; RUSSELL, D.W. Steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. **Endocr Rev**, 14: 577-93, 1993.
- WILSON, J.D.; HARROD, M.J.; GOLDSTEIN, J.L.; HEMSELL, L.C.D.L.; MACDONALD, P.C. Familial incomplete male pseudohermaphroditism , type 1. **N Engl J Med**, 16: 1097-103, 1974.
- XAVIER, F.; ALLARD, S. Anti-Müllerian hormone,  $\beta$ -catenin and Müllerian duct regression. **Mol Cel Endocrinol**, 211: 115-21, 2003.
- YOUNG, J.; REY, R.; COUZINET, B.; CHANSON, P.; JOSSO, N.; SCHAISON, G. Antimüllerian hormone in patients with hypogonadotropic hypogonadism. **J Clin Endocrinol Metab**, 84: 2696-2699, 1999.

***8- APÊNDICES***



## **TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO**

**PROJETO: ESTUDO MULTICÊNTRICO DA DEFICIÊNCIA DE 5 $\alpha$ -REDUTASE**

**TIPO 2: Importância da dosagem sérica do hormônio anti-mülleriano no diagnóstico laboratorial.**

**PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:**

Dra. Eliana Gabas Stuchi-Perez – Depto. de Pediatria – FCM – UNICAMP

Prof. Dr. Gil Guerra Júnior – Depto. de Pediatria – FCM – UNICAMP

**ENDEREÇO:**

Departamento de Pediatria – FCM – UNICAMP

Caixa Postal 6111 – Cidade Universitária

Campinas – SP – CEP 13081-970

Fone: (19) 3788-7322 Fax: (19) 3788-7322

*e-mail:* [gilguer@fcm.unicamp.com.br](mailto:gilguer@fcm.unicamp.com.br)



**IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:**

Nome: \_\_\_\_\_ Registro do Hospital: \_\_\_\_\_  
Nome do pai: \_\_\_\_\_ Nome da mãe: \_\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_  
Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_  
CEP: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

**IDENTIFICAÇÃO DO RESPONSÁVEL:**

Nome: \_\_\_\_\_ Grau de parentesco: \_\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_  
Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_  
CEP: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

**OBJETIVO DA PESQUISA:**

Eu \_\_\_\_\_,  
R.G.: \_\_\_\_\_, entendo que o paciente \_\_\_\_\_  
(\_\_\_\_\_), o qual se encontra sob minha responsabilidade, foi convidado a participar de um projeto de pesquisa, aprovado pelo Comitê de Ética da FCM – UNICAMP, envolvendo pacientes com suspeita diagnóstica de deficiência da enzima 5 $\alpha$ -redutase tipo 2. O sangue colhido para dosagem hormonal e avaliação do DNA será preservado durante todo o estudo e destruído depois que ele se completar. O sigilo será mantido através da identificação dos pacientes por um código.

**PROCEDIMENTO:**

Eu entendo que, se concordar que o paciente, sob minha responsabilidade, participe desse estudo, os pesquisadores envolvidos farão perguntas a respeito de seus antecedentes médicos e familiares. O paciente será submetido a um exame físico para

avaliação de seu estado clínico. Além disso, ele será submetido a coleta de sangue (20 a 30 mL, o equivalente a duas colheres de sopa), não sendo necessária a hospitalização. As pesquisas laboratoriais utilizando a amostra de sangue poderão ser feitas durante um período indeterminado após a coleta, e após sua realização, essa amostra de sangue será destruída.

#### RISCO E DESCONFORTO:

Para todos os exames serão necessários cerca de 20 a 30 mL de sangue venoso, que poderão ser obtidos em uma única ou mais coletas, considerando as condições e faixa etária do paciente. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e/ou manchas roxas (equimoses) no local da coleta de sangue. O desconforto será mínimo, pois, em geral, essa coleta será realizada de veia do braço, por profissional treinado e devidamente habilitado para realizá-la.

#### VANTAGENS:

Eu entendo que obterei com a participação do paciente, pelo qual sou responsável, a vantagem de poder confirmar definitivamente o diagnóstico da deficiência de 5 $\alpha$ -redutase tipo 2. Os resultados das dosagens hormonais e dos testes moleculares obtidos deverão ser transmitidos durante o acompanhamento do paciente em seu Ambulatório de atendimento médico. É importante salientar que qualquer membro da família do paciente que desejar obter orientação clínico-genética poderá também ser atendido nesse Ambulatório.

#### SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados desse projeto de pesquisa, farão parte do prontuário médico do paciente e serão submetidos aos regulamentos do Hospital, referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

#### FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A médica responsável, Dra. Eliana Gabas Stuchi-Perez, fone (019)788-8453, estará disponível para responder às minhas questões e preocupações.

#### RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a participação nesse projeto de pesquisa, do paciente pelo qual sou responsável, é voluntária e que eu posso recusar ou retirar meu consentimento, a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue), sem comprometer os cuidados médicos que o paciente recebe atualmente, ou receberá no futuro. Eu reconheço, também, que a Dra. Eliana Gabas Stuchi-Perez pode interromper a participação do paciente nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado.

