

MÁRCIA RIBEIRO SCOLFARO



200206004

***ESTUDO MORFOMÉTRICO GONADAL: CONDIÇÃO
NECESSÁRIA A CONFIRMAÇÃO HISTOLÓGICA DA
DISGENESIA GONADAL PARCIAL.***

CAMPINAS

2001

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

MÁRCIA RIBEIRO SCOLFARO

***ESTUDO MORFOMÉTRICO GONADAL: CONDIÇÃO
NECESSÁRIA A CONFIRMAÇÃO HISTOLÓGICA DA
DISGENESIA GONADAL PARCIAL.***

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

Orientador: *Prof. Dr. GIL GUERRA JÚNIOR*

CAMPINAS

2001

UNICAMP BC
 TUNICAMP
 Sc44e
 TOMBO 837/02
 PREC 11.00
 DATA 05-02-02
 N.º CPG

CM00163310-2

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

Sc44e

Scolfaro, Márcia Ribeiro

Estudo morfométrico gonadal: condição necessária a confirmação histológica da disgenesia gonadal parcial / Márcia Ribeiro Scolfaro. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Gil Guerra Júnior

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Endocrinologia Pediátrica. 2. Diferenciação dos sexos, anomalias. 3. Sexo - Causa e determinação. 4. Testículos. I. Gil Guerra Júnior. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

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

gil guerra jr

Membros:

1. Prof. Dr. Durval Damiani

2. Profa. Dra. Izilda Aparecida Cardinalli

3. Profa. Dra. Christine Hackel

4. Profa. Dra. Maria Tereza Matias Baptista

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

Data: 07/08/2001

DEDICATÓRIA

*A todas as crianças que nasceram com
ambigüidade genital e seus familiares, que este
trabalho contribua de alguma forma com sua
incansável luta pela vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. GIL GUERRA JÚNIOR, pela amizade, ensinamentos e, principalmente, pela confiança depositada em mim durante a elaboração deste trabalho, sempre com entusiasmo.

Ao Departamento de Anatomia Patológica da FCM – UNICAMP, em especial à Profa. Dra. IZILDA APARECIDA CARDINALLI, pelo auxílio na realização dos diagnósticos anatomopatológicos, além do apoio e incentivo constantes.

À Profa. Dra. MARIA TEREZA MATIAS BAPTISTA, pela sua amizade e valiosos ensinamentos.

À Dra. ELIANA GABAS STUCHI PEREZ, pelo companheirismo e colaboração na realização deste trabalho.

À equipe do GRUPO INTERDISCIPLINAR DE ESTUDOS DA DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO SEXO (GIEDDS) do Hospital das Clínicas da UNICAMP, em especial à Profa. Dra. ANDRÉA TREVAS MACIEL GUERRA, que direta ou indiretamente contribuiu para o meu crescimento médico- científico.

Ao Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética Médica da FCM – UNICAMP, em especial à Profa. Dra. CHRISTINE HACKEL e ao Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular da UNICAMP, em especial à Profa. Dra. MARICILDA PALANDI DE MELLO, pelos ensinamentos e colaboração na elaboração dos diagnósticos citogenéticos e moleculares.

Ao Laboratório de Fisiologia do Departamento de Patologia Clínica da FCM – UNICAMP, em especial à Profa. Dra. MARGARET CASTRO e à bióloga LAURIONE DE CANDIDO OLIVEIRA, pela cooperação e realização de dosagens hormonais.

Ao Prof. Dr. RODOLFO REY, do Laboratório da Dra. Nathalie Josso na École Normale Supérieure em Montrouge, França, pela realização das dosagens de hormônio anti-Mülleriano.

Ao Serviço de Radiodiagnóstico do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pelos exames radiológicos e ultrassonográficos realizados.

Ao Serviço de Cirurgia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pelo suporte na área cirúrgica, tanto diagnóstico, quanto terapêutico.

A todos que trabalham no Laboratório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pelo auxílio na organização do material coletado.

A todos os docentes da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pelos ensinamentos médicos e incentivo.

Ao Laboratório SERONO Ltda., pelo fornecimento da gonadotrofina coriônica humana (Profasi hp[®]) usada neste trabalho.

Em especial, aos pacientes e seus pais, pela colaboração e permissão concedida para coleta de material para o trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A meus pais, TEREZINHA e VALDEMAR, amigos e maiores mestres, pelo exemplo de amor e perseverança.

A meus irmãos, LUÍZA e ALEXANDRE, pelo apoio e entusiasmo.

Aos amigos, GABRIELA e JOSÉ ROBERTO, pelo incentivo.

A todos os familiares e amigos, em especial aos meus sogros, TEREZINHA e MARIANTO, pelo carinho e incentivo.

Aos meus filhos, ALEXANDRE e HENRIQUE, incentivadores incondicionais da minha vida.

E em especial a meu marido e companheiro, MAURÍCIO, pela amizade, compreensão e auxílio constantes.

	<i>Pág</i>
RESUMO.....	xi
INTRODUÇÃO.....	13
Objetivos.....	21
CASUÍSTICA E METODOLOGIA.....	22
Casuística.....	23
Metodologia.....	23
RESULTADOS.....	29
DISCUSSÃO.....	36
CONCLUSÕES.....	40
SUMMARY.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	51

LISTA DE TABELAS

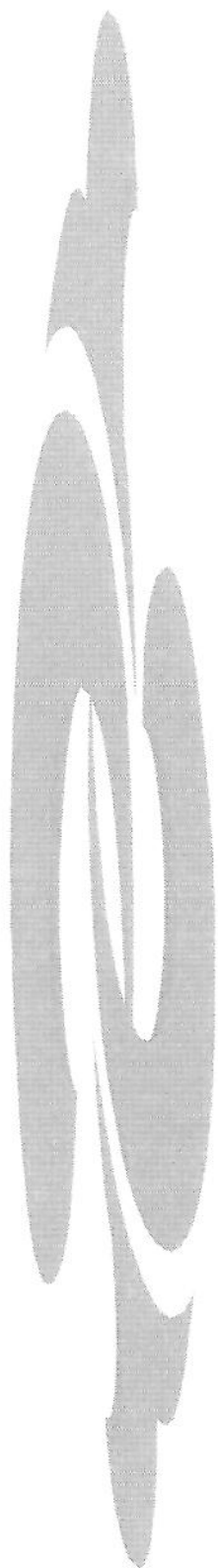
Pág

TABELA 1 : Valores de hormônio anti-Mülleriano sérico em homens normais agrupados por idade e desenvolvimento puberal.....	26
TABELA 2 : Dados clínicos de 13 crianças com Disgenesia Gonadal Parcial.....	31
TABELA 3 : Dados hormonais de 13 crianças com Disgenesia Gonadal Parcial.....	32
TABELA 4 : Dados morfométricos e histológicos de 22 gônadas de 13 crianças com Disgenesia Gonadal Parcial.....	34

LISTA DE FIGURAS

Pág

FIGURA 1 : Variação do diâmetro tubular médio, do índice de fertilidade tubular e do número de células de Sertoli por corte tubular do nascimento à puberdade.....	19
FIGURA 2 : Tecido do paciente caso no. 4. Uma área da gônada esquerda (hematoxilina-eosina, tamanho original x 75).....	35
FIGURA 3 : Tecido do paciente caso no. 12. Uma área da gônada direita caracterizada por marcante hipoplasia tubular, grave hipoplasia germinal e hiperplasia das células de Sertoli (hematoxilina-eosina, tamanho original x 150).....	35
FIGURA 4 : Tecido também da gônada direita do paciente caso no. 12 (hematoxilina-eosina, tamanho original x 300).....	35



RESUMO

Justificativa: A Disgenesia Gonadal Parcial (DGP) é um distúrbio da diferenciação sexual caracterizado por testículos disgenéticos bilaterais, derivados dos ductos de Müller e criptorquidismo em pacientes com cariótipo 46,XY. Entretanto, os critérios histológicos diagnósticos são pouco utilizados.

Objetivo: Avaliar as alterações histológicas das gônadas de crianças com DGP.

Casuística e Metodologia: Entre 1996 e 1998, 13 crianças com DGP foram avaliadas em nosso serviço. O diagnóstico clínico de DGP baseou-se na presença de cariótipo 46,XY, ambigüidade genital, altas concentrações séricas de FSH e baixas de hormônio anti-Mülleriano, e baixa produção de testosterona após teste de estímulo com gonadotrofina coriônica humana, sem acúmulo dos seus precursores, e presença de derivados dos ductos de Müller. Foram realizadas biópsias de 22 das 26 gônadas (a idade na época da biópsia foi de 11 meses a 10 anos). Foi realizada a análise histológica microscópica convencional para avaliar o diâmetro tubular médio, o índice de fertilidade tubular e o número de células de Sertoli por corte tubular.

Resultados: Todas as 26 gônadas estavam localizadas fora das saliências labioescrotais. Os achados histológicos variaram desde apenas uma redução no tamanho tubular até achados de uma gônada “em fita”. Cinco das 22 gônadas grosseiramente lembravam gônadas “em fita”. O diâmetro tubular médio estava gravemente reduzido (> 30% de redução em relação ao normal para pacientes da mesma idade) em 4 gônadas, marcadamente reduzido (10% - 30%) em 11, levemente reduzido (< 10%) em uma, e normal em outra gônada. O índice de fertilidade tubular, expresso em % de túbulos que contêm pelo menos uma célula germinativa, estava gravemente reduzido (< 30% dos valores normais) em 9 gônadas, marcadamente reduzido (50% - 30%) em duas, e normal em 6 gônadas. O número de células de Sertoli por corte tubular estava elevado em 16 gônadas e normal em uma. Túbulos finos rodeados por tecido fibroso foram ocasionalmente observados.

Conclusão: Os achados histológicos confirmaram o diagnóstico clínico de DGP em todos os pacientes desta amostra. Devido a variabilidade da análise histológica gonadal, um estudo morfométrico cuidadoso torna-se necessário para o estabelecimento do diagnóstico de DGP.



INTRODUÇÃO

Os testículos possuem estrutura dinâmica do nascimento à puberdade e todos os seus componentes sofrem etapas de proliferação e diferenciação antes da puberdade (VILAR, 1970). A proliferação das células germinativas pode ser dividida em três etapas, correspondentes aos períodos neonatal, infância e puberdade, sendo que nesta última fase completa-se a espermatogênese (MÜLLER & SKAKKEBAEK, 1984). A proliferação das células de Leydig também compõe-se de três etapas, no entanto, correspondentes aos períodos fetal, neonatal e puberal (NISTAL *et al.*, 1986). A fase puberal da proliferação das células germinativas e das células de Leydig são correspondentes.

Na fase neonatal, os túbulos seminíferos medem cerca de 60 a 65 µm de diâmetro e são totalmente preenchidos por células de Sertoli e células germinativas formando um epitélio pseudoestratificado. Há um predomínio importante de células de Sertoli, com aproximadamente 26 a 28 células por corte tubular (CORTES, MÜLLER & SKAKKEBAEK, 1987). Nesta fase existem dois tipos de células germinativas, os gonócitos e as espermatogônias (MÜLLER & SKAKKEBAEK, 1984). Com 60 a 90 dias de vida, às custas de um aumento das gonadotrofinas hipofisárias e, conseqüentemente, também da testosterona produzida pelas células de Leydig, ocorre uma proliferação das células germinativas, isto é, a transformação dos gonócitos em espermatogônias, de tal forma que no final do sexto mês de vida já não existem mais gonócitos, apenas espermatogônias. Outra característica importante da fase neonatal é a ausência de lúmen tubular, por ausência de fluido intratubular (NISTAL & PANIAGUA, 1996).

A segunda fase do desenvolvimento testicular caracteriza-se por um período de repouso entre 6 meses e 3 anos e meio. Este período de repouso é interrompido por uma nova fase de proliferação de células germinativas, mas que desta vez faz-se de maneira frustra, conhecida como espermatogênese frustra ou incompleta, aparecendo por isso, grande número de células germinativas degeneradas (MÜLLER & SKAKKEBAEK, 1983; PANIAGUA & NISTAL, 1984). Não se sabe o motivo desta proliferação de células germinativas, visto que não há aumento das concentrações séricas das gonadotrofinas entre 6 meses e 10 anos de vida. Depois do sexto ano, existe um leve incremento dos andrógenos supra-renais, mas as concentrações de testosterona testicular aumentam somente após os 10 anos de idade. Ao redor dos três anos de idade, ainda na fase da infância, ocorre uma

grande degeneração de células de Leydig; de 18 milhões de células por testículo ao nascimento, haverá em torno de 60 mil células de Leydig por testículo numa criança de 6 anos de idade (NISTAL & PANIAGUA, 1996).

A terceira e última fase do desenvolvimento testicular é a fase da adolescência. Ao redor de 10 anos tem início a fase da espermatogênese, coincidindo com a elevação das concentrações de LH, que levará a proliferação das células de Leydig, induzindo as células precursoras fibroblastos-*like* a diferenciarem-se em células de Leydig maduras, que até o final da adolescência atingem um valor de 786 milhões por testículo. Também ocorrerá a maturação das células de Leydig que passam a produzir testosterona (NISTAL *et al.*, 1986). Entre 11 e 14 anos de idade, o aumento das concentrações de testosterona junto com um aumento das de FSH, levarão à maturação das células de Sertoli, desenvolvimento das células germinativas e aparecimento do lúmen tubular, levando ao aumento global do volume do testículo. Antes dos testículos atingirem o tamanho adulto, as epífises ósseas estarão fechadas e as características sexuais secundárias desenvolvidas (BURR *et al.*, 1970; ZACHMANN *et al.*, 1974; DANIEL *et al.*, 1982; NIELSEN *et al.*, 1986).

Por ser um procedimento invasivo, a biópsia testicular tem indicações precisas, sendo útil no diagnóstico de pacientes com ambigüidade genital, em casos de aumento assimétrico e rápido do volume testicular, e quando ocorre pseudo-puberdade precoce de origem não supra-renal. Em outras situações, o valor da biópsia testicular é menor ou controverso, como nos casos de criptorquidismo (NISTAL & PANIAGUA, 1996).

Nos pacientes com ambigüidade genital, a biópsia gonadal está indicada nos casos (SAVAGE, 1989):

1. de aberrações numéricas ou estruturais de cromossomos sexuais, com ou sem mosaicismo, para diagnóstico diferencial entre Hermafroditismo Verdadeiro e Disgenesia Gonadal;
2. onde exista discordância entre a constituição genotípica e a genitália externa, isto é, gônada palpável com cariótipo 46,XX, para diagnóstico diferencial de Hermafroditismo Verdadeiro e Homem XX;

3. de hipogonadismo hipergonadotrófico, para diagnóstico de Disgenesia Gonadal;
4. onde há assimetria do tamanho e consistência dos testículos;
5. de oligo ou azoospermia;
6. não esclarecidos, especialmente naqueles com cariótipo 46,XY, após extensa investigação.

Nesses casos, além da investigação da etiologia da ambigüidade genital, a biópsia gonadal tem por objetivo, eventualmente, identificar neoplasia gonadal.

A interpretação da biópsia de testículos pré-puberais nem sempre é fácil de ser realizada e, portanto, deve envolver a realização de um cuidadoso estudo morfométrico, com avaliação dos dados de diâmetro tubular médio, número de células germinativas, células de Leydig, células de Sertoli, que podem ser medidas ou por corte tubular, ou por unidade de área, ou por volume testicular, ou ainda por testículo (NISTAL & PANIAGUA, 1996).

O diâmetro tubular médio é um excelente indicador do desenvolvimento do epitélio seminífero. Nos testículos pré-puberais ele depende principalmente das células de Sertoli e indica se o epitélio seminífero está estimulado pelo FSH e se há resposta adequada a este estímulo. Portanto ao avaliar o diâmetro tubular, indiretamente também se avaliam as células de Sertoli (NISTAL & PANIAGUA, 1996). O diâmetro tubular tem seu menor valor no quarto ano de vida, aumenta lentamente até os 9 anos, e depois rapidamente até os 15 anos (Figura 1).

A anormalidade mais freqüente do diâmetro tubular médio é a hipoplasia tubular. Algumas situações clínicas onde pode-se observar essa hipoplasia são casos de hipogonadismo hipo ou hipergonadotrófico, testículos criptorquídicos ou ectópicos, e casos de resposta anômala das células de Sertoli ao FSH (NISTAL *et al.*, 1982).

Segundo NISTAL & PANIAGUA (1996), existem três graus de gravidade da diminuição do diâmetro tubular:

1. leve, quando essa diminuição é de até 10% em relação ao diâmetro tubular médio normal para a idade;
2. marcante, quando a redução está entre 10 e 30%;
3. grave, quando essa redução é maior que 30%.

O número de células germinativas pode ser avaliado por diferentes métodos. O método que causa maiores dificuldades é a avaliação do número dessas células por testículo, uma vez que envolve obrigatoriamente as medidas cuidadosas dos três eixos do testículo e a avaliação morfométrica do volume intratubular. De maneira mais simples e de uma forma mais freqüente, o número de células germinativas é avaliado por meio do Índice de Fertilidade Tubular (IFT), isto é, o número médio de células germinativas por corte tubular. Na verdade, este índice reflete a porcentagem de cortes tubulares que possuem pelo menos uma célula germinativa. Sabe-se que no recém-nascido ele gira em torno de 68%, isto é, 68% dos cortes tubulares possuem pelo menos uma célula germinativa, caindo para um valor próximo de 50% em uma criança de 3 anos, e depois aumentando gradativamente até um valor de 100% na puberdade (MÜLLER & SKAKKEBAEK, 1983) (Figura 1).

Segundo NISTAL & PANIAGUA (1996), assim como na hipoplasia tubular, também existem três graus de gravidade de hipoplasia germinal, isto é, de diminuição do número de células germinativas:

1. leve, quando o IFT for maior que 50%, isto é, mais de 50% dos cortes tubulares possuem pelo menos uma célula germinativa em relação ao IFT normal para a idade;
2. marcante, quando o IFT estiver entre 30 e 50;
3. grave, quando o IFT for menor que 30.

Geralmente os casos de hipoplasia germinal associam-se a hipoplasia tubular, e ocorrem devido a disgenesia tubular. A hipoplasia germinal pode ser encontrada nos casos de hipogonadismo hipergonadotrófico, síndrome de Klinefelter, fetos anencefálicos, trissomias do 13, 18 e 21, portadores de válvula de uretra posterior associada com obstrução severa do ducto excretório urinário, em crianças que se submeteram a tratamento com medicamentos imunossupressores.