Nome participante ou responsável:

Assinatura participante ou responsável:

Local e data:

#### RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei ao responsável por \_\_\_\_\_ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador:

Assinatura do pesquisador:

Local e data:

STUCHI-PEREZ, E.G.; HACKEL, C; OLIVEIRA, L.E.C.; FERRAZ, L.F.C; OLIVEIRA, L.C.; NUNES-SILVA, D.; TORALLES, M.B.; STEINMETZ, L.; DAMIANI, D.; MACIEL-GUERRA, A.T. & GUERRA-JUNIOR, G. **Diagnosis of 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency: contribution of anti-Müllerian hormone evaluation.** *J. Pediatr. Endocrinol. Metabol. (in press).*

**Aim:** To evaluate anti-Müllerian hormone (AMH) levels in patients with clinical and molecular diagnosis of 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. **Patients and Methods:** Data from 14 patients whose age ranged from 21 days to 29 years were analyzed according to age and pubertal stage. Sex ambiguity was rated as Prader III in 11 cases. LH, FSH, testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT) and AMH serum levels were measured in all but 2 patients, who had been previously submitted to gonadectomy; T and DHT were also measured in 20 age-matched controls. AMH serum levels were measured in all patients. **Results:** Gonadotropins levels were normal in all but one patient who retained gonads (6 of which had reached puberty) and T/DHT ratio was elevated in all cases when compared to controls. All prepubertal patients had AMH levels < -1 SD for age, while most pubertal patients had AMH levels compatible with pubertal stage. **Conclusions:** The prepubertal patients with 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency have AMH values in the lower part of the normal range. These data indicate that T does not need to be converted to DHT to inhibit AMH secretion by Sertoli cells.

HACKEL, C.; OLIVEIRA, L.E.C.; FERRAZ, L.FC.; TONINI, M.M.O.; NUNES-SILVA, D.; TORALLES, M.B.; STUCHI-PEREZ, E.G. & GUERRA-JUNIOR, G. **New mutations, hotspots and founder effects in Brazilian patients with steroid 5 $\alpha$ -reductase deficiency type 2.** *J. Mol. Med. (in press)*.

Mutations of the steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 (*SRD5A2*) gene in 46,XY subjects cause masculinization defects of varying degrees, due to reduced or impaired enzymatic activity. In this study, sequence abnormalities of the *SRD5A2* gene were assessed by polymerase chain reaction (PCR) with specific primers and automated sequencing analysis in DNA samples from twenty patients with suspected steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency from 18 Brazilian families. Eleven subjects presented *SRD5A2* homozygous single base mutations (two first cousins and 4 unrelated patients with G183S, 2 with R246W, 1 with del642T, one with G196S and one with 217\_218insC plus the A49T variant in heterozygosis) while four were compound heterozygotes (one with Q126R/IVS3+1G>A, one with Q126R/del418T and two brothers with Q126R/G158R). Three patients were heterozygous for A207D, G196S and R266W substitutions. The V89L polymorphism was found in heterozygosis in one of them (with A207D) and in one case with an otherwise normal gene sequence. The A49T variant was also detected in heterozygosis in the second case without other sequencing abnormalities. Four patients harbor yet non-described *SRD5A2* gene mutations: a single nucleotide deletion (del642T), a G158R amino acid substitution, a splice junction mutation (IVS3+1G>A) and the insertion of a cytosine (217\_218insC) occurring at a CCCC motif. This is the first report of a single nucleotide insertion in the coding sequence of the *SRD5A2* gene. In addition to these new mutations, this investigation reveals the prevalence of G183S substitution among a subset of African-Brazilian patients and presents evidences of the recurrence of already known mutations.

HACKEL, C.; OLIVEIRA, L.E.C.; TORALLES, M.B.; NUNES-SILVA, D.; TONINI, M.M.O.; FERRAZ, L.F.C.; STEINMETZ, L.; DAMIANI, D.; OLIVEIRA, L.C.; MACIEL-GUERRA, A.T.; STUCHI-PEREZ, E.G. & GUERRA-JUNIOR, G. **DEFICIÊNCIA DE 5 $\alpha$ -REDUTASE TIPO 2: EXPERIÊNCIAS DE CAMPINAS (SP) E SALVADOR (BA).** *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 49(1): 103-111, 2005.

**Objetivo:** Apresentar a experiência relativa a pacientes com deficiência da enzima 5 $\alpha$ -redutase tipo 2 provenientes de três serviços distintos no Brasil. **Casuística e métodos:** Foram incluídos 25 pacientes com sinais clínicos e hormonais de deficiência da 5 $\alpha$ -redutase 2 pertencentes a 23 famílias, 15 oriundas da Bahia, 7 de São Paulo e 1 de Minas Gerais. Foram avaliados dados clínicos, hormonais e moleculares. A análise molecular dos 5 éxons do gene *SRD5A2* foi feita por meio da técnica de PCR, seguido de seqüenciamento automático ou manual. **Resultados:** Em 10 famílias havia mutações no gene *SRD5A2* em homozigose (5 com G183S, 2 com R246W, 1 com G196S, 1 com del642T, 1 com 217\_218insC) e em 3 em heterozigose composta (1 com Q126R/IVS3+1G>A, 1 com Q126R/del418T e 1 com Q126R/G158R); em 3 casos os afetados eram heterozigotos, apresentando apenas uma mutação deletéria (1 com G196S, 1 com A207D e 1 com R246W). Em 7 casos não foram detectadas anormalidades ao seqüenciamento. Observou-se maior freqüência da G183S em pacientes miscigenados (Afro-Euro-Brasileiros) oriundos da Bahia. Os achados clínicos e hormonais não diferiram entre os casos com e sem mutação, à exceção da freqüência de consangüinidade e da maior gravidade da ambigüidade genital nos primeiros. **Conclusões:** Os resultados encontrados salientam a importância da investigação molecular para o diagnóstico dessa doença, ressaltando o achado de uma mutação bastante freqüente em nosso meio (G183S), especialmente em pacientes miscigenados oriundos da Bahia, e a descrição de mutações que até o momento só foram relatadas em pacientes brasileiros.