O número de células de Sertoli sofre lenta diminuição com o decorrer da idade, sendo que no recém-nascido existe em média 26 a 28 células por corte tubular e na vida adulta em torno de 10 (Figura 1). Porém, entre 4 e 12 anos de idade existe uma lenta proliferação destas células que, somado ao aumento da largura, comprimento e tortuosidade do túbulo seminífero, são responsáveis pela transformação do epitélio seminífero pseudoestratificado ao nascimento para colunar na puberdade (CORTES, MÜLLER & SKAKKEBAEK, 1987). Hiperplasia das células de Sertoli é um sinal bem definido de disgenesia tubular, sendo geralmente detectada no primeiro ano de vida e no início da puberdade (NISTAL, ABAURREA & PANIAGUA, 1982).

O cálculo do número de células de Leydig no período pré-puberal é difícil devido à população escassa nesta idade, e pela dificuldade de se selecionar um denominador adequado que expresse a população das células de Leydig (NISTAL *et al.*, 1986). Estas células são escassas durante a infância, nos testículos criptorquídicos, no hipogonadismo-hipogonadotrófico e em alguns casos de pseudo-hermafroditismo masculino (PHM) e fetos anencefálicos (DOSHI, SURTI & SZULMAN, 1983; NISTAL, GONZÁLEZ-PERAMATO & PANIAGUA, 1988).

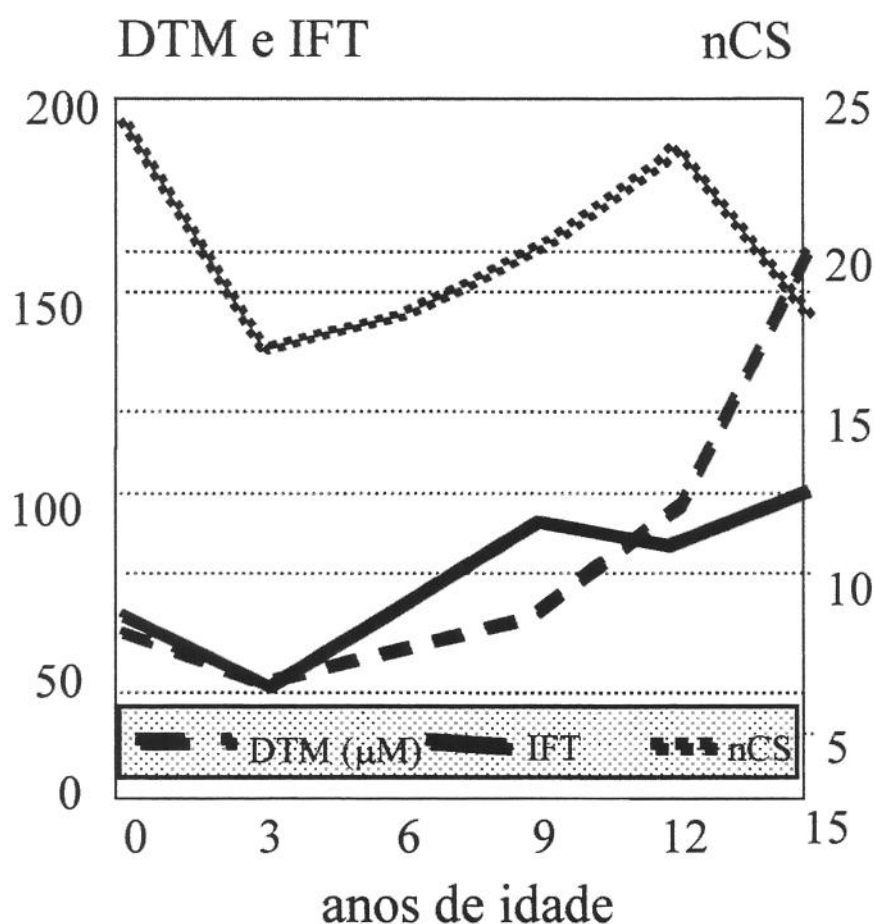


Figura 1: Variação do diâmetro tubular médio, do índice de fertilidade tubular e do número de células de Sertoli por corte tubular do nascimento à puberdade (NISTAL & PANIAGUA, 1996).

O Pseudo-hermafroditismo Masculino Disgenético, atualmente denominado Disgenesia Gonadal Parcial (DGP), Incompleta ou Atípica, é caracterizado pela presença de cariótipo 46,XY em indivíduos com diferenciação testicular parcial e ambigüidade genital. A genitália interna consiste de combinação de derivados dos ductos de Wolff e Müller (RAFJER *et al.*, 1978). Existe risco de transformação neoplásica das gônadas para, particularmente, gonadoblastoma, ou até seminomas e disgerminomas (TROCHE & HERNANDEZ, 1986; KRASNA *et al.*, 1992). A opção de definição do sexo é a feminina, desde que em idade precoce e com reconstrução da genitália externa e remoção das gônadas e dos derivados dos ductos de Wolff.

A DGP é considerada, por alguns autores, uma variante da Disgenesia Gonadal Pura ou Completa XY, de herança recessiva ligada ao cromossomo X, ou autossômica dominante com expressão limitada ao sexo masculino. Ambas as formas, completa e parcial (ou incompleta), podem ocorrer na mesma família (BERKOVITZ *et al.*, 1991; MARCANTONIO *et al.*, 1994). Em apenas 10% a 15% dos casos observam-se mutações no gene *SRY* destes pacientes (Cameron e Sinclair, 1997).

Tipicamente, os pacientes apresentam concentrações séricas de testosterona baixas, sem acúmulo dos seus precursores e, dependendo da gravidade da disgenesia testicular, a concentração do hormônio anti-Mülleriano (HAM) pode ser baixa ou indetectável (REY *et al.*, 1999; STUCHI-PEREZ *et al.*, 2000).

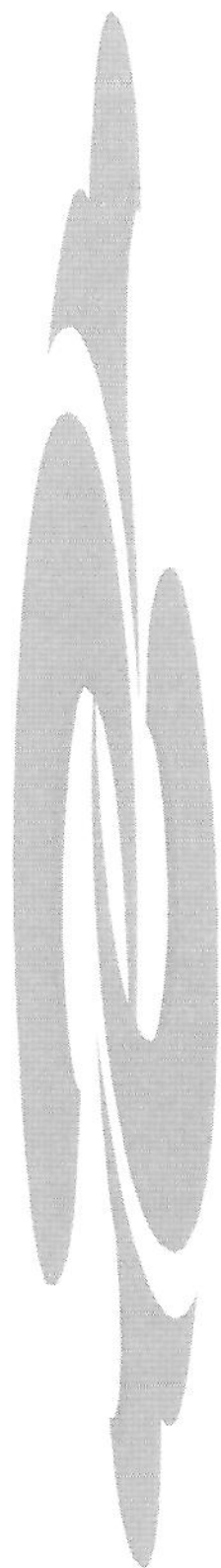
O cariótipo observado com maior frequência é o 46,XY. Contudo, linhagens celulares múltiplas, incluindo a linhagem celular monossômica do X, podem ser detectadas, e as características somáticas da síndrome de Turner, tal como baixa estatura, pescoço alado, *cubitus valgus* e malformação renal, podem estar presentes. De fato, alguns autores consideram a DGP uma variante da Disgenesia Gonadal Mista, que é definida como a coexistência de gônada “em fita” e testículos disgenéticos em indivíduos com constituição cromossômica 45,X/46,XY (DONAHOE, CRAWFORD & HENDREN, 1979; ROBBOY *et al.*, 1982; CHANG, CLARK & BACHMAN, 1990; ROHATGI *et al.*, 1992; BORER, NITTI & GLASSBERG, 1995).

A ambigüidade genital que se acompanha de gônadas disgenéticas pode não somente ser decorrente de mosaicismo cromossômico, como no caso da Disgenesia Gonadal Mista (45,X/46,XY), ou ser observada em indivíduos de sexo genético masculino sem alterações cromossômicas visíveis ao microscópio óptico, como na Disgenesia Gonadal Parcial. Existem, ainda, quadros sindrômicos que se acompanham de anomalias da diferenciação gonadal que permitiram, nos últimos anos, a identificação de genes envolvidos na cascata da diferenciação testicular. Entre eles estão a Displasia Camptomélica (mutações no gene *SOX9* no locus *CMPD1* em 17q24.3-q25.1) (KWOK *et al.*, 1995; MANSOUR *et al.*, 1995), a síndrome de Denys-Drash (mutações constitucionais quase sempre não herdadas no gene *WT-1* em 11p13) (MANIVEL, SIBLEY & DEHNER, 1987; HASTIE, 1992) e a monossomia 9p (VEITIA *et al.*, 1997 e 1998).

Em todos esses casos de distúrbios da diferenciação gonadal, a histologia das gônadas é variável, consistindo freqüentemente de túbulos seminíferos pobremente desenvolvidos, rodeados por estroma tipo ovariano. Contudo, o desenvolvimento gonadal pode variar de diferenciação testicular aparentemente normal à gônada “em fita”, e o critério para o diagnóstico etiológico de disgenesia gonadal ou testicular, apesar de existir na literatura, como visto anteriormente, nem sempre é aplicado.

OBJETIVOS

Uma vez que em uma avaliação histológica inicial, algumas gônadas de 13 crianças com diagnóstico clínico de DGP foram consideradas como testículos normais pré-puberais, o **objetivo** deste estudo foi realizar uma cuidadosa análise morfométrica e histológica das gônadas dessas 13 crianças, acompanhadas no Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo (GIEDDS), do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).



CASUÍSTICA E METODOLOGIA

CASUÍSTICA

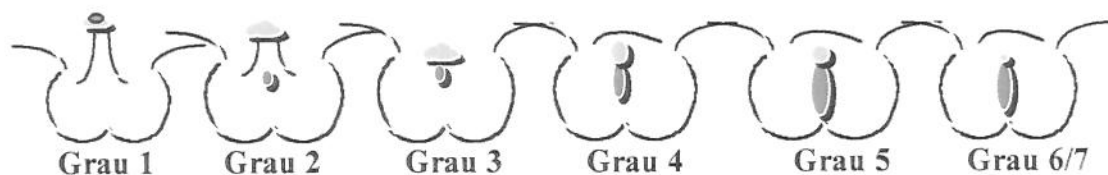
De maio de 1996 a maio de 1998, entre os pacientes com ambigüidade genital segundo os critérios de DANISH (1985) avaliados no Ambulatório do GIEDDS do Hospital das Clínicas da UNICAMP, treze apresentavam o diagnóstico clínico presuntivo de DGP. Esta suspeita diagnóstica baseou-se na presença de genitália ambígua em pacientes com cariótipo 46,XY e criptorquidia bilateral, concentrações séricas baixas de HAM e de testosterona basal e após estímulo agudo com gonadotrofina coriônica humana (hCG), sem acúmulo dos precursores de testosterona, e com presença de derivados dos ductos de Müller. Com estes dados foi indicada a biópsia gonadal de cada um destes pacientes para confirmação diagnóstica. No entanto, entre 22 gônadas biopsiadas das 26 possíveis, o diagnóstico anatomopatológico inicial de 17 foi de testículo normal pré-puberal, e das demais 5 gônadas, de gônada disgenética ou “em fita”.

Todos os exames realizados eram necessários para a investigação diagnóstica de cada caso. Do ponto de vista ético, foram seguidas as normas da Declaração de Helsinki e, portanto, cada paciente foi identificado por um número e não por seu nome, respeitando sua privacidade.

METODOLOGIA

1. Coleta de dados clínicos:

Compreendeu dados como a idade na data da 1^a. consulta, antecedentes gestacionais e familiares, história de consangüinidade entre os pais, alterações relevantes de exame físico, principalmente em relação à genitália externa, palpação de gônadas (não palpável ou palpável no canal inguinal) e desenvolvimento puberal de acordo com os critérios clássicos propostos por MARSHALL e TANNER em 1970. A classificação do grau de ambigüidade genital foi feita como proposto por QUIGLEY et al., 1995:



Grau 1: masculinização normal intra-útero

Grau 2: fenótipo masculino com defeito leve de masculinização

Grau 3: fenótipo masculino com defeito grave de masculinização

Grau 4: genitália externa francamente ambígua

Grau 5: fenótipo feminino com algum grau de virilização

Grau 6: fenótipo feminino sem pêlo pubiano na puberdade

Grau 7: fenótipo feminino com pêlo pubiano na puberdade

2. Cariótipo:

Foi realizado com técnica de banda G, em cultura de linfócitos de sangue periférico, no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP.

3. Avaliação hormonal:

Foram realizadas as determinações séricas basais de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH), testosterona total (TT), dihidrotestosterona (DHT), dehidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona (A- Δ 4). Os resultados obtidos foram comparados aos padronizados pelo Laboratório de Fisiologia do Departamento de Patologia Clínica da FCM – UNICAMP, de acordo com o sexo e desenvolvimento puberal.

Nos pacientes maiores de 6 meses de idade e fora de puberdade, de acordo com os critérios de MARSHALL & TANNER (1970), foi realizado teste de estímulo com hCG intramuscular (Profasi hp® do Laboratório Serono Ltda.) na dosagem de 2.000 UI ao dia,

por 3 dias consecutivos, sendo a medicação cedida pelo Ambulatório do GIEDDS. Foram realizadas as determinações séricas de TT e DHT em amostra de sangue coletada 24 horas após a última aplicação (GRANT et al., 1976).

Nos casos em que não havia nenhuma produção de testosterona, após estímulo agudo com hCG, foi feita a determinação sérica da gonadotrofina coriônica - fração beta (β -hCG) na amostra pós-estímulo, para confirmação da aplicação da medicação, e os resultados comparados com os padronizados pelo Laboratório de Fisiologia do Departamento de Patologia Clínica da FCM – UNICAMP. A produção de testosterona foi considerada deficiente quando a concentração sérica de TT foi menor que 1,4 ng/mL após teste de estímulo agudo com hCG.

As determinações séricas hormonais foram realizadas pelo Laboratório de Fisiologia Clínica do Departamento de Patologia Clínica da FCM – UNICAMP, em duplicatas, utilizando kits comercializados de:

- ⇒ LH: por Stratus hLH Fluorimetric Enzyme Immunoassay Cat. Ref. B5700-52 DADE. International Inc., Miami, Fl. 33152-0672 USA.
- ⇒ FSH: por Stratus hFSH Fluorimetric Enzyme Immunoassay Cat. Ref. B5700-51 DADE. International Inc., Miami, Fl 33152-0672 USA.
- ⇒ TT: por Chemiluminescent Enzyme Immunoassay IMMULITE Automated Analyser, DPC, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA. Cat. Ref. LKTTI.
- ⇒ DHT: por RIE, DSL, Diagnostic System Laboratories, Inc., Webster, TX, USA. Cat. Ref. DSL 9600.
- ⇒ A- Δ 4: por RIE, DSL, Diagnostic System Laboratories, Inc., Webster, TX, USA. Cat. Ref. DSL-3800.
- ⇒ DHEA: por RIE, com base na competição pela ligação a um anticorpo monoclonal imobilizado em tubos, com amostras de plasma previamente extraídas com éter etílico. Immunotech, Inc., Westbrook, Maine 04092 USA, Cat. Ref. 1138.

A determinação sérica do HAM foi realizada no Laboratório da Dra. Nathalie Josso, sob os cuidados do Dr. Rodolfo A. Rey, na École Normale Supérieure em Montrouge, França, por meio da técnica de ELISA utilizada no Serviço.

Essa técnica, primeiramente descrita em 1990, utilizava anticorpos policlonais, obtidos de HAM bovino purificado (JOSSO et al., 1990), foi modificada em 1992, quando passou-se a utilizar anticorpos monoclonais, obtidos diretamente de HAM humano recombinante em fase sólida e o segundo anticorpo policlonal contra HAM humano recombinante obtido de coelho, com visualização da reação com anticorpo anti-coelho (IgG de cabra) marcado com fosfatase (CARRÉ-EUSÈBE et al., 1992).

Os valores de HAM para o sexo masculino normal, agrupados de acordo com a idade e desenvolvimento puberal (MARSHALL & TANNER, 1970), podem ser vistos na Tabela 1 (REY et al., 1999).

Tabela 1: Valores de hormônio anti-Mülleriano sérico em homens normais agrupados por idade e desenvolvimento puberal

Idade	N	HAM (pmol/L)	
		Média $\pm$ 1 DP	Variação
< 15 dias	6	229 $\pm$ 59	76 - 381
15 dias - 1 ano	22	465 $\pm$ 93	251 - 679
1,01 - 4 anos	17	499 $\pm$ 66	360 - 638
4,01 - 7 anos	16	438 $\pm$ 61	309 - 566
7,01 - 9 anos	14	336 $\pm$ 47	234 - 438
> 9 anos			
Estádio I	22	249 $\pm$ 26	194 - 304
Estádio II	25	159 $\pm$ 25	107 - 211
Estádio III	8	79 $\pm$ 28	12 - 145
Estádio IV-V	8	48 $\pm$ 14	14 - 81
Adulto	21	30 $\pm$ 4	22 - 38

4. Avaliação da genitália interna:

Foi realizada a genitografia, complementada com uretrocistografia miccional retrógrada e ultrassonografia pélvica. Em todos os casos houve confirmação dos achados da genitália interna, especialmente dos derivados dos ductos de Müller, por laparoscopia ou laparotomia realizada durante a correção cirúrgica das alterações genitais.

5. Avaliação anatomopatológica:

Foram biopsiadas 22 das 26 gônadas. No Departamento de Anatomia Patológica da FCM – UNICAMP, as biópsias gonadais são rotineiramente fixadas com solução de Bouin, desidratadas em álcool e embebidas em parafina.

Para análise morfométrica destas biópsias gonadais, foram realizados cortes seriados de 4µm de cada parte das gônadas, corados com hematoxilina e eosina e examinados ao microscópio óptico. A avaliação morfométrica foi realizada pela autora, sob a supervisão da Profa. Dra. Izilda Aparecida Cardinali.

Em 50 a 100 cortes tubulares, selecionados aleatoriamente de cada biópsia, foram medidos o diâmetro tubular médio, o IFT e o número de células de Sertoli. Os resultados encontrados foram comparados com os valores normais por idade publicados por NISTAL & PANIAGUA (1996) (Figura 1).

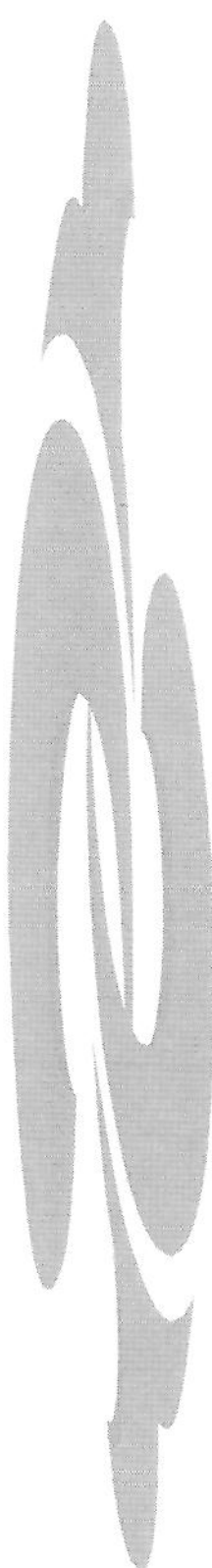
O diâmetro tubular médio foi medido usando régua micrométrica ocular com objetiva de 40X, como descrito por LENNOX, AHMAD & MACK (1970) e classificado segundo NISTAL & PANIAGUA (1996) em 3 graus de gravidade de hipoplasia tubular: leve (menos de 10% de redução em relação ao diâmetro normal para a idade), marcante (de 10 a 30% de redução) e grave (mais de 30% de redução).

O número de células germinativas foi avaliado por meio do IFT, que representa o produto do número de células germinativas dividido pelo número de cortes tubulares no mesmo campo microscópico em um aumento de 40X, sendo medido em pelo menos 10 campos de cada biópsia. De acordo com NISTAL & PANIAGUA (1996), foram classificados segundo o grau de gravidade de hipoplasia germinal: leve (IFT maior que 50, em relação ao IFT normal para a idade), marcante (IFT entre 50 e 30) e grave (IFT menor que 30).

O número de células de Sertoli foi calculado em aproximadamente 50 a 100 cortes tubulares de cada biópsia. Esta variação ocorreu devido a escassez do material de algumas biópsias.

O número de células de Leydig não foi avaliado devido a exigüidade deste tipo de células na faixa etária deste grupo de pacientes.

Foram consideradas gônadas disgenéticas ou “em fita” aquelas compostas predominantemente de estroma tipo ovariano com nódulos esclerohialinos e ausência de elementos da linhagem germinativa (ROBBOY et al., 1982).



RESULTADOS

A média de idade dos pacientes na primeira consulta no Ambulatório do GIEDDS do HC – UNICAMP foi de 3 anos e 1 mês, variando de 15 dias a 9 anos (Tabela 2) e todos apresentavam registro civil e sexo social masculino. Não foi observado antecedente de consangüinidade nem história familiar de ambigüidade genital.

Todos os pacientes apresentavam hipospadia e gônadas fora das saliências labioescrotais bilateralmente. Das 26 gônadas examinadas, 16 eram palpáveis no canal inguinal e as demais não palpáveis. De acordo com a classificação de QUIGLEY *et al.* (1995) 7 pacientes tinham ambigüidade genital grau 2, cinco grau 3 e um grau 4 (Tabela 2). Um paciente (caso no. 12) apresentava história pessoal de tumor de Wilms unilateral e insuficiência renal crônica, quadro sugestivo da síndrome de Denys-Drash. Nenhum paciente apresentava à 1ª consulta sinais clínicos de puberdade ou da síndrome de Turner .

Em um paciente (caso no. 4) não foi realizado teste de estímulo agudo com hCG, pois tinha idade menor que 6 meses. Este e os demais pacientes não apresentaram concentrações séricas de TT superiores a 1,4 ng/mL. Oito do total de 13 casos (casos nos. 3, 5, 7 a 11, e 13) não apresentaram qualquer produção de TT após teste de estímulo agudo com hCG, sendo então realizada a dosagem sérica do β -hCG, com resultado normal, comprovando o uso adequado do medicamento no teste. Todos os pacientes apresentaram HAM inferior a 2 DP para idade e sexo masculino, de acordo com os dados da Tabela 1 (Tabela 3).

Em todos os 13 pacientes ocorreu um predomínio do FSH em relação ao LH, porém em apenas 4 pacientes (casos nos. 2, 4, 6 e 7) a concentração sérica de FSH estava elevada para a idade. Dentre estes 4 pacientes, 3 apresentaram idades superiores a 6 anos de idade (os pacientes com maior faixa etária no grupo avaliado), e um tinha 15 dias de vida. Todos os pacientes apresentavam valores séricos de dihidrotestosterona, relação TT/DHT (sempre < 15), dehidroepiandrosterona e androstenediona normais para a faixa etária pré-puberal do sexo masculino.

Todos os pacientes apresentavam derivados dos ductos de Müller e Wolff. Nos 6 casos com maior evidência clínica de ambigüidade genital (os casos com classificação 3 e 4 de QUIGLEY *et al.*, 1995) foi detectada a presença de seio urogenital (Tabela 2).

Tabela 2: Dados clínicos de 13 crianças com Disgenesia Gonadal Parcial

Caso	Idade (meses)	Genitália externa ¹	Posição das gônadas (D/E) ²	Ducto de Müller	Ducto de Wolff	SUG ³
1	7	3	I / I	D+	E+	+
2	108	2	A / A	E+	D+	-
3	30	2	I / I	D/E+	D+	-
4	0.5	3	I / I	E+	D+	+
5	10	2	I / I	D+	E+	-
6	92	2	I / A	E+	D+	-
7	78	2	I / (-)	D+	E+	-
8	13	2	I / I	E+	D+	-
9	20	4	I / A	E+	D+	+
10	20	2	A / A	E+	D+	-
11	31	3	I / I	D+	E+	+
12	29	3	A / A	D/E+	D/E+	+
13	44	3	I / A	E+	D+	+

¹ = de acordo com a classificação de QUIGLEY *et al.* (1995)

² = D = direito, E = esquerdo, A = abdômen, I = canal inguinal, (-) = não localizada

³ = SUG = seio urogenital, (-) = ausente, (+) = presente

Tabela 3: Dados hormonais de 13 crianças com Disgenesia Gonadal Parcial

Caso	HAM ¹ (pMol/L)	TT ² (ng/mL)	β -hCG ³ (μ m/mL)	DHT ⁴ (ng/mL)	LH ⁵ (mU/mL)	FSH ⁶ (mU/mL)	DHEA ⁷ (ng/mL)	A- Δ 4 ⁸ (ng/mL)
1	118	0,3	NR	0,03	1,0	1,3	3,1	0,3
2	114	0,2	NR	0,03	0,9	5,4	1,1	0,2
3	52	<0,1	319	<0,02	0,6	1,2	3,5	0,4
4	98	0,6	NR	0,05	0,8	3,9	3,8	0,5
5	114	<0,1	351	<0,02	1,1	1,4	<0,5	0,1
6	113	0,3	NR	0,03	0,8	5,8	3,0	0,2
7	73	<0,1	301	<0,02	1,0	6,3	<0,5	<0,1
8	107	<0,1	196	<0,02	0,5	1,0	2,6	<0,1
9	11	<0,1	351	<0,02	1,1	1,5	0,7	0,2
10	91	<0,1	219	<0,02	1,0	1,4	1,6	<0,1
11	25	<0,1	143	<0,02	0,1	0,8	3,4	0,7
12	116	1,0	NR	0,05	0,3	0,7	1,9	0,3
13	71	<0,1	365	<0,02	0,9	0,9	<0,5	<0,1

¹ = HAM = hormônio anti-Mülleriano (valores normais de acordo com REY *et al.*, 1999)

² = TT = testosterona total (valor normal após hCG > 1,4 ng/mL)

³ = β -hCG = fração beta – gonadotrofina coriônica (valor homem normal < 25 mUI/mL)

⁴ = DHT = dihidrotestosterona (valor normal basal pré-puberal < 0,06 ng/mL)

⁵ = LH = hormônio luteinizante (valor normal basal pré-puberal 0,1 a 1,0 mUI/mL)

⁶ = FSH = hormônio folículo-estimulante (valor normal basal pré-puberal 0,1 a 1,4 mUI/mL)

⁷ = DHEA = dehidroepiandrosterona (valor normal basal pré-puberal 0,1 a 8,0 ng/mL)

⁸ = A- Δ 4 = androstenediona (valor normal pré-puberal 0,1 a 0,5 ng/mL)

Foram biopsiadas 22 das 26 gônadas. A idade dos pacientes na época da biópsia variou de 3 meses a 9 anos. Quatro gônadas não foram biopsiadas: as gônadas esquerdas dos pacientes 1 e 7, e as direitas dos pacientes 2 e 4 (Tabela 4). A gônada esquerda do paciente 7 não foi encontrada, mas a ausência ipsilateral de derivado Mülleriano e a presença de derivado do ducto de Wolff sugerem o diagnóstico de síndrome de regressão testicular unilateral precoce. Nos outros três pacientes a biópsia de uma das gônadas não foi realizada para análise histológica por problemas técnicos.

Como já havia sido observado na análise anterior realizada pelo Laboratório de Anatomia Patológica do HC – UNICAMP, cinco gônadas (casos nos. 2, 6, 9, 10 e 13) foram consideradas “em fita”, todas do lado esquerdo e que tinham posição intra-abdominal (Tabelas 2 e 4).

A Tabela 4 mostra os resultados do diâmetro tubular médio, IFT e número de células de Sertoli por corte tubular observados nas demais 17 gônadas.

Onze gônadas apresentavam hipoplasia tubular marcante, 4 hipoplasia tubular grave e uma leve (Figuras 2 a 4). Somente a gônada direita do paciente 13 apresentava diâmetro tubular médio normal.

O IFT estava gravemente reduzido em 9 gônadas, marcadamente reduzido em 2 e normal em 6 (Figuras 2 a 4) .

O número de células de Sertoli por corte tubular estava elevado em 16 das 17 gônadas analisadas (Figuras 2 a 4). Somente a gônada direita do paciente 10 mostrou número de células de Sertoli normal.

Não foi observado qualquer sinal sugestivo de neoplasia em nenhuma das 22 gônadas analisadas.

Tabela 4: Dados morfométricos e histológicos de 22 gônadas de 13 crianças com Disgenesia Gonadal Parcial

Caso	Idade ¹	Túbulos ²	DTM ³	GHT ⁴	IFT ⁵	GHG ⁶	NCS ⁷	HCS ⁸
1	11	D = 110	52,3	Marcante	12	Grave	28	(+)
2	122	E = (-)		“em fita”		“em fita”		“em fita”
3	36	D = 69	29,1	Grave	0	Grave	19	(+)
		E = 104	35,8	Grave	15	Grave	22	(+)
4	16	E = 117	49,6	Marcante	10	Grave	29	(+)
5	16	D = 102	46,8	Marcante	78	Normal	23	(+)
		E = 101	49,1	Marcante	97	Normal	24	(+)
6	108	D = 99	59,5	Leve	6	Grave	29	(+)
		E = (-)		“em fita”		“em fita”		“em fita”
7	84	D = 104	39,4	Grave	111	Normal	21	(+)
8	19	D = 126	54	Marcante	68	Normal	19	(+)
		E = 116	52,4	Marcante	166	Normal	19	(+)
9	26	D = 42	38,3	Grave	50	Grave	26	(+)
		E = (-)		“em fita”		“em fita”		“em fita”
10	27	D = 98	43,9	Marcante	0	Grave	18	Normal
		E = (-)		“em fita”		“em fita”		“em fita”
11	36	D = 104	49,6	Marcante	33	Marcante	30	(+)
		E = 115	53,1	Marcante	45	Marcante	33	(+)
12	37	D = 98	49,2	Marcante	0	Grave	37	(+)
		E = 80	43,4	Marcante	10	Grave	32	(+)
13	51	D = 66	64,1	Normal	115	Normal	24	(+)
		E = (-)		“em fita”		“em fita”		“em fita”

¹ = idade em meses na época da biópsia gonadal

² = número de túbulos examinados: D = gônada direita; E = gônada esquerda; (-) = ausência de túbulos seminíferos

³ = DTM = diâmetro tubular médio (µm)

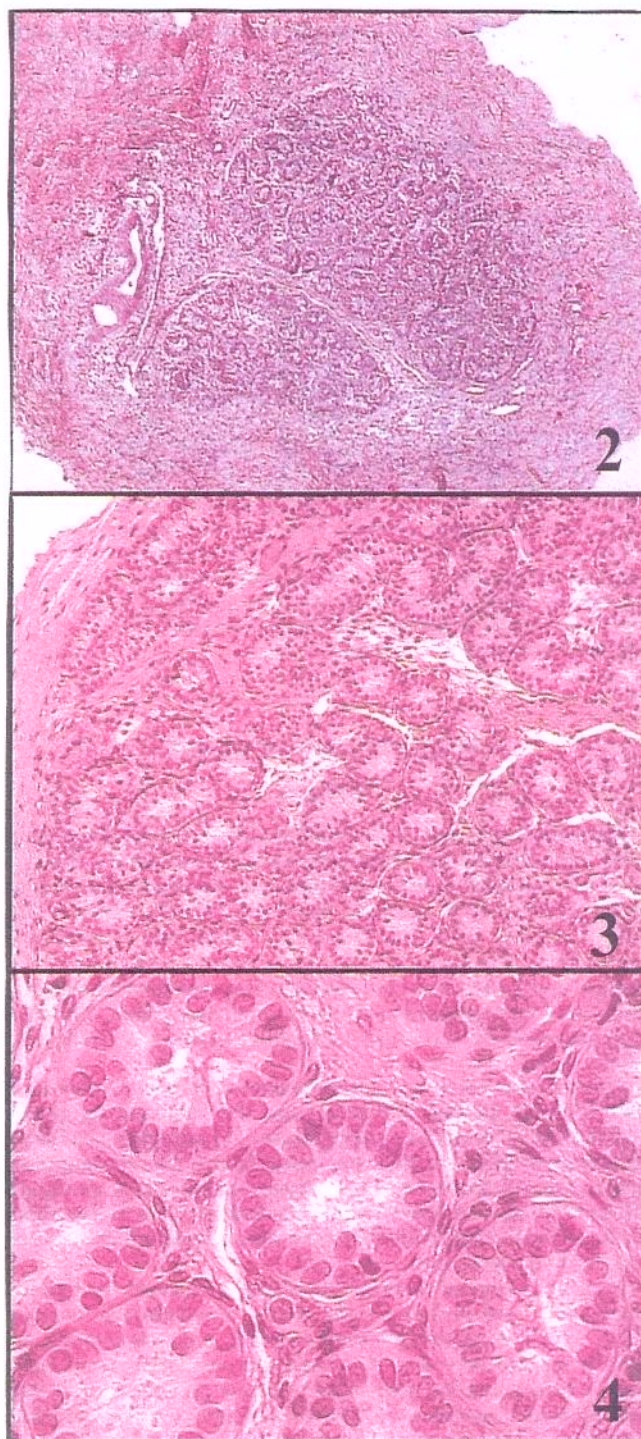
⁴ = GHT = gravidade da hipoplasia tubular de acordo com NISTAL & PANIAGUA (1996)

⁵ = IFT = índice de fertilidade tubular (%)

⁶ = GHG = gravidade da hipoplasia germinal de acordo com NISTAL & PANIAGUA (1996)

⁷ = nCS = número de células de Sertoli por corte tubular

⁸ = HCS = hiperplasia de células de Sertoli de acordo com NISTAL & PANIAGUA (1996). (+) = presente



Figuras: 2: Tecido do paciente caso no. 4. Uma área da gônada esquerda (hematoxilina-eosina, tamanho original x 75). **3:** Tecido do paciente caso no. 12. Uma área da gônada direita caracterizada por marcante hipoplasia tubular, grave hipoplasia germinal e hiperplasia das células de Sertoli (hematoxilina-eosina, tamanho original x 150). **4:** Tecido também da gônada direita do paciente caso no. 12 (hematoxilina-eosina, tamanho original x 300).



DISCUSSÃO

Pacientes com DGP possuem desenvolvimento ambíguo de graus variados dos ductos genitais, seio urogenital e genitália externa. Estes pacientes geralmente apresentam diminuição da secreção intra-uterina de HAM e andrógenos e, conseqüentemente, têm derivados dos ductos de Müller e genitália externa ambígua. Após o nascimento, laboratorialmente caracterizam-se por apresentar concentrações séricas de testosterona basal e após estímulo com hCG diminuídas, ausência de acúmulo de precursores da testosterona e concentração sérica de HAM baixa. As gonadotrofinas encontram-se elevadas, havendo um predomínio de FSH em relação ao LH (RAJFER & WALSH, 1981).

Mutações e deleções nos genes envolvidos na cascata da determinação testicular e diferenciação sexual, como o gene SRY, genes do cromossomo X e autossomos, estão envolvidos na etiologia da DGP. O SRY é expresso especialmente na gônada não diferenciada durante o desenvolvimento embriológico precoce, exatamente antes do primeiro sinal de formação testicular (GOODFELLOW & LOVELL-BADGE, 1993), agindo como um fator transcripcional de outros genes determinantes do sexo, provavelmente localizados no cromossomo X ou autossomos (JIMENEZ *et al.*, 1996). Apenas cerca de 10% dos casos de Disgenesia Gonadal são explicados por alguma mutação no gene do SRY. Nos casos restantes, o desenvolvimento sexual anormal pode ser causado por mutações em outros genes localizados no cromossomo X ou em autossomos (BERTA *et al.*, 1990; HAWKINS *et al.*, 1992).

Os 13 pacientes incluídos neste estudo apresentaram alguns dados interessantes, como a média de idade alta na primeira consulta e o sexo social masculino definido, denotando um atraso na identificação e encaminhamento para investigação de genitália ambígua pelo pediatra.

Não foram encontradas mutações no gene SRY em nenhum dos 13 pacientes estudados (ASSUMPÇÃO, 2001 – comunicação pessoal). Esses resultados estão de acordo com dados da literatura que indicam que mutações no SRY são bem mais freqüentes em pacientes com Disgenesia Gonadal Pura XY do que em pacientes com Disgenesia Gonadal Parcial XY (HAWKINS *et al.*, 1992). O paciente caso no. 12 possuía características da síndrome de Denys-Drash, por provável mutação no gene *WT-1* (MANIVEL, SIBLEY & DEHNER, 1987; HASTIE, 1992).

A ausência de sinais de síndrome de Turner torna mais provável o diagnóstico de DGP e não o de Disgenesia Gonadal Mista (DONAHOE, CRAWFORD & HENDREN, 1979; ROBBOY *et al.*, 1982; CHANG, CLARK & BACHMAN, 1990; ROHAGATI *et al.*, 1992; BORER, NITTI & GLASSBERG, 1995).

Apesar de todos os pacientes apresentarem predomínio de FSH em relação ao LH, somente 4 tiveram FSH acima do valor normal para a idade. Destes 4 pacientes, 3 eram maiores de 6 anos e 1 tinha 15 dias de idade, confirmando a utilidade da dosagem sérica das gonadotrofinas no diagnóstico de Disgenesia Gonadal nos extremos da idade pré-puberal.

Vários graus de masculinização da genitália externa foram observados, todos apresentando hipospádia com gônadas fora das saliências labioescrotais. Praticamente a metade dos casos apresentavam genitália externa grau 2 (fenótipo masculinizado) e os outros 50% grau 3 ou 4 (fenótipo ambíguo, com evidência de seio urogenital) de acordo com a classificação de QUIGLEY *et al.* (1995). Estes dados mostram que nos casos de DGP, assim como em outras etiologias de ambigüidade genital, a simples avaliação da genitália externa não é suficiente para esclarecimento etiológico.

A confirmação diagnóstica de DGP é baseada nos achados anatomopatológicos, desde vários graus de disgenesia testicular bilateral até testículos quase “normais” ou gônadas que grosseiramente lembram gônadas “em fita”. Embora as anormalidades observadas nos testículos disgenéticos sejam bem definidas (NISTAL & PANIAGUA, 1996), os patologistas geralmente apresentam algumas dificuldades no estabelecimento desse diagnóstico, devido à necessidade de um exame morfométrico cuidadoso e da experiência do responsável pelo exame.

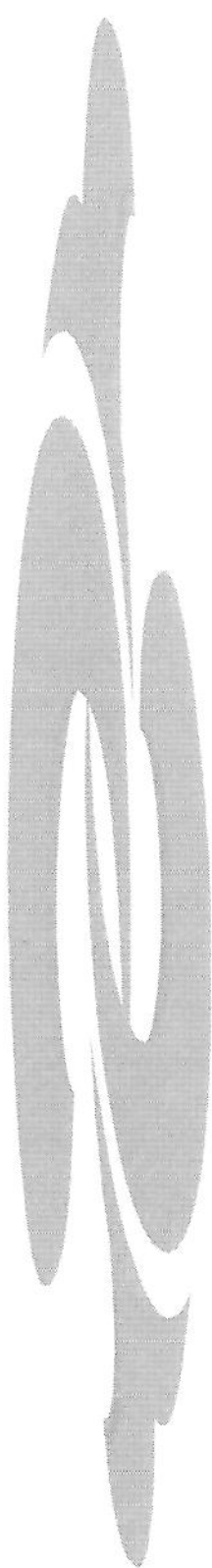
A biópsia testicular é essencial para o diagnóstico etiológico em determinados casos de ambigüidade genital, e a avaliação da biópsia de testículos pré-puberais deveria envolver as medidas do diâmetro tubular médio e do número de células germinativas, células de Sertoli, e células de Leydig por corte tubular, ou por unidade de área, ou por unidade de volume, ou por testículo (NISTAL & PANIAGUA, 1996).

O diâmetro tubular, indicador do desenvolvimento do epitélio seminífero, varia no decorrer da infância, sendo menor no quarto ano de vida com aumento progressivo até os 15 anos (NISTAL & PANIAGUA, 1996). Os 13 pacientes apresentaram diâmetro tubular médio variável, de normal a gravemente diminuído, mas com predomínio de hipoplasia tubular marcante a grave, observada em 15 de 17 gônadas analisadas. Ainda que existam dificuldades técnicas na avaliação do diâmetro tubular médio, estes dados indicam a necessidade desta medida em todas as biópsias testiculares, quando houver suspeita clínica de disgenesia gonadal, independente da localização da gônada.

O IFT reflete a porcentagem dos cortes tubulares contendo pelo menos uma célula germinativa. Nos recém-nascidos, 68% dos cortes tubulares contêm pelo menos uma célula germinativa, diminuindo até os 3 anos de idade para 50%, seguido de um aumento progressivo para 100% na puberdade (NISTAL & PANIAGUA, 1996). Neste estudo observou-se que o IFT estava alterado em 11 de 17 gônadas avaliadas. Das 6 gônadas com IFT normal, 5 possuíam diâmetro tubular médio diminuído e uma diâmetro tubular médio normal. Estes achados sugerem que a medida do diâmetro tubular médio pode ser melhor indicador de disgenesia testicular que o IFT.

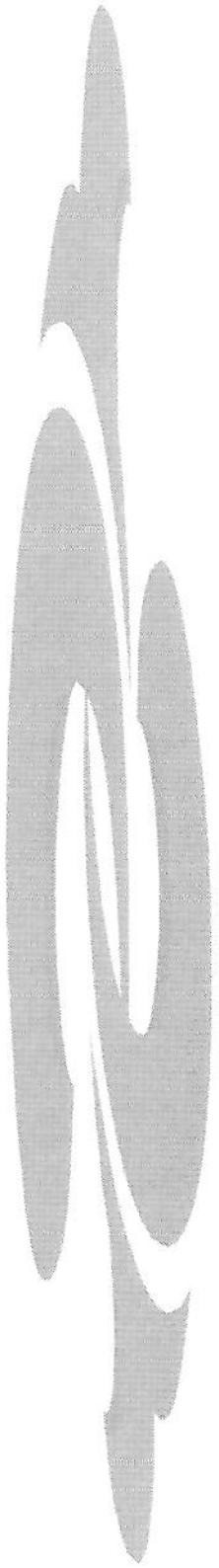
Outro parâmetro histológico avaliado foi o número de células de Sertoli por corte tubular, que varia durante a infância como resultado da lenta proliferação destas células, entre 4 e 12 anos de idade. A hiperplasia de células de Sertoli é considerada um sinal de disgenesia tubular. O número de células de Sertoli estava aumentado em todas as 17 gônadas dos pacientes avaliados neste estudo, exceto em um paciente que apresentava número normal. A única gônada avaliada (a gônada direita do caso no. 10) que não apresentou aumento do número de células de Sertoli foi biopsiada aos 27 meses de idade do paciente, o que pode em parte justificar o fato de não ter sido observada a hiperplasia das células de Sertoli. Esta hiperplasia é mais freqüentemente observada no primeiro ano de vida e início da puberdade.

Finalmente, é importante enfatizar que em 22 gônadas avaliadas, somente 5 lembravam grosseiramente gônadas “em fita”. É interessante observar que todas encontravam-se do lado esquerdo, semelhante aos hermafroditas verdadeiros, onde existe também um predomínio de ovário e ovotestis do lado esquerdo (VAN NIEKERK & RETIEF, 1981; GUERRA JR. *et al.*, 1998).



CONCLUSÕES

Em **conclusão**, os achados histológicos das gônadas destes 13 casos de DGP, apesar de variáveis, confirmaram o diagnóstico clínico. A avaliação morfométrica cuidadosa, particularmente a medida do diâmetro tubular médio, pode ser útil para estabelecer e melhorar o diagnóstico histológico em determinados casos de disgenesia gonadal.



SUMMARY

Background: Partial Gonadal Dysgenesis (PGD) is a sexual differentiation disorder characterized by bilateral dysgenetic testes, persistent Müllerian structures, and cryptorchidism in individuals with 46,XY karyotype. However, the histologic criteria for the diagnosis of PGD are poorly established.

Objective: To determine gonadal histology in children with PGD.

Patients and methods: Between 1996 and 1998, 13 patients with PGD were evaluated on our service. The clinical diagnosis of PGD was based on a 46,XY karyotype, sex ambiguity, high levels of FSH and low levels of AMH, a decreased testosterone response to hCG stimulation without accumulation of testosterone precursors, and the presence of Müllerian structures. Biopsies were performed for 22 of 26 gonads (patient age at the time of biopsy, 11 months to 10 years). Conventional microscopy was used to evaluate mean tubular diameter, tubular fertile index and number of Sertoli cells per tubular profile.

Results: All 26 gonads were located outside of the labioscrotal folds. Their histologic features varied from only a reduction in tubular size to features of a streak gonad. Five of the 22 gonads grossly resembled a streak gonad. The mean tubular diameter was severely reduced ($> 30\%$ reduction relative to the normal tubular diameter for the patient's age) in 4 gonads, markedly reduced ($10\% - 30\%$) in 11, slightly reduced ($< 10\%$) in one, and normal in one gonad. The tubular fertile index, expressed in percentage of tubular profiles containing germ cells, was severely reduced ($< 30\%$ of normal values) in 9 gonads, markedly reduced ($50\% - 30\%$) in 2 gonads, and normal in 6 gonads. The number of Sertoli cells per tubular profile was elevated in 16 gonads and normal in one gonad. Thin tubules surrounded by fibrous tissue were occasionally observed.

Conclusion: The histologic findings confirmed the clinical diagnosis of PGD in every patient in the present series. However, gonadal histology is variable, and careful morphometric evaluation may be necessary to establish the diagnosis.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- BERTA, P.; HAWKINS, J.R.; SINCLAIR, A.H.; TAYLOR, A.; GRIFFITHS, B.L.; GOODFELLOW, P.N. & FELLOUS, M. – Genetic evidence equating SRY and testis-determining factor. Nature, 348: 448-450, 1990.
- BERKOVITZ, G.D.; FECHNER, P.Y.; ZACUR, H.W.; ROCK, J.A.; SNYDER III, H.M.; MIGEON, J.C. & PERLMAN, E.J. – Clinical and pathologic spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis: its relevance to the understanding of sex differentiation. Medicine, 70: 375-383, 1991.
- BORER, J.G.; NITTI, V.W. & GLASSBERG, K.I. – Mixed gonadal dysgenesis and dysgenetic male pseudohermaphroditism. J. Urol., 153: 1267-1273, 1995.
- BURR, F.M.; SIZONENKO, P.C.; KAPLAN, S.L. & GRUMBACH, M.M. – Hormonal changes in puberty. I. Correlation of serum luteinizing hormone and follicle stimulating hormone with stages of puberty, testicular size, and bone age in normal boys. Pediatr. Res., 4: 25-35, 1970.
- CAMERON FJ & SINCLAIR AH. – Mutations in SRY and SOX-9 : testis-determining genes. Hum. Mut., 9: 388-395, 1997.
- CARRÉ-EUSÈBE, D.; IMBEAUD, S.; HARBISON, M.; NEW, M.I.; JOSSO, N. & PICARD, J.Y. – Variants of the anti-Müllerian hormone gene in a compound heterozygote with the persistent Müllerian duct syndrome and his family. Hum. Genet., 90: 389-394, 1992.
- CHANG, H.J.; CLARK, R.D. & BACHMAN, H. – The phenotype of 45,X/46,XY mosaicism: an analysis of 92 prenatally diagnosed cases. Am. J. Med. Genet., 46: 156-167, 1990.
- CORTES, D.; MÜLLER, J. & SAKAKKEBAEK, N.E. – Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. Int. J. Androl., 10: 589-596, 1987.
- DANIEL, W.A.; FEINSTEIN, R.A.; HOWARD-PEEBLES, P. & BAXLEY, W.D. – Testicular volumes of adolescents. J. Pediatr., 101: 1010-1012, 1982.

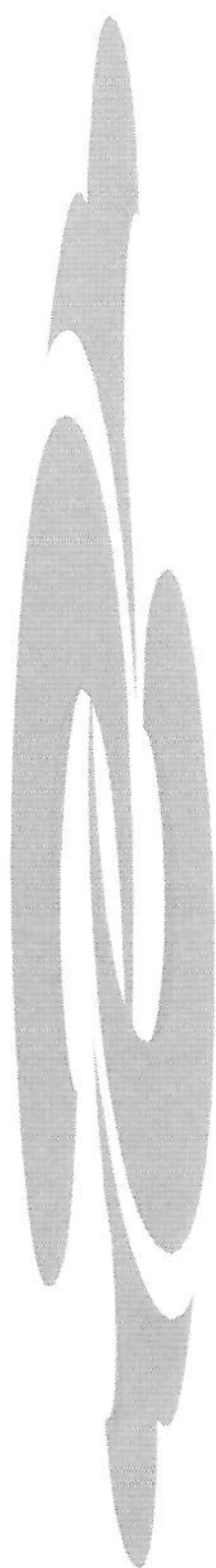
- DANISH, R.K. – Anomalías de la diferenciación sexual. In: FANAROFF, A.A.; MARTIN, R.J. & MERKATZ, I.R. Behrman Enfermedades del feto y del recién nacido: Perinatología-Neonatología. Buenos Aires, Panamericana, 1985. p. 1081-1120.
- DONAHOE, P.K.; CRAWFORD, J.D. & HENDREN, W.H. – Mixed gonadal dysgenesis: pathogenesis and management. J. Pediatr. Surg., 14: 287-300, 1979.
- DOSHI, N.; SURTI, U.I. & SZULMAN, A.E. – Morphologic anomalies in triploid liveborn fetuses. Hum. Pathol., 14: 716-723, 1983.
- GOODFELLOW, P.N. & LOVELL-BADGE, R. – SRY and Sex determination in mammals. Annu. Rev. Genet., 27: 71-92, 1993.
- 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.
- GUERRA JR., G.; DE MELLO, M.P.; ASSUMPÇÃO, J.G.; MORCILLO, A.M.; MARINI S.H.V.L.; BAPTISTA, M.T.M.; SILVA, R.B.P.; MARQUES-DE-FARIA, A.P. & MACIEL-GUERRA, A.T. – True hermaphrodites in the southeastern region of Brazil: a different cytogenetic and gonadal profile. J. Pediatr. Endocrinol. Metab., 11: 519-524, 1998.
- HASTIE, N.D. – Dominant negative mutations in the Wilms tumour (*WT1*) gene cause Denys-Drash syndrome – proof that a tumour-suppressor gene plays a crucial role in normal genitourinary development. Nature Genet., 1: 293-295, 1992.
- HAWKINS, J.R.; TAYLOR, A.; BERTA, P.; LEVILLIERS, J.; VAN DER AUWERA, B. & GOODFELLOW, P.N. – Mutational analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY Sex reversal. Hum. Genet., 88: 471-474, 1992.
- HAWKINS, JR, TAYLOR, A, GOODFELLOW, PN, MIGEON, CJ, SMITH, D & BERKOVITZ, GD. – Evidence for increase prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. Am. J. Hum. Genet., 51: 979-984, 1992.

- JIMENEZ, R.; SANCHEZ, A.; BURGOS, M. & DIAS DE LA GUARDIA, R.C. – Puzzling out the genetics of mammalian sex determination. Trends Genet., 12: 164-166, 1996.
- JOSSO, N.; LEGEAI, 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 enfants and children. J. Clin. Endocrinol. Metab., 70: 23-27, 1990.
- KRASNA, I.H.; LEE, M.L.; SMILOW, P.; SCIORRA, L. & EIERMAN, L. – Risk of malignancy in bilateral streak gonads: the role of the Y chromosome. J. Pediatr. Surg., 27: 1376-1380, 1992.
- KWOK, C.; WELLER, P.A.; GUIOLI, S.; FOSTER, J.W.; MANSOUR, S.; ZUFFARDI, O.; PUNNETT, H.H.; DOMINGUEZ-STEGLICH, M.A.; BROOK, J.D.; YOUNG, I.D.; GOODFELLOW, P.N. & SCHAFER, A.J. – Mutations in SOX9, the gene responsible for campomelic dysplasia and autosomal sex reversal. Am. J. Hum. Genet., 57: 1028-1036, 1995.
- LENNOX, B.; AHMAD, K.N. & MACK, W.S. – A method for determining the relative total length of the tubules in the testis. J Pathol., 102: 229-238, 1970.
- MARCANTONIO, S.M.; FECHNER, P.Y.; MIGEON, C.J.; PERLMAN, E.J. & BERKOVITZ, G.D. – Embryonic testicular regression sequence: a part of the clinical spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis. Am. J. Med. Genet., 49: 1-5, 1994.
- MANIVEL, J.C.; SIBLEY, R.K. & DEHNER, L.P. – Complete and incomplete Drash syndrome: a clinicopathologic study of five cases of a dysontogenetic-neoplastic complex. Hum. Pathol., 18: 80-9, 1987.
- MANSOUR, S.; HALL, C.M.; PEMBREY, M.E. & YOUNG, I.D. – A clinical and genetic study of campomelic dysplasia. J. Med. Genet., 32: 415-420, 1995.
- MARSHALL, W.A. & TANNER, J.M. – Variation in pattern of pubertal changes in boys. Ach Dis Child, 45: 13-17, 1970.

- MÜLLER, J. & SAKAKKEBAEK, N.E. – Quantification of germ cells and seminiferous tubules by stereological examination of testicles from 50 boys who suffered from sudden death. Int. J. Androl., 6: 143-156, 1983.
- MÜLLER, J. & SAKAKKEBAEK, N.E. – Fluctuations in the number of germ cells during late foetal and early postnatal periods in boys. Acta Endocrinol., 105: 271-274, 1984.
- NIELSEN, C.T.; SKAKKEBAEK, N.E.; RICHARDSON, D.W.; DARLING, J.A.; HUNTER, W.M.; JORGENSEN, M.; NIELSEN, A.; INGERSLEV, O.; KEIDING, M. & MULLER, J. – Onset of the release of spermatozoa (spermarche) in boys in relation to age, testicular growth, pubic hair, and height. J. Clin. Endocrinol. Metab., 62: 532-535, 1986.
- NISTAL, M.; ABAURREA, M.A. & PANIAGUA, R. – Morphological and histometric study of human Sertoli cells from birth to the onset of puberty. J. Anat., 134: 351-363, 1982.
- NISTAL, M.; GONZÁLEZ-PERAMATO, P. & PANIAGUA, R. – Congenital Leydig cell hyperplasia. Histopathology, 12: 307-317, 1988.
- NISTAL, M. & PANIAGUA, R. – Non-neoplastic diseases of the testis. In: BOSTWICK, D.G. & EBLE, J.N. (ed.) – Urologic Surgical Pathology. St. Louis, Mosby, 1996. pg. 468-565.
- NISTAL, M.; PANIAGUA, R.; ABAURREA, M.A. & SANTAMARIA, L. – Hyperplasia and the immature appearance of Sertoli cells in primary testicular disorders. Hum. Pathol., 13: 3-12, 1982.
- NISTAL, M.; PANIAGUA, R.; REGADERA, J.; SANTAMARIA, L. & AMAT, P. – A quantitative morphologic study of human Leydig cells from birth to adulthood. Cell Tissue Res., 246: 229-236, 1986.
- PANIAGUA, R. & NISTAL, M. – Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to the onset of puberty. J. Anat., 139: 535-552, 1984.

- QUIGLEY, C.A.; DE BELLIS, A.; MARSCHKE, K.B.; EL-AWADY, M.K.; WILSON, E.M. & FRENCH, F.S. – Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. Endoc. Rev., 16: 271-321, 1995.
- RAJFER, J.; MENDELSON, G.; ARNHEIM, J.; JEFFS, R.D. & WALSH, P.C. – Dysgenetic male pseudohermaphroditism. J. Urol., 119: 525-527, 1978.
- RAJFER, J. & WALSH, P.C. – Mixed gonadal dysgenesis: dysgenetic male pseudohermaphroditism. In: JOSSO, N. (ed.) – The intersex child: pediatric and adolescent endocrinology. Basel, S. Karger, 1981. pg. 105-115.
- REY, R.A.; BELVILLE, C.; NHOUE-FÉKÉTÉ, C.; MICHEL-CALEMARD, L.; FOREST, M.G.; LAHLOU, N.; JAUBERT, F.; MOWSZOWICZ, I.; DAVID, M.; SAKA, N.; BOUVATTIER, C.; BERTRAND, A.M.; LECOINTRE, C.; SOSKIN, S.; CABROL, S.; CROSNIER, H.; LÉGER, J.; LORTAT-JACOB, S.; NICOLINO, M.; RABL, W.; TOLEDO, S.P.A.; BAS, F.; GOMPEL, A.; CZERNICHOW, P.; CHATELAIN, P.; RAPPAPORT, R.; MOREL, Y. & JOSSO, N. – Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum antimüllerian hormone measurement. J. Clin. Endocrinol. Metab., 84: 627-631, 1999.
- ROBBOY, S.J.; MILLER, T.; DONAHOE, P.K.; JAHRE, C.; WELCH, W.R.; HASELTINE, F.P.; MILLER, W.A.; ATKINS, L. & CRAWFORD, J.D. – Dysgenesis of testicular and streak gonads in the syndrome of mixed gonadal dysgenesis. Perspective derived from clinicopathologic analysis of twenty-one cases. Hum. Pathol., 13: 700-716, 1982.
- ROHATGI, M.; GUPTA, D.K.; MENON, P.S.; VERMA, I.C. & MATHUR, M. – Mixed gonadal dysgenesis and dysgenetic male pseudohermaphroditism – a critical analysis. Ind. J. Pediatr., 59: 487-500, 1992.
- SAVAGE, M.O. – Clinical aspects of intersex. In: BROOK, C.G.D. (ed.) – Clinical Paediatric Endocrinology. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1989. pg. 38-56.

- STUCHI-PEREZ, E.G.; LUKAS-CROISIER, C.; CASTRO, M.; BAPTISTA, M.T.M.; SCOLFARO, M.R.; MARQUES-DE-FARIA, A.P.; HACKEL, C.; MACIEL-GUERRA, A.T. & GUERRA JR., G. – Evaluation of the tubular and interstitial functions of the testis in 46,XY patients with ambiguous genitalia. J. Pediatr. Endocrinol. Metab., 13: 605-612, 2000.
- TROCHE, V. & HERNANDEZ, E. – Neoplasia arising in dysgenetic gonads. Obstet. Gynecol. Sur., 41: 74-79, 1986.
- VAN NIEKERK, W.A. & RETIEF, A.E. – The gonads of human true hermaphrodites. Hum. Genet., 58:117-122, 1981.
- VEITIA, R.; NUNES, M.; BRAUNER, R.; DOCO-FENZY, M.; JOANNY-FLINOIS, O.; JAUBERT, F.; LORTAT-JACOB, S.; FELLOUS, M. & MCELREAVEY, K. – Deletions of distal 9p associated with 46,XY male to female sex reversal: definition of the breakpoints at 9p23.3-p24.1. Genomics, 41: 271-274, 1997.
- VEITIA, R.; NUNES, M.; QUINTANA-MURCI, L.; RAPPAPORT, R.; THIBAUD, E.; JAUBERT, F.; FELLOUS, M.; MCELREAVEY, K.; GONÇALVES, J.; SILVA, M.; RODRIGUES, J.C.; CASPURRO, M.; BOIEIRO, F.; MARQUES, R. & LAVINHA, J. – Swyer syndrome and 46,XY partial gonadal dysgenesis associated with 9p deletions in the absence of monosomy 9p syndrome. Am. J. Hum. Genet., 63: 901-905, 1998.
- VILAR, O. – Histology of the human testis from neonatal period to adolescence. Adv. Exp. Med. Biol., 10: 95-111, 1970.
- ZACHMANN, M.; PRADER, A.; KIND, H.P.; HÄFLIGER, H. & BUDLIGER, H. – Testicular volume during adolescence. Cross-sectional and longitudinal studies. Helv. Paediatr. Acta., 29: 61-72, 1974.



PRODUÇÃO CIENTÍFICA

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS E RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS

STUCHI-PEREZ, E.G.; GUERRA JR., G.; **SCOLFARO, M.R.**; MACIEL-GUERRA, A.T.; MARQUES-DE-FARIA, A.P.; SILVA, R.B.P.; CESCHINI, M.; CASTRO, M.; REY, R.; CARDINALLI, I.A. & BAPTISTA, M.T.M. – Utility of anti-müllerian hormone to evaluate intersex. Anais da XII Reunião da Sociedade Latino Americana de Endocrinologia Pediátrica, pg.129, 1998. XII Reunião Anual da Sociedade Latino-Americana de Endocrinologia Pediátrica realizada em São Pedro (SP), de 8 a 11 de novembro de 1998.

SCOLFARO, M.R.; CARDINALLI, I.A.; ASSUMPÇÃO, J.G.; MELLO, M.P.; STUCHI-PEREZ, E.G.; BAPTISTA, M.T.M.; MACIEL-GUERRA, A.T. & GUERRA JR., G. – XY gonadal dysgenesis: clinic, hormonal, molecular, radiological and histological features of 13 cases. Anais da XIII Reunião da Sociedade Latino Americana de Endocrinologia Pediátrica, pg. 106, 1999. XIII Reunião Anual da Sociedade Latinoamericana de Endocrinologia Pediátrica em Arequipa-Perú, de 7 a 11 de novembro de 1999.

ASSUMPÇÃO, J.G.; MACIEL-GUERRA, A.T.; GUERRA JR., G.; **SCOLFARO, M.R.** & DE MELLO, M.P. – Two novel missense mutations in the SRY gene associated with 46,XY gonadal dysgenesis. Anais do European Human Genetics Conference 2000 - Eur. J. Hum. Genet. 8 (suppl. 1): 115, 2000. European Human Genetics Conference 2000 em Amsterdam (Holanda), de 27 a 30 de maio de 2000.

SCOLFARO, M.R.; CARDINALLI, I.A.; ASSUMPÇÃO, J.G.; MELLO, M.P.; STUCHI-PEREZ, E.G.; BAPTISTA, M.T.M.; MACIEL-GUERRA, A.T. & GUERRA JR., G. – Morphometry and histology of gonads from 13 children with dysgenetic male pseudohermaphroditism. Anais da 39th Annual Meeting of the European Society for Pediatric Endocrinology – Hormone Research 53 (suppl. 2): 89, 2000. 39th Annual Meeting of the European Society for Pediatric Endocrinology em Bruxelas (Bélgica) de 17 a 19 de setembro de 2000.

TRABALHOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS INTERNACIONAIS INDEXADOS

STUCHI-PEREZ, E.G.; LUKAS-CROISER, C.; CASTRO, M.; BAPTISTA, M.T.M.; **SCOLFARO, M.R.**; MARQUES-DE-FARIA, A.P.; HACKEL, C.; MACIEL-GUERRA, A.T. & GUERRA JR., G. - Evaluation of the tubular and interstitial functions of the testis in 46,XY patients with ambiguous genitalia. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism 13 (6): 605-612, 2000.

SCOLFARO, M.R.; CARDINALLI, I.A.; STUCHI-PEREZ, E.G.; DE MELLO, M.P.; ASSUMPÇÃO, J.G.; BAPTISTA, M.T.M.; SILVA, J.M.B.; MACIEL-GUERRA, A.T. & GUERRA JR., G. – Morphometry and histology of gonads from 13 children with dysgenetic male pseudohermaphroditism. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 125 (5): 652-656, 2001.

PRÊMIO RECEBIDO EM CONGRESSO INTERNACIONAL

SCOLFARO, M.R.; CARDINALLI, I.A.; ASSUMPÇÃO, J.G.; MELLO, M.P.; STUCHI-PEREZ, E.G.; BAPTISTA, M.T.M.; MACIEL-GUERRA, A.T. & GUERRA JR., G. – XY gonadal dysgenesis: clinic, hormonal, molecular, radiological and histological features of 13 cases. Anais da XIII Reunião da Sociedade Latino Americana de Endocrinologia Pediátrica, pg. 106, 1999. XIII Reunião Anual da Sociedade Latinoamericana de Endocrinologia Pediátrica em Arequipa-Perú, de 7 a 11 de novembro de 1999. Vencedor do prêmio de melhor trabalho clínico apresentado nesta XIII Reunião Anual da SLEP.

XXXVI REUNIÃO DA SOCIEDADE LATINO AMERICANA
DE INVESTIGAÇÃO PEDIÁTRICA

XII REUNIÃO DA SOCIEDADE LATINO AMERICANA
DE ENDOCRINOLOGIA PEDIÁTRICA

II REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO LATINO AMERICANA
DE NEFROLOGIA PEDIÁTRICA



SÃO PEDRO - SP - BRASIL
08 A 11 DE NOVEMBRO DE 1998

ANAIIS

A 104 UTILIDADE DO HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO NA AVALIAÇÃO DE INTERSEXO

Stuchi-Perez, EG; Guerra Jr, G; Sacolfaro, M; Maciel-Guerra, AT; Marques-de-Faria, AP; Silva, RBP; Ceschini, M; Castro, M; Rey, R; Cardinali, IA; Baptista, MTM
GIEDDS - Fac. Ciências Médicas - Univ. Est. Campinas - UNICAMP - Campinas - SP - Brasil

Introdução - O hormônio anti-Mülleriano (HAM) é produzido pelas células de Sertoli, para regressão dos ductos de Müller no feto masculino. Sua secreção é mantida durante a infância, apresenta correlação inversa com os níveis de testosterona, caindo drasticamente no período da puberdade. Apresenta importante aplicação clínica na investigação diagnóstica intersexo (IS), porém são poucos os trabalhos já realizados.

Pacientes e métodos - Realizamos dosagem de HAM (ELISA) em 14 pacientes com IS - 7 com distúrbios da diferenciação gonadal (DDG): 3 hermafroditas verdadeiros (HV) e 4 com disgenesia gonadal (DG); 7 pseudohermafroditas masculinos (PHM): 4 com deficiência de 5 α -redutase (D5 α), 1 com resistência completa aos andrógenos (RCA), 1 com hipogonadismo central (HC) e 1 com deficiência de 3 β -hidroxiesteróide-desidrogenase (D3 β).

Resultados: podem ser vistos na tabela abaixo

Diagn.	n	idade (anos)	LH (UI/ml)	FSH (UI/ml)	Testo (ng/ml)	HAM (ng/ml)
HV	03	3,6 - 12,1	0,2 - 1,2	1,6 - 5,6	0,1 - 0,6	4,3 - 111,0
DG	04	1,08 - 10,08	0,6 - 3,5	2,2 - 13,6	0,1 - 1,9	7,8 - 83,1
D5 α	04	0,08 - 16,0	1,1 - 7,3	4,4 - 15,9	2,2 - 4,9	2,3 - 41,2
RCA	01	13,08	7,9	5,7	5,5	139,5
HC	01	3,5	<0,01	0,5	0,75	26,1
D3 β	01	7,0	0,1	1,2	0,7	45,7

Conclusões - Nos pacientes com DDG os níveis de HAM variaram de acordo com a presença de tecido testicular; nos pacientes com PHM estes níveis mostraram-se: diminuídos no HC e na D5 α , aumentados na RCA e normais/elevados na D3 β . A dosagem do HAM é de grande utilidade na investigação diagnóstica de IS, em especial nos casos de PHM cujo diagnóstico é complexo.

A 104 UTILITY OF ANTI-MÜLLERIAN HORMONE TO EVALUATE INTERSEX

Stuchi-Perez, EG; Guerra Jr, G; Sacolfaro, M; Maciel-Guerra, AT; Marques-de-Faria, AP; Silva, RBP; Ceschini, M; Castro, M; Rey, R; Cardinali, IA; Baptista, MTM
GIEDDS - Fac. Ciências Médicas - Univ. Est. Campinas - UNICAMP - Campinas - SP - Brasil

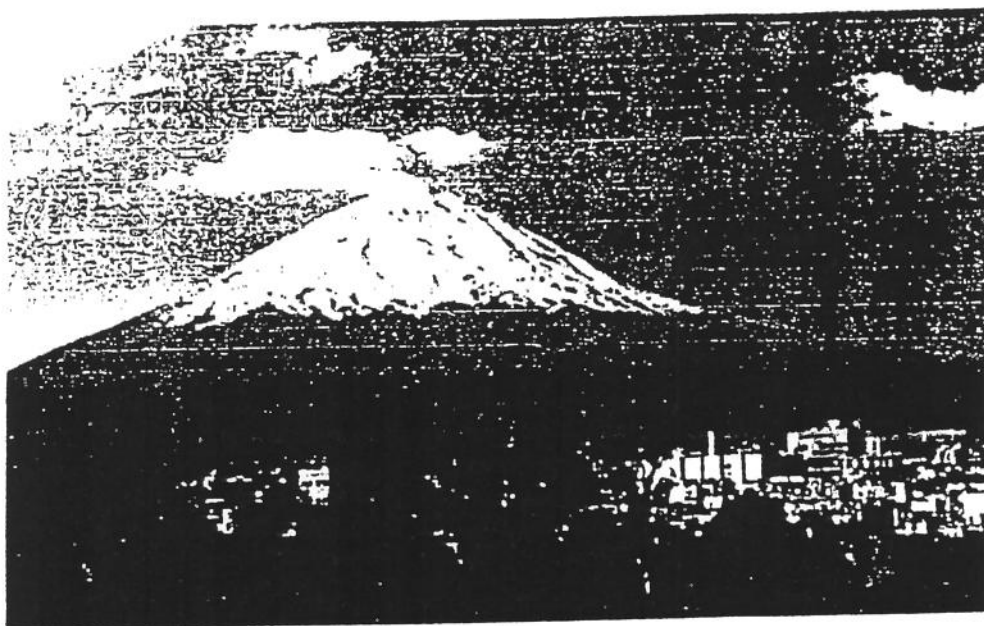
Introduction: Anti-Müllerian Hormone (AMH) is produced by Sertoli cells in order to induce the regression of Müller's ducts in the male foetus. Its secretion is sustained during infancy, presents inverse correlation with testosterone levels, and have drastic diminution at puberty. It presents important clinical application in the intersex (IS) diagnostic investigation, but there are no few studies performed.

Patients and methods: We made AMH dosages (ELISA) in 14 IS patients - 7 with gonadal differentiation disturbs (GDD): 3 with true hermaphroditism (TH) and 4 with gonadal dysgenesis (GD), 7 male pseudohermaphrodites (MPH): 4 with 5 α -reductase deficiency (5 α D), 1 with complete androgen resistance (CAR), 1 with central hypogonadism (CH) and 1 with 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenase deficiency (3 β D).

Results are shown in the table above

Diagn.	n	age(years)	LH(UI/ml)	FSH(UI/ml)	Testost(ng/ml)	AMH (ng/ml)
TH	03	3,6 - 12,1	0,2 - 1,2	1,6 - 5,6	0,1 - 0,6	4,3 - 111,0
GD	04	1,08 - 10,08	0,6 - 3,5	2,2 - 13,6	0,1 - 1,9	7,8 - 83,1
5 α D	04	0,08 - 16,0	1,1 - 7,3	4,4 - 15,9	2,2 - 4,9	2,3 - 41,2
CAR	01	13,08	7,9	5,7	5,5	139,5
CH	01	3,5	<0,01	0,5	0,75	26,1
3 β D	01	7,0	0,1	1,2	0,7	45,7

Conclusions: in GDD patients the HAM levels varied with the presence of testicular tissue; in MPH patients these levels were: diminished in CH and 5 α D, high in CAR and normal/high in 3 β D. The AMH dosage have a great utility in the IS diagnostic investigation, specially in MPH patients, where the diagnosis is complex.



XXXVII REUNION DE LA
SOCIEDAD LATINOAMERICANA
DE INVESTIGACION PEDIATRICA
(SLAIP)



XIII REUNION DE LA
SOCIEDAD LATINOAMERICANA
DE ENDOCRINOLOGIA PEDIATRICA
(SLEP)

AREQUIPA - PERU
07 al 11 de Noviembre de 1999

**DISGENESIA GONADAL XY: ASPECTOS CLÍNICOS, HORMONAIS,
MOLECULARES, RADIOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DE 13 CASOS.**
SCOLFARO, M.R.; CARDINALLI, I.A.; ASSUMPTÃO, J.G.; MELLO, M.P.;
STUCHI-PEREZ, E.G.; BAPTISTA, M.T.M.; MACIEL-GUERRA, A.T. & GUERRA JR., G.
GIEDDS - FCM - UNICAMP - Campinas - SP - Brasil

Diversas são as formas de nomear a disgenesia gonadal XY (DGXY) não pura, como DG parcial, atípica, e pseudo-hermafroditismo disgenético, entre outras. A DGXY é definida pela presença de ambigüidade genital (AG) em indivíduos com diminuição da produção de testosterona (T), presença de derivados de Müller, e evidência histológica de DG. No entanto, os critérios histológicos para definição de DG não são claros. Os níveis séricos do hormônio anti-Mülleriano (HAM) têm sido relatados como diminuídos nestes casos. O objetivo deste estudo é apresentar os aspectos clínicos, hormonais (FSH, resposta da T ao estímulo com hCG, T/DHT, e HAM), moleculares, de imagem (genitografia com ou sem cistoscopia), e histológicos de 13 casos de AG com diagnóstico de DGXY atendidos em nosso serviço entre 1995 e 1998. A idade dos pacientes à 1ª consulta variou de 15 dias a 10 anos (média de 4 anos e 8 meses), todos previamente registrados no sexo masculino, com gônadas fora da bolsa escrotal, e AG variando de grau III a V de Prader. Em um caso foi observada a associação com tumor de Wilms unilateral e nefropatia. O FSH apresentou-se elevado em 10 casos, a resposta da T ao hCG foi ausente em 8 casos e diminuída nos demais, e todos os precursores de T, bem como a relação T/DHT foram normais. O nível sérico do HAM foi abaixo de -2DP para idade e sexo em todos os casos. Nenhum caso apresentou mutação no domínio do HMGbox do SRY. A avaliação por imagem mostrou 3 casos com seio urogenital, vagina e útero. Os dados histológicos variaram desde apenas diminuição da luz tubular até franca hialinização gonadal. Salientamos com estes dados a importância de uma adequada avaliação hormonal, incluindo a determinação sérica do HAM, na suspeita de DGXY, tendo em vista que a confirmação histológica, apesar de indispensável, nem sempre é evidente e fácil de ser realizada.

**XY GONADAL DYSGENESIS: CLINIC, HORMONE, MOLECULAR,
RADIOLOGIC AND HISTOLOGIC FEATURES OF 13 CASES.**

SCOLFARO, M.R.; CARDINALLI, I.A.; ASSUMPTÃO, J.G.; MELLO, M.P.;
STUCHI-PEREZ, E.G.; BAPTISTA, M.T.M.; MACIEL-GUERRA, A.T. & GUERRA JR., G.
GIEDDS - FCM - UNICAMP - Campinas - SP - Brazil

XY gonadal dysgenesis (XYGD) is also called partial, atypic, or dysgenetic pseudohermaphroditism. XYGD is characterized by sex ambiguity (SA), low levels of testosterone (T), persistence Müllerian structures, and histologic evidence of GD. However, the histologic criteria to define GD are not clear. The serum levels of the anti-Müllerian hormone (AMH) have been shown to be decreased in these cases. The aim of this work was to describe the clinic, hormone (FSH, T response to hCG stimulation test, T/DHT ratio, and AMH), molecular, radiologic (genitography with or without cystoscopy), and histologic features of 13 cases of SA due to XYGD, evaluated in our service among 1995 and 1998. Age range in the first consultation varied from 15 days to 10 years old (mean: 4.7 years) and the male sex of rearing was defined in all cases prior to this consultation. The SA varied from Prader grade III to V and no gonads were found inside the genital folds. In only one case there was an association with unilateral Wilms tumor and nephropaty. FSH levels were increased in 10 cases, T response to hCG stimulation test was null in 8 cases and decreased in the others, and T precursors, as well as the T/DHT ratio, were normal. All cases had serum levels of AMH below -2SD for age and sex. Genomic DNA samples from each patient and normal male and female controls were used as templates to amplify by PCR the SRY HMGbox. Amplified fragments were sequenced and no mutations were found. The radiologic examination showed 3 cases with urogenital sinus and Müllerian derivatives. The histologic features of the gonads varied from only reduction in the tubular size to a streak gonad. These data emphasize the importance of an adequate hormone evaluation, including serum determination of AMH, in the investigation of XYGD; however, it must be kept in mind that histologic diagnosis, though essential, is not easy to be done.



**European Human Genetics
Conference 2000**

Amsterdam, the Netherlands
Saturday 27 May - Tuesday 30 May 2000

European Journal of Human Genetics

The Official Journal of the European Society of Human Genetics :

PROGRAMME AND ABSTRACTS

P-430

Two novel missense mutations in the SRY gene associated with 46,XY gonadal dysgenesis

Assumpcao, Juliana (1); Maciel-Guerra, A.T. (2); Guerra Jr., G. (3); Scolfaro, M.R. (3); De Mello, M.P. (1)
(1) Unicamp - Cbmeg, Campinas, Brazil; (2) Dept. Genetica Medica FCM- Unicamp, Campinas, Brazil; (3) Dept. Pediatria FCM Unicamp, Campinas, Brazil

Mutations in the sex-determining region of the Y chromosome (SRY gene) have been described to account for 10-15% of XY sex reversal cases. We studied a sample of 18 Brazilian patients presenting either complete or partial gonadal dysgenesis. Two previously unreported missense mutations were identified. The N65H mutation was found in a patient with pure gonadal dysgenesis and it is located in the HMG domain of the SRY. The R30I mutation was found upstream to the 5' border of the HMGbox in a patient with partial gonadal dysgenesis. This sequence variant was also present in the father and two other affected siblings. The occurrence of mosaicism in the father's gonads will be surveyed with the sequencing analysis of the remaining non affected siblings. We identified two novel mutations in the SRY gene, one of them being familial and located outside the HMG domain. Supported by: CNPq, FAEP-Unicamp E-mail: juli@obelix.unicamp.br

P-431

Functional analysis of promoter region of UFD1L, a gene involved in the DiGeorge syndrome (DGS)

Amati, Francesca (1); Conti, E. (1); Amicucci, P. (1); Botta, A. (1); Dallapiccola, B. (2); Novelli, G. (1)
(1) Università Tor Vergata, Roma, Italy; (2) Università La Sapienza, Roma, Italy

UFD1L is a gene deleted in all DGS patients and is downregulated by the helix-loop-helix transcription factor, dHAND. To identify the UFD1L promoter region we analysed (TRANSFAC and TFD databases) about 1000bp at its 5' region. This region contains potential transcription factor binding sites such as Sp1, TFIID, AP-2, CREB and E boxes; a TATA-like motifs was identified at -271bp. In human foetal brain the transcription start site was identified by a 5'-RACE assay using a reverse primer corresponding to UFD1L exon 2. We have cloned four different region (PT, TG, T, GC) in a promoterless vector, pEGFP-1 (Clontech). Each construct was cotransfected with a control plasmid (pCMV-bgal) in a human epithelial cell line; 48 hours after transfection the GFP fluorescence of each construct was measured by a FluoroCount Microplate Fluorometer. T was the construct with higher promoter activity (185% versus pEGFP-N1); then TG (182%) and G (172%). We performed a SSCP analysis of 15 DGS/VCS patients without apparent 22q11.2 deletion in order to identify SNPs of functional interest. This analysis revealed a polymorphism at -277bp (A/G) from the ATG. Functional analysis of the A/G allelic variants have not shown significant difference in the expression of the reporter gene. Work supported by Telethon grants (E.723 and 264bi).

P-432

Immunological and molecular analysis of congenital muscular dystrophies of 14 patients belonging to 11 Tunisian families

Louhichi, Nacim (1); Mezliou, M. (2); Triki, C. (3); Rouis, S. (1); Trigui, N. (1); Mhiri, C. (2); Ayadi, H. (1); Fakhfakh, F. (1)
(1) Faculté de Médecine, Sfax, Tunisia; (2) Service de Neurologie, C.H.U., Sfax, Tunisia; (3) Service de Neurologie, C.H.U., Sfax, Tunisia

Congenital muscular dystrophies (CMDs) are a heterogeneous group of disorders. Among these, the laminin alpha 2 chain 'merosin' deficient CMD is caused by mutations of the LAMA2 gene on chr 6q2 and Fukutin gene on chr 9q31. In order to identify families

affected with CMD with normal expression of merosin, 14 patients belonging to 11 Tunisian families were clinically and biologically investigated. Clinical examination of these patients included magnetic resonance imaging, electromyography and creatine kinase levels. Biological investigation included analysis of expression of muscular proteins with immunofluorescence (IF) technique and western blot analysis (WB). We used monoclonal antibodies against the two fragments of merosin (300Kda and 80Kda), dystrophin and dystrophin associated glycoproteins (DAG50 and DAG43). Our results showed four cases with total deficiency in merosin and in DAG50, and partial deficiency in DAG43. Seven patients showed a partial expression of merosin and normal expression of dystrophin, DAG50 and DAG43. Among the patients studied, three have not shown any deficiency with all the proteins analyzed. In conclusion, we identified three families affected with CMD with normal expression of merosin suggesting more genetic heterogeneity in the CMDs. Genetic analysis would be undertaken to exclude the LAMA2 and Fukutin genes.

P-433

Regulation of the LDL receptor-related protein (LRP)-mRNA expression by the adipocyte-produced hormone Leptin in human cells

Schulz, Susanne (1); Birkenmeier, G. (2); Schagdarsurengin, U. (1); Schnürer, C. (3); Archouk, E. (1); Greiser, P. (1); Müller-Werdan, U. (3); Werdan, K. (3); Wenzel, K. (4); Gläser, C. (1)
(1) Martin-Luther-Universität, Halle, Germany; (2) Institute of Biochemistry, Leipzig, Germany; (3) Dept. of Internal Medicine III, Halle, Germany; (4) Max-Delbrück-Center, Berlin, Germany

The LRP has a variety of ligands which are involved in the lipid metabolism, modification of the fibrinolytic potential, platelet aggregation, SMC growth as well as angiogenesis. Methods: We investigated the effect of Leptin, an adipocyte-produced hormone, on LRP-mRNA expression in human cells. For our study we used the cell lines Mono-Mac-6 (monocytes), HaCaT (keratinocytes), as well as cultured endothelial cells from umbilical cord vein, and fibroblasts from chorion and skin. The cells were cultured corresponding to standard protocols for up to 7 passages. Before harvesting the confluent cells were treated with 100ng/ml Leptin for 24 hours. As controls we used cultured cells without any treatment. After immediate RNA isolation the LRP-mRNA expression was determined by means of a competitive RT-PCR. Results: In general we found an upregulation of LRP-mRNA expression in all cells treated with Leptin compared with untreated ones. However the factor of upregulation ranged from 1.1 (keratinocytes), 1.2-1.6 (fibroblasts), 1.6 (monocytes) to 2.1 for endothelial cells. Considering the different biological functions of this variety of cell types a specific regulation of LRP should be intelligible. Our results suppose for the first time the thesis that LRP could be an essential factor involved in the development of obesity.

P-434

Urofacial syndrome in a non consanguineous French family

Voelckel, Marie-Antoinette (1); Chauve, X. (1); Pedellier, K. (1); Girardot, L. (1); Malzac, P. (1); Philipp, N. (1)
(1) Hôpital d'Enfants de la Timone, Marseille, France

Since its initial description by Elejalde (1979), the urofacial syndrome (UFS) or Ochoa syndrome has been reported mainly in patients of Colombian lineage. The gene has been mapped on 10q23-q24 by homozygosity mapping (Wang et al 1997). In a recent issue, Wang et al (1999) reported two American families with a common Irish heritage. Here, we report the first European cases of UFS. Two brothers born from healthy unrelated French parents, exhibited the typical manifestation of UFS. Both parents were from the same geographical area (East of France), but they denied

Hormone Research

*International Journal of
Experimental and
Clinical Endocrinology*

Abstracts

39th Annual Meeting of the

European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE)

Brussels, Belgium, 17-19 September, 2000

Guest Editor:

Marc Maes, Brussels (Belgium)

S. Karger
Medical and Scientific
Publishers
Basel • Freiburg
Paris • London
New York • New Delhi
Bangkok • Singapore
Tokyo • Sydney



Online

Access to full text and tables of contents,
including tentative ones for forthcoming issues:
www.karger.com/journals/hre/hre_bk.htm

P1-303 Sex Differentiation

Morphometry and Histology of Gonads from 13 Children with Dysgenetic Male Pseudohermaphroditism

M.R. Scalfaro¹; I.A. Cardinalli¹; J.G. Assumpção¹; M.P. Mello¹; E.G. Stuchi-Perez¹; M.T.M. Baptista¹; A.T. Maciel-Guarra¹; G. Guerra Júnior¹; Introduced by M. Boguszewski¹
¹State University of Campinas, São Paulo, Brazil

Dysgenetic male pseudohermaphroditism (DMP) is a disorder of sexual differentiation characterized by bilateral dysgenetic testes, persistent Müllerian structures, and cryptorchidism in 46,XY subjects. However, the histologic diagnosis of DMP is not well defined. **Objective:** To study gonadal histology in children with DMP. **Patients and Methods:** 13 patients with DMP were evaluated in our service (1995-1998). The diagnosis of DMP was suspected based on a 46,XY karyotype, sex ambiguity, high FSH, low AMH, decreased testosterone response to hCG stimulation, without accumulation of testosterone precursors, and presence of Müllerian structures. Genomic DNA samples from each patient and normal male and female controls were used as templates to amplify by PCR the SRY-HMGbox and no mutations were found. Twenty-two of the 26 gonads were biopsied, and histology was investigated by means of stereology and conventional microscopy (age range: 3 months to 9 years). Our results were compared with the normal data published in the literature. **Results:** The 26 gonads were out of the labioscrotal folds. The histologic features of the gonads varied from only reduction in the tubular size to a streak gonad. Only 5 of the 22 gonads grossly resembled streak gonads. The mean tubular diameter was severely reduced (more than 30% reduction relative to normal for the age) in 4 gonads, markedly (between 10 and 30%) in 11, slightly (up to 10%) in one, and normal in one gonad. The tubular fertile index (% of tubular profiles containing germ cells) was severely reduced (less than 30) in 8 gonads, markedly (between 50 and 30) in 2, and normal in 7 gonads. The number of Sertoli cells per tubular profile was elevated in 16 gonads and normal in one. Thin tubules surrounded by fibrous tissue were occasionally observed. **Conclusion:** The histologic findings of patients with DMP are variable. As a consequence, a careful morphometric evaluation may be necessary to establish the diagnosis.

P2-304 Sex Differentiation

Persistent Müllerian Duct Syndrome (PMDS) with Testicular Dysfunction in a Pakistani Family

J. Raza¹; C. Belville²; J.Y. Picard²; Introduced by C.G.D. Brook¹
¹National Institute of Child Health, Karachi, Pakistan; ²INSERM, Montrouge, France

The presence of uterine structure in a phenotypic male is observed in the rare form of male pseudohermaphroditism known as PMDS. All these patients are virilized at birth and nearly all have a normal testosterone production and a functional testicular tissue. Three patients have earlier been reported to suffer from testicular degeneration along with PMDS. We describe a Pakistani family with two siblings with PMDS along with poor testicular function. The index case was the first child of healthy unrelated parents. He was first seen at a Karachi hospital at the age of 8 months with large left inguinal hernia which on exploration had müllerian structure and crossed testis which was corrected. His karyotype was 46,XY. Laparotomy at 3 years of age for removal of müllerian structure was performed on which right testis was found atrophic and removed but left testis was found well positioned in the scrotum. The left testis was later found to be "ascended". The testosterone response to HCG at that time showed a moderate rise. The left testis was brought down at the age of 10 years but there was no spontaneous induction of puberty and no testosterone rise following HCG on two occasions. The 2nd sib now 5 years old had bilateral cryptorchidism. An attempted orchidopexy revealed an atrophic right testis, which was removed, and a small left testis, which was repositioned. No attempt was made to look for any müllerian structure and none was reported found. A molecular analysis for the family has shown that the two brothers are homozygous for a new mutation in the anti-müllerian hormone (AMH) gene. There is G to A transition at the position 311 at the end of first exon leading to Glycine to Arginine change at amino acid 101. The parents were heterozygous for the same mutation. AMH serum concentration was undetectable.

P2-305 Sex Differentiation

Agnesis of the Penis - Not an Endocrinological Problem

D. Berg¹; E. Korsch¹
¹Children's Hospital of Cologne, Köln, Germany

Introduction: An endocrinological workup and extensive testicular function testing of a prepubertal boy with agnesis of the penis is presented. Penile agnesis is a rare anomaly, the estimated incidence is 1 in 10-30 million births. It is frequently associated with other congenital malformations, especially of the genitourinary tract. Approximately 75 cases of penile agnesis are described, but only very little information but endocrinological implications of the malformation are published. Bilateral orchiectomy and consequent female sex assignment shortly after birth are recommended by most authors. **Case Report:** Our patient did not undergo surgery and was raised as a boy. He had a history of ureterocystostomy at the age of 13 months secondary to IV² vesicoureteric reflux, medical follow-up was lost at the age of 2. He was referred to our hospital at the age of 12.3 with the question for endocrinological work up. At time of presentation we saw an obese prepubertal boy (BMI 31.9 kg/m²) with no obvious phallus. Small testes (volume 1 ml) were palpable in a shriveled scrotum with a median raphe. Tanner Ph1, Ax1, B1 (lipogynecomastia). The urethral orifice was found on the perineum between the scrotum and the anal sphincter, ventral to the urethral opening a small skin tag was present. There were complaints of enuresis, but during daytime the boy was continent. The psychological evaluation demonstrated that the patient was well adapted to his role as a boy. The karyotype was 46,XY. Serum levels for 17-OH-progesterone, DHEAS, E2, IT4 and TSH were within the normal range. Endocrinological function testing (GnRH-Test, HCG-Test, Stimulation-Test) revealed neither pathological basis serum levels for FSH, LH, Testosterone, DHT or SHBG nor a pathological answer after stimulation. The patient had a normal antimüllerian hormone and inhibin B level for his age group. Genital skin fibroblasts showed normal 5 α -reductase activity and normal androgen receptor binding capacity. **Conclusion:** Our results show clearly that there is apparently no endocrinological problem in patients of agnesis of the penis, especially Leydig-cell function and and Sertoli cell function seem to be normal.

P2-306 Sex Differentiation

Different Molecular Mutations of 4 Patients with 5 α -Reductase Deficiency from Unrelated Turkish Families

G. Öcal¹; P. Adıyaman¹; M. Beberoglu¹; A. Uysal¹; E. Cetinkaya¹; N. Akar¹

¹Department of Pediatric Endocrinology, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey

Objectives: A variety of different underlying mutations 5 α -steroid reductase 2 gene (5 α SR2) have been documented in different families and ethnic background. The majority of these are missense or nonsense mutations, giving rise to nonfunctional or subfunctional protein. Here we present the molecular and clinical characteristics of four 46,XY patients with 5 α SR2 deficiency from unrelated Turkish families. **Patient Characteristics:** The genomic DNA of the patients and their parents (except KS) were sequenced after PCR/SSCP amplification of 5 exons of 5 α SR2 gene (Inserm, Montpellier France). They were being raised as a girl. Patient NY (at 7 months of age), SY (at 7 years of age) and KY (at 8 months of age) presented for evaluation of bilateral inguinal masses. The fourth affected patient FG was referred at age 17 year because of pubertal virilization, primary amenorrhea and failure of breast development. He had a large pedigree of individuals with MPH born with ambiguous female external genitalia and reared as girls until puberty, when masculinization occurred, followed by a change of gender role. A homozygous point mutation in exon 1 (Leu 55 Gln) was identified. His father was heterozygous and his mother was homozygous carrier for this mutation. Patient KY was compound heterozygote who had two mutations. One of them was Leu 55 Gln in exon 1 (like patient FG) and the second was Arg 171 Ser in exon 3. His parents couldn't be evaluated. Patient NA's mutation was previously first reported by Boudon CH et al (1995). A trinucleotide straddling codons 156 and 157 responsible for a methionized residue deletion at position 157 (exon 3, Δ Met 157). His parents were heterozygous for this previously undescribed mutation. As also presence in additional 2 Turkish patients which were reported by Hori O (1996) and Walden V (1998) with this rare deletion is suggesting the increased prevalence in Turkish population. Patient SY was a homozygote and their parents were heterozygote for splice junction abnormality of 5 α SR2 gene in which intron 1 at position 2 of acceptor splice site. **Conclusion:** 5 α SR2 gene mutation analyses (especially Leu 55 Gln in exon 1 and Δ Met 157 in exon 3) must be evaluated in Turkish patients with MPH.

Evaluation of the Tubular and Interstitial Functions of the Testis in 46,XY Patients with Ambiguous Genitalia

Eliana Gabas Stuchi-Perez¹, Céline Lukas-Croisier², Margaret De Castro¹, Maria Tereza Matias Baptista¹, Márcia Ribeiro Scolfaro¹, Antonia Paula Marques-De-Faria¹, Christine Hackel¹, Andréa Trevas Maciel-Guerra¹ and Gil Guerra Júnior¹

¹Interdisciplinary Group for the Study of Sex Determination and Differentiation, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, São Paulo, Brazil and ²Unité de Recherches sur l'Endocrinologie du Développement, INSERM, École Normale Supérieure, Montrouge, France

ABSTRACT

Investigation of the origin of sexual ambiguity is complex. Although testicular function has traditionally been assessed only by examining the steroidogenic capacity of Leydig cells and spermatogenesis, it has recently been shown that the measurement of serum anti-Müllerian hormone (AMH) as a marker of Sertoli cell function may also help clinicians. The aim of this study was to evaluate both Leydig and Sertoli cell functions in 46,XY patients with intersex states in order to establish biochemical patterns that would help to reach an etiologic diagnosis. We measured serum androgens, AMH and gonadotropins in 24 patients with sexual ambiguity and XY karyotype: 8 with gonadal dysgenesis (GD), 3 with 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency (3 β HSD), 5 with androgen insensitivity syndrome (AIS), 4 with 5 α -reductase 2 (SRD5A2) deficiency, and 4 were of unknown origin or idiopathic. Our results showed that while testosterone was low and gonadotropins elevated in patients with either GD or 3 β HSD, AMH was low in the former and high in the latter. Serum AMH and gonadotropins were normal or high in patients with 3 β HSD or AIS, but these could be distinguished by testosterone levels. Serum testosterone and gonadotropins were normal or

high in AIS and SRD5A2 deficiency patients; however, while AMH was elevated in AIS, it was not the case in SRD5A2 deficiency patients, indicating that testosterone is sufficient to inhibit AMH within the testis. In idiopathic cases gonadotropins and testosterone were normal, and AMH was normal or low. We conclude that the combined measurement of androgens, AMH and gonadotropins helps to establish the diagnosis in intersex patients.

KEY WORDS

androgen insensitivity, anti-Müllerian hormone, gonadal dysgenesis, intersex, Leydig cell, puberty, 5 α -reductase deficiency, Sertoli cell, testis, testosterone

INTRODUCTION

Disorders of sexual differentiation are heterogeneous, and include anomalies of gonadal determination (true hermaphroditism and gonadal dysgenesis) and male and female pseudohermaphroditism. Defects in androgen synthesis, metabolism, or action are frequently involved in 46,XY male pseudohermaphroditism. If the defective steroidogenic enzyme is also involved in adrenal steroid synthesis, the signs of adrenal dysfunction usually indicate the diagnosis. In the case of complete defects of enzymes specifically implicated in testosterone synthesis (e.g. cytochrome P450 17-20 desmolase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase) or complete androgen insensitivity, the entirely female aspect of the external genitalia together with an XY karyotype are decisive for the diagnosis.

Reprint address:
Dr. Gil Guerra Júnior
Departamento de Pediatria
FCM, UNICAMP
CP 6111, Campinas, São Paulo, Brasil
CEP 13083-970
e-mail: gilguer@bestway.com.br

VOLUME 13, NO. 6, 2000

605

However, the differential diagnosis is more difficult among intersex patients due to partial testicular dysgenesis, partial deficiency of testosterone synthesis or action, or 5 α -reductase type 2 dysfunction.

Testicular function has traditionally been assessed by examining the steroidogenic capacity of Leydig cells and spermatogenesis; it has recently been shown that the function of immature Sertoli cells can be assessed by measuring serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels^{1,4}. Moreover, AMH levels, which are downregulated by androgens, were shown to be a good marker of testosterone action within the testis: AMH is elevated in androgen-insensitive patients during the first year of life and puberty⁵.

The purpose of this study was to evaluate both Leydig and Sertoli cell functions, by the assessment of gonadotropins, androgen and AMH serum levels, in patients with intersex states and XY karyotype and to analyze whether this would help in the quest for the etiological diagnosis.

PATIENTS AND METHODS

Twenty-four patients with 46,XY karyotype and ambiguous genitalia⁶ were admitted to our service, the Interdisciplinary Group for the Study of Sex Determination and Differentiation (GIEDDS) at the University Hospital of the State University of Campinas, SP, Brazil, from May, 1996 to May, 1998. This study had the approval of the Ethics Committee of the University Hospital.

Age at first consultation ranged from 15 days to 16 years. The initial sex assignment was male in 21 patients, and female in three (Table 1, patients # 16, 19 and 20). Family history of sexual ambiguity was found only in patients # 9 and 10, who were brothers. One patient (# 8) had a personal history of unilateral Wilms's tumor and renal failure. No consanguinity was registered. Table 1 also shows the equivalent Prader grade of sexual ambiguity⁷, the appearance of the urogenital sinus (confirmed by a retrograde contrast study), the presence of Müllerian derivatives (confirmed by pelvic ultrasonography and laparoscopy), gonadal position, and gonadal histology when performed.

Routine hormonal measurements were performed by radioimmunoassay, including basal

levels of LH, FSH, total testosterone, dihydro testosterone (DHT), androstenedione (A- Δ 4) and dehydroepiandrosterone (DHEA). In early infancy (first 6 months of age, a period when the values in normal children are elevated because the hypothalamic-pituitary-gonadal axis is transiently activated) and pubertal patients, hormone levels were assayed only in baseline blood samples. Patients above 6 months of age and with no pubertal signs also received injections of hCG (Profasi hp[®]; Serono 2000 IU, i.m., given daily for three successive days) and the levels of testosterone, DHT, A- Δ 4 and DHEA were determined 24 hours after the last injection. A testosterone increment greater than 1.0 ng/ml was considered normal.

The diagnosis of XY gonadal dysgenesis (GDY) was based on the absence of increment of testosterone levels after 3 days of hCG stimulation without accumulation of testosterone precursor, elevated levels of FSH, and characteristic histological findings.

The diagnosis of defect in testosterone biosynthesis was based on poor increment of testosterone levels after hCG test, an abnormal ratio between serum concentrations of testosterone precursors after hCG stimulation, or elevated level of testosterone precursor after acute ACT stimulation test (i.v. administration of 0.25 mg synthetic ACTH).

The patients with AIS showed no or only minor change in the stretched length and width of the penis after 3 months of administration of testosterone (50 mg i.m. each month), had elevated LH, elevated testosterone before or after hCG test, and moderate elevation of testosterone-to-dihydrotestosterone ratio (T/DHT) (between 20 and 40).

Laboratory diagnosis of SRD5A2 deficiency was obtained from a very high T/DHT ratio (greater than 40) after administration of hCG in prepubertal patients. The pubertal patients had a basal elevated T/DHT ratio, without gynecomastia and prostate.

The diagnosis of idiopathic cases was based on normal testosterone levels after hCG test, testosterone precursors, gonadotropins and T/DHT ratio.

Serum AMH was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using antibodies raised against human recombinant AMH in the laboratory of the Unité de Recherches

TABLE 1

Clinical, radiological and histological findings of the 24 patients with ambiguous genitalia

Pt	Age ¹	Prader grade ²	UGS	Internal genitalia ³	Gonadal histology	Gonadal position
1	10m	GIV	-	R: uterus + tube	R: DG L: RT	R and L: P
2	1y8m	GIII	-	R: uterus + tube	R: DG L: RT	R: P L: IR
3	3y9m	GIV	-	-	R and L: RT	R and L: IR
4	5y4m	GIII	+	L: uterus + tube	R: RT L: DG	R: IR L: P
5	5y8m	GIII	-	-	R and L: RT	R and L: IR
6	5y10m	GIII	-	-	R: RT L: Anorchia	R: IR
7	10y G1PI	GIV	-	utricule GIII	R and L: RT	R and L: IR
8	1y9m	GIV	+	rudimentary uterus	R and L: RT	R and L: P
9	3y4m	GIII	-	utricule GIII	NP	R and L: LSF
10	5y3m	GIII	-	-	NP	R and L: LSF
11	7y GIIPIII	GIII	-	-	NP	R and L: LSF
12	6m	GIII	-	utricule GIII	NP	R and L: LSF
13	1y1m	GIII	+	-	NP	R and L: LSF
14	3y6m	GIII	-	-	NP	R and L: IR
15	8y7m	GIV	-	-	NP	R and L: IR
16	13y BIIPI	F ⁴	+	-	NP	R and L: IR
17	0.5m	GIII	-	utricule GIII	NP	R and L: LSF
18	5m	GIII	-	utricule GIII	NP	R and L: LSF
19	10m	GIII	-	-	NP	R and L: IR
20	16y GIIPIII	GIII	-	-	NP	R and L: LSF
21	4y1m	GIV	-	-	normal testes	R and L: IR
22	4y2m	GIV	-	-	normal testes	R and L: IR
23	6y1m	GIV	-	-	normal testes	R and L: IR
24	7y4m	GIV	-	-	normal testes	R and L: IR

¹ Stages of breast (B), genital (G) and pubic hair (P) development according to Marshall & Tanner⁵.² Degrees of sexual ambiguity according to Prader.³ The degree of enlargement of the prostate utricule was classified according to Ikoma *et al.*⁶⁴ Female external genitalia with gonads palpable on inguinal region.

UGS = urogenital sinus; R = right side, L = left side, DG = dysgenetic gonad, RT = rudimentary testis.

NP = not performed; P = pelvic, IR = inguinal region, LSF = labiscrotal folds.

l'Endocrinologie du Développement (INSERM), Montrouge, France. Serum AMH levels in control male subjects from birth to adulthood are shown in Table 2¹¹.

TABLE 2
Serum anti-Müllerian hormone (AMH) in normal males

Age group	n	AMH (pmol/l)	
		Mean $\pm$ SEM	Range
< 15 days	6	229 $\pm$ 59	76-381
15 days - 1 yr	22	465 $\pm$ 93	251-679
1.01 - 4 yr	17	499 $\pm$ 66	360-638
4.01 - 7 yr	16	438 $\pm$ 61	309-566
7.01 - 9 yr	14	336 $\pm$ 47	234-438
> 9 yr ¹			
I	22	249 $\pm$ 26	194-304
II	25	159 $\pm$ 25	107-211
III	8	79 $\pm$ 28	12-145
IV - V	8	48 $\pm$ 14	14-81
Adult	21	30 $\pm$ 4	22-38

¹ Pubertal stages according to Marshall & Tanner⁸.

RESULTS

Results of hormonal studies are shown in Tables 3 and 4. In eight patients there was an anomaly of gonadal differentiation, including one patient with Denys-Drash syndrome. The other 16 patients were male pseudohermaphrodites due to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency (3 β HSD, n=3), androgen insensitivity syndrome (AIS, n=5), 5 α -reductase type 2 deficiency (SRD5A2D, n=4), or idiopathic cases (n=4).

Patients with GD (# 1-8) had normal LH but high FSH levels (LH/FSH $\leq$ 0.3), prepubertal testosterone levels that did not respond to hCG stimulation, without testosterone precursors increment, and normal T/DHT ratio. One of these patients (# 8) had Denys-Drash syndrome (DDS), with an association of 46,XY sexual ambiguity, Wilms's tumor and initial renal failure.

Patients with a deficiency in testosterone synthesis due to 3 β HSD (# 9-11) had high LH but normal FSH levels (LH/FSH > 2); testosterone production response to hCG was poor, and DHEA was very high (basal and after ACTH stimulation test), without accumulation of A- Δ 4. One patient (# 11) showed precocious puberty: penile length 7 cm, pubarche grade III⁸, without testicular enlargement (bilateral volume 4 ml).

Patients with AIS (# 12-16) had elevated LH and normal to high FSH (LH/FSH > 2), normal testosterone before or after hCG test, and a moderate elevation of T/DHT ratio (20-40). One patient (# 16) showed female external genitalia with palpable gonads in the inguinal region, and female puberty with breasts grade III⁸, without pubarche, with enlargement of gonads (bilateral volume of 12 ml). This patient had a complete form of androgen insensitivity syndrome (CAIS).

In patients with SRD5A2 deficiency (# 17-20), gonadotropins and basal and hCG-stimulated testosterone levels were within normal values, but the T/DHT ratio was abnormally elevated after the hCG test (> 40). One patient (# 20) showed a male puberty, with enlargement of penis and testes (bilateral volume 10 ml), pubarche grade III⁸, without gynecomastia and prostate.

In idiopathic patients (# 21-24), gonadotropins, testosterone and T/DHT ratio were within normal levels.

Serum AMH showed a clearly dimorphic pattern: it was low in intersex states due to gonadal dysgenesis and normal to elevated in defects of testosterone synthesis and androgen insensitivity. The pubertal patients with these disorders had the most elevated serum AMH. Patients with deficiency of 5 α -reductase activity were an exception among male pseudohermaphrodites, since serum AMH was not elevated (Table 3).

DISCUSSION

In 46,XY patients with ambiguous genitalia, multiple etiologies can account for the disorder, including defects of testicular differentiation and abnormal androgen synthesis, metabolism or action. Hormonal studies are mandatory in the procedure followed to establish an etiologica

JOURNAL OF PEDIATRIC ENDOCRINOLOGY & METABOLIS

TABLE 3

Hormonal measurements of the 24 patients with ambiguous genitalia

Pt	Age ¹	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	LH/FSH	TT (ng/ml)	DHT (ng/ml)	T/DHT	Diagnosis
1	10m	0.7	4.7	0.1	AS: <0.1	AS: 0.02	5	GD
2	1y8m	0.6	4.5	0.1	AS: <0.1	AS: 0.02	5	GD
3	3y9m	0.5	3.5	0.1	AS: <0.1	AS: 0.02	5	GD
4	5y4m	0.7	3.9	0.2	AS: <0.1	AS: 0.02	5	GD
5	5y8m	0.4	2.4	0.2	AS: <0.1	AS: 0.02	5	GD
6	5y10m	0.9	3.3	0.3	AS: <0.1	AS: 0.02	5	GD
7	10y GIIPI	0.6	4.7	0.2	AS: <0.1	AS: 0.02	5	GD
8	1y9m	0.8	5.0	0.2	AS: 0.7	AS: 0.04	17	GD-DDS
9	3y4m	2.3	0.7	3.3	AS: 0.3	AS: 0.02	15	3 β HSD
10	5y3m	1.9	0.8	2.4	AS: 0.2	AS: 0.02	10	3 β HSD
11	7y GIIPIII	4.2	0.5	8.4	AS: 0.7	AS: 0.05	14	3 β HSD
12	6m	8.6	4.1	2.1	B: 1.8	B: 0.05	36	PAIS
13	1y1m	4.2	1.5	2.8	AS: 1.8	AS: 0.05	36	PAIS
14	3y6m	2.8	0.4	7.0	AS: 2.2	AS: 0.06	37	PAIS
15	8y7m	3.5	1.2	2.9	AS: 1.5	AS: 0.04	37	PAIS
16	13y BIIPI	7.9	3.7	2.1	B: 5.5	B: 0.15	37	CAIS
17	0.5m	1.9	1.5	1.3	B: 1.9	B: 0.02	95	SRD5A2D
18	5m	1.1	0.5	2.2	B: 2.2	B: 0.03	74	SRD5A2D
19	10m	3.3	3.9	0.8	AS: 2.6	AS: 0.04	65	SRD5A2D
20	16y GIIPIII	4.3	4.8	0.9	B: 4.9	B: 0.06	82	SRD5A2D
21	4y1m	0.7	0.4	1.7	AS: 1.5	AS: 0.09	16	idiopathic
22	4y2m	0.5	0.3	1.7	AS: 1.5	AS: 0.09	16	idiopathic
23	6y1m	0.8	0.1	1.8	AS: 1.6	AS: 0.09	17	idiopathic
24	7y4m	0.7	0.8	0.9	AS: 1.5	AS: 0.08	18	idiopathic

¹ Stages of breast (B), genital (G) and pubic hair (P) development according to Marshall and Tanner⁵.

TT = total testosterone, DHT = dihydrotestosterone, B = basal, AS = after hCG stimulation test.

GD = gonadal dysgenesis, DDS = Denys-Drash syndrome, 3 β HSD = 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency, PAIS = partial androgen insensitivity syndrome, CAIS = complete androgen insensitivity syndrome, SRD5A2D = 5 α -reductase type 2 deficiency.

Normal values: Basal LH: prepubertal: 0.6-1.0; pubertal: 0.8-8.7.

Basal FSH: prepubertal: 0.1-1.4; pubertal: 0.6-4.9.

Basal total testosterone: prepubertal: < 0.1-0.7; adult male: 2.2-18.0.

T/DHT < 20 = normal; T/DHT > 40 = elevated.

TABLE 4

Serum anti-Müllerian hormone and testosterone precursors of the 24 patients with ambiguous genitalia

Pt	Age ¹	Basal DHEA (ng/ml)	basal A-Δ4 (ng/ml)	DHEA after 60' ACTH test (ng/ml)	AMH (pMol/l)	AMH in relation to mean and SEM of normal males	Diagnosis
1	10m	1.6	<0.1	NP	91	below -2	GD
2	1y8m	0.5	<0.1	NP	70	below -2	GD
3	3y9m	2.6	<0.1	NP	186	below -2	GD
4	5y4m	2.3	<0.1	NP	22	below -2	GD
5	5y8m	3.4	0.3	NP	25	below -2	GD
6	5y10m	0.5	<0.1	NP	72	below -2	GD
7	10y GIP1	6.0	0.4	NP	52	below -2	GD
8	1y9m	3.1	0.2	NP	196	below -2	GD-DDS
9	3y4m	10.5	<0.1	45.5	436	between M and -1	3βHSD
10	5y3m	11.5	<0.1	48.5	511	between M and +1	3βHSD
11	7y GIIPIII	30.0	<0.1	>100.0	503	above +2	3βHSD
12	6m	NP	NP	NP	468	between M and +1	PAIS
13	1y1m	NP	NP	NP	538	between M and +1	PAIS
14	3y6m	NP	NP	NP	439	between M and -1	PAIS
15	8y7m	NP	NP	NP	472	above +2	PAIS
16	13y BIIPI1	NP	NP	NP	996	above +2	CAIS
17	0.5m	NP	NP	NP	139	between -1 and -2	SRD5A2D
18	5m	NP	NP	NP	292	between -1 and -2	SRD5A2D
19	10m	NP	NP	NP	64	below -2	SRD5A2D
20	16y GIIPIII	NP	NP	NP	16	below -2	SRD5A2D
21	4y1m	NP	NP	NP	464	between M and +1	idiopathic
22	4y2m	NP	NP	NP	428	between M and -1	idiopathic
23	6y1m	NP	NP	NP	353	between -1 and -2	idiopathic
24	7y4m	NP	NP	NP	382	between M and -1	idiopathic

¹Stages of breast (B), genital (G) and pubic hair (P) development according to Marshall and Tanner⁸.

GD = gonadal dysgenesis. DDS = Denys-Drash syndrome. 3βHSD = 3β-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. PAIS = partial androgen insensitivity syndrome. CAIS = complete androgen insensitivity syndrome. SRD5A2D = 5α-reductase type 2 deficiency. NP = not performed.

Normal values: Basal A-Δ4: prepubertal: 0.1-0; pubertal: 0.4-1.9.

Basal DHEA: prepubertal: 0.1-8.0; after 60' ACTH test: < 20.0.

diagnosis. Molecular studies usually confirm the origin of the disorder, but since they are cost- and time-consuming, it would be impossible to examine all genes known to be implicated in sexual differentiation; therefore, a careful and complete clinical examination and laboratory studies should be carried out in order to guide the diagnosis.

Classically, testosterone and gonadotropin levels have been studied in intersex patients to evaluate testicular function. In this study, we also analyzed serum AMH, as a marker of prepubertal Sertoli cell function, in order to see whether this would help in determining the diagnosis. Our results are summarized in Table 5.

Low serum testosterone may be indicative of both testicular dysgenesis and defects of steroid synthesis due to mutations in one of the steroidogenic enzymes. FSH may be elevated in the former and LH in the latter, but they may both be within the normal range, mainly after the first year of life and before puberty. Serum AMH is low in testicular dysgenesis and normal or elevated in testosterone synthesis disorders. Therefore, the combined analysis of serum testosterone after hCG, AMH and gonadotropins seems to give a more comprehensive picture of testicular function in intersex patients.

A similar conclusion applies when comparing patients with testosterone synthesis defects and androgen insensitivity. In this case, serum AMH is always elevated, indicating that Sertoli cell secreting function is not affected; furthermore, it reflects the absence of normal androgen action¹. Gonadotropins may be elevated in the first months after birth but seem to be normal afterwards.

Normal androgen levels indicate that Leydig cell secretory function is preserved in AIS, while low testosterone production with altered serum sex steroid ratios indicate an abnormal steroidogenic function.

Another disorder characterized by sexual ambiguity in 46,XY patients with normal to high testosterone and gonadotropin levels is 5 α -reductase type 2 deficiency. Testosterone needs to be metabolized to the more potent androgen DHT in order to virilize the external genitalia, which normally express 5 α -reductase type 2. When the gene encoding this enzyme is affected, the fetus is incompletely virilized, though at puberty the high amounts of testosterone produced by the testes are transformed to DHT by the type 1 isoform of 5 α -reductase expressed in non-genital tissues¹². The diagnosis of this disorder is sometimes difficult, and cannot be ruled out only by a lack of an elevated T/DHT ratio. In our four patients with confirmed SRD5A2 deficiency, gonadotropin and testosterone serum levels were normal, thus not allowing a differential diagnosis from androgen insensitivity. However, serum AMH was not elevated as in the latter, which also indicates that intratesticular testosterone does not need to be transformed to dihydrotestosterone to modulate AMH expression by Sertoli cells.

In the idiopathic cases, gonadotropins, testosterone and T/DHT ratio were within the normal range, while serum AMH was normal or low, in accord with values given in the literature¹³. These results in a small number of patients would suggest that the serum AMH assay would be useful to distinguish between AIS and SRD5A2 deficiency.

TABLE 5

Summarized results of the hormonal evaluation of the 24 patients with ambiguous genitalia

	LH/FSH ratio	Testosterone	AMH
Gonadal dysgenesis	Normal or ↓	↓	↓
3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase deficiency	Normal or ↑	↓	↑
Androgen insensitivity syndrome	Normal or ↑	Normal or ↑	Normal or ↑
5 α -Reductase type 2 deficiency	Normal or ↑	Normal or ↑	↓
Idiopathic cases	Normal	Normal	Normal or ↓

in intersex patients with normal testosterone production, mainly in those patients in whom peripheral transformation of testosterone to DHT due to 5 α -reductase type 1 masks the diagnosis.

To the best of our knowledge, a combined analysis of serum T/DHT levels together with AMH levels has not been previously reported in patients with deficiency of 5 α -reductase type 2. These AMH results are similar those reported in a recent publication by Rey *et al.*¹¹ using a commercial kit to measure serum AMH in 107 patients with intersex disorders, but in that paper there were no data about patients with 5 α -reductase type 2 deficiency.

We conclude that the combined use of a serum marker of tubular function, such as AMH, together with serum gonadotropins and testosterone, enhances the determination of the pathogenesis of intersex states with 46,XY karyotype, confirming the prediction¹⁴ that serum AMH determination will be of great help in pediatric endocrinology when the assay becomes more widely available.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to express our sincere gratitude to Dr. Rodolfo Rey for his expert technical guidance, continuous support, comments and constructive criticism of the manuscript. We also thank staff members of the Unit of Diagnostic Imaging, Department of Pediatric Surgery of the University Hospital of UNICAMP; Dr. Izilda Cardinalli for histological evaluation of the gonads, and the Cytogenetics Laboratory, Medical Genetics Department of the Faculty of Medical Sciences of UNICAMP.

REFERENCES

1. Rey RA, Al-Attar L, Louis F, Jaubert F, Barbet P, Nihoul-Fékété C, Chaussain JL, Josso N. Testicular dysgenesis does not affect expression of anti-Müllerian hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. *Am J Pathol* 1996; 148: 1689-1698.
2. Rey RA, Josso N. Regulation of testicular anti-Müllerian hormone secretion. *Eur J Endocrinol* 1996; 135: 144-152.
3. Lee MM, Donahoe PK, Gustafson ML, Chang YC, MacLaughlin DT. Measurements of serum Müllerian inhibiting substance in the evaluation of children with nonpalpable gonads. *N Engl J Med* 1997; 22: 1480-1486.
4. Josso N. Pediatric applications of anti-Müllerian hormone research. 1992 Andrea Prader Lecture. *Horm Res* 1995; 43: 243-248.
5. Rey RA, Mebarki F, Forest MG, Mowszowics I, Cate RL, Morel Y, Chaussain JL, Josso N. Anti-Müllerian hormone in children with androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 960-964.
6. Danish PK. Intersex problems in the neonate. *Indian J Pediatr* 1982; 49: 555-575.
7. Prader VA. Der genitalbefund beim pseudohermaphroditismus femininus des kongenitalen adrenogenitalen syndroms. *Helv Paediatr Acta* 1954; 9: 231-248.
8. Marshall WA, Tanner JM. Variation in pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 1969; 44: 291-303.
9. Ikoma F, Shima H, Yabumoto H. Classification of enlarged prostatic utricle in patients with hypospadias. *Br J Urol* 1985; 57: 334-337.
10. Carré-Eusebe D, Imbeaud S, Harbison M, New MI, Josso N, Picard JY. Variants of the anti-Müllerian hormone gene in a compound heterozygote with the persistent Müllerian duct syndrome and his family. *Hum Genet* 1992; 90: 389-394.
11. Rey RA, Belville C, Nihoul-Fékété C, Michel-Calemard L, Forest MG, Lahlou N, Jaubert F, Mowszowics I, David M, Saka N, Bouvattier C, Bertrand M, Lecointre C, Soskin S, Cabrol S, Crosnier H, Léger J, Lortat-Jacob S, Nicolino M, Rabl W, Toledo SPA, Bas F, Compel A, Czernichow P, Chatelain P, Rappaport R, Morel Y, Josso N. Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum anti-Müllerian hormone measurement. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 627-631.
12. Thigpen AE, Silver RJ, Guileyardo JM, McConnell JD, Russell DW. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 α -reductase isoenzyme expression. *J Clin Invest* 1993; 92: 903-910.
13. Josso N, Legai L, Forest MG, Chaussain JL, Brauner R. An enzyme linked immunoassay for anti-Müllerian hormone: a new tool for the evaluation of testicular function in infants and children. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 23-27.
14. Forest MG. Serum Müllerian inhibiting substance assay - a new diagnostic test for disorders of gonadal development. *N Engl J Med* 1997; 336: 1519-1521.

Morphometry and Histology of Gonads From 13 Children With Dysgenetic Male Pseudohermaphroditism

Márcia Ribeiro Scolfaro, MD; Izilda Aparecida Cardinalli, MD, PhD; Eliana Gabas Stuchi-Perez, MD, MS; Maricilda Palandi de Mello, BSc, PhD; Juliana de Godoy Assumpção, BSc, MS; Maria Tereza Matias Baptista, MD, PhD; Joaquim Murray Bustorff Silva, MD, PhD; Andréa Trevas Maciel-Guerra, MD, PhD; Gil Guerra Júnior, MD, PhD

• **Background.**—Dysgenetic male pseudohermaphroditism (DMP) is a sexual differentiation disorder characterized by bilateral dysgenetic testes, persistent müllerian structures, and cryptorchidism in individuals with a 46,XY karyotype. However, the histologic criteria for the diagnosis of DMP are poorly established.

Objective.—To determine gonadal histology in children with DMP.

Patients and Methods.—Between 1996 and 1998, 13 patients with DMP were evaluated on our service. The clinical diagnosis of DMP was based on a 46,XY karyotype, sex ambiguity, high levels of follicle-stimulating hormone and low levels of antimüllerian hormone, a decreased testosterone response to human chorionic gonadotropin stimulation without accumulation of testosterone precursors, and the presence of müllerian structures. Molecular sequencing the HMGbox region of the SRY gene did not reveal any mutations. Biopsies were performed for 22 of 26 gonads (patient age at the time of biopsy, 16 months to 10 years). Conventional microscopy was used to evaluate mean tubular diameter, tubular fertility index, and number of Sertoli cells per tubular profile.

Dysgenetic male pseudohermaphroditism (DMP) is a sexual differentiation disorder diagnosed on the basis of morphologic features in patients with evidence of gonadal dysgenesis. Typically, patients have ambiguous genitalia, low testosterone levels, persistence of müllerian structures, bilateral abnormal testes, and an increased risk for gonadal neoplastic transformation.¹⁻⁴ Depending on the severity of testicular dysgenesis, the antimüllerian hormone (AMH) level may be low or undetectable in patients with abnormal testicular determination.^{5,6} Typically, the gonadal histology is characterized by poorly developed seminiferous tubules surrounded by wavy ovarian stroma. However, gonadal de-

Results.—All 26 gonads were located outside of the labioscrotal folds. Their histologic features varied from only a reduction in tubular size to features of a streak gonad. Five of the 22 gonads grossly resembled a streak gonad. The mean tubular diameter was severely reduced ($>30\%$ reduction relative to the normal tubular diameter for the patient's age) in 4 gonads, markedly reduced (10%–30%) in 11 gonads, slightly reduced ($<10\%$) in one gonad, and normal in one gonad. The tubular fertility index, expressed as the percentage of tubular profiles containing germ cells, was severely reduced ($<30\%$ of normal values) in 9 gonads, markedly reduced (50%–30%) in 2 gonads, and normal in 6 gonads. The number of Sertoli cells per tubular profile was elevated in 16 gonads and normal in one gonad. Thin tubules surrounded by fibrous tissue were occasionally observed.

Conclusion.—The histologic findings confirmed the clinical diagnosis of DMP in every patient in the present series. However, gonadal histology was variable, and careful morphometric evaluation may be necessary to establish the diagnosis.

(Arch Pathol Lab Med. 2001;125:652–656)

velopment may range from apparently normal testicular differentiation to a streak gonad, and the criteria for the histologic diagnosis of DMP are not well established.

The most frequently observed karyotype in patients with DMP is 46,XY. However, multiple cell lines, including a monosomic X cell line, may be detected, and somatic features of Turner syndrome, such as short stature, webbed neck, cubitus valgus, and renal malformation, may be present.⁷

In fact, some authors consider DMP a variant of mixed gonadal dysgenesis,^{8,9} which is defined as the coexistence of a streak gonad and a dysgenetic testis in a patient with a 45,X/46,XY karyotype.^{1,8,10} In order to rule out the presence of Denys-Drash syndrome, which occurs as a consequence of mutations at the WT1 gene on chromosome 11, patients with DMP must be examined periodically for the presence of Wilms tumor and nephropathy with progressive renal failure.¹¹

The objective of this study was to better define the histologic criteria for the diagnosis of DMP by determining the morphometric and histologic features of the gonads of 13 children with a strict clinical diagnosis of this entity.

Dysgenetic Male Pseudohermaphroditism—Scolfaro et al

Accepted for publication January 1, 2001.

From the Interdisciplinary Group for the Study of Sex Determination and Differentiation, Faculty of Medical Science, State University of Campinas, São Paulo, Brazil.

This manuscript was presented at the 39th Annual Meeting of European Society for Pediatric Endocrinology (ESPE), Brussels, Belgium, September 17, 2000.

Reprints: Gil Guerra Júnior, MD, PhD, Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP Campinas, São Paulo, Brazil CP 6111, CEP 13083-970 (e-mail: gilguer@bestway.com.br).

652 Arch Pathol Lab Med—Vol 125, May 2001

Table 1. Clinical and Hormonal Data of 13 Children With Dysgenetic Male Pseudohermaphroditism*

Patient	Age, mo	External Genitalia†	Position of the Gonads, R/L	AMH, pmol/L	T, nmol/L‡	β-hCG, IU/L	LH, IU/L§	FSH, IU/L
1	7	3	I/I	118	1.4	NP	1.0	1.3
2	108	2	A/A	114	0.7	NP	0.9	5.4
3	30	2	I/I	52	<0.3	319	0.6	1.2
4	0.5	3	I/I	98	1.7¶	NP	0.8	3.9
5	10	2	I/I	114	<0.3	351	1.1	1.4
6	92	2	I/A	113	1.0	NP	0.8	5.8
7	78	2	I/-	73	<0.3	301	1.0	6.3
8	13	2	I/I	107	<0.3	196	0.5	1.0
9	20	4	I/A	11	<0.3	351	1.1	1.5
10	20	2	A/A	91	<0.3	219	1.0	1.4
11	31	3	I/I	25	<0.3	143	0.1	0.8
12	29	3	A/A	116	3.1	NP	0.3	0.7
13	44	3	I/A	71	<0.3	365	0.9	0.9

* R indicates right; L, left; AMH, antimüllerian hormone; T, testosterone; β-hCG, β-human chorionic gonadotropin; LH, luteinizing hormone; FSH, follicle-stimulating hormone; A, abdomen; I, inguinal canal; -, not found; and NP, not performed.

† According to the classification of Quigley et al.²¹

‡ Total testosterone level after hCG stimulation test.

§ Normal values of prepubertal LH: 0.1–1.0 IU/L.

|| Normal values of prepubertal FSH: 0.1–1.4 IU/L.

¶ Basal total testosterone level.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

The series consisted of 13 patients with a clinical diagnosis of DMP evaluated by the Interdisciplinary Group for the Study of Sex Determination and Differentiation at the University Hospital of the UNICAMP (Campinas, São Paulo, Brazil), between May, 1996, and May, 1998. The diagnosis of DMP was supported by the findings of ambiguous genitalia in patients with a 46,XY karyotype and bilateral cryptorchidism, low levels of testosterone and AMH, and evidence of müllerian duct derivatives. This study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital.

The patients' mean age at first consultation was 3 years and 1 month (range, 15 days to 9 years), and the initial sex assignment was male in all cases. One patient (case 12) had a previous history of unilateral Wilms tumor and renal failure. No consanguinity was registered, and there was no family history of sex ambiguity. All individuals had hypospadias, bilateral cryptorchidism (Table 1), and evidence of müllerian duct derivatives, which was confirmed by laparoscopy.

Routine hormonal determination was performed by radioimmunoassay and included basal levels of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), androstenedione, and dehydroepiandrosterone. Total testosterone levels were determined before and 24 hours after the last of a series of 3 daily intramuscular injections of 2000 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) (Profasi hp, Serono Lab, São Paulo, Brazil). An increase in testosterone level of more than 4.9 nmol/L (1.4 ng/mL) was considered normal. When testosterone levels did not increase, determination of serum β-hCG was performed to confirm that it was really used. Serum AMH levels were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay, using antibodies against human recombinant AMH,¹² in the laboratory of the Unité de Recherches sur l'Endocrinologie du Développement (INSERM), Montrouge, France. In one patient (patient 4), who was less than 6 months of age, testosterone levels were assayed only in baseline blood samples, because, at this age, testosterone values in normal children are elevated. All patients had low AMH levels as compared with the normal values published by Rey et al.⁹ They also had decreased testosterone levels either at baseline or after hCG stimulation, with no accumulation of testosterone precursors. All patients had a predominance of FSH over LH, despite the fact

that only 5 patients (patients 2, 4, 6, 7, and 8) had elevated gonadotropin levels (Table 1).

Genomic DNA samples from each patient and normal male and female controls were previously used as templates to amplify the HMGbox region of the SRY gene and no mutations were found after direct sequencing of polymerase chain reaction products.

Methods

The biopsies of gonads were fixed in Bouin solution, dehydrated in alcohol, and embedded in paraffin. Serial 4-μm sections from each part of the gonads were stained with hematoxylin-eosin and examined under light microscopy. The mean tubular diameter, tubular fertility index (TFI), and Sertoli cell number per tubular profile were evaluated in 50 to 100 randomly selected seminiferous tubules of each section. Our findings were compared with the normal data for age published by Nistal and Paniagua (Figure 1).¹³

The mean tubular diameter of both the longitudinal and transverse sections was measured using a calibrated vernier ocular micrometer with a 40× objective, as described by Lennox et al.¹⁴ The reduction of diameter was classified according to Nistal and Paniagua¹³ into 3 degrees of severity: slight (<10% reduction in relation to the normal diameter for the age), marked (10%–30% reduction), and severe (>30% reduction) tubular hypoplasia.

Germ cell number was evaluated by determining the TFI, which is the mean number of germ cells per tubular profile. This value was calculated by counting the number of germ cells in a single light microscope field and dividing that number by the number of tubular profiles in that given field. According to Nistal and Paniagua,¹³ 3 levels of severity of germinal hypoplasia can be recognized: slight (TFI, >50%), marked (TFI, of 50%–30%) and severe (TFI, <30%).

The number of Sertoli cells per tubular profile was determined. The Leydig cell number was not evaluated because this number is low during infancy. Streak gonads were defined as those composed of an ovarian-type stroma with sclerohyaline nodules.

RESULTS

Biopsies were performed for 22 of the 26 gonads. The patients' ages at the time of biopsy ranged from 16 months to 10 years (Table 2). Biopsies were not performed for 4

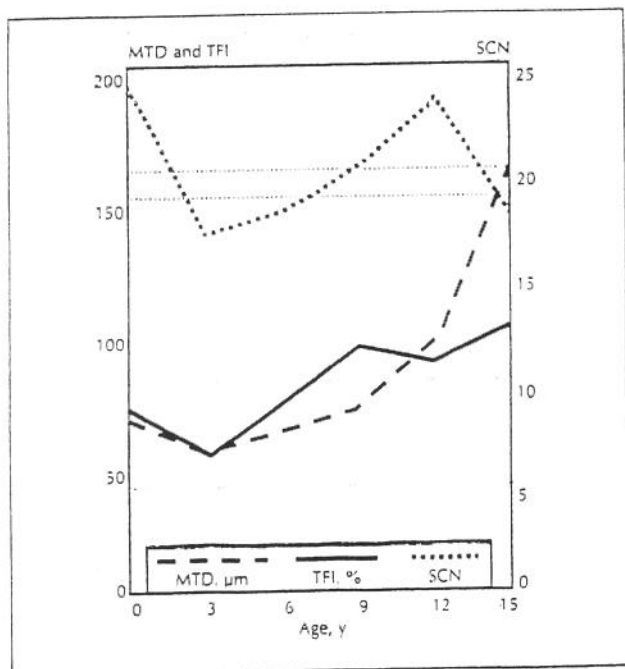


Figure 1. Changes in the mean tubular diameter (MTD), tubular fertility index (TFI), and Sertoli cell number (SCN) profiles from birth to puberty (adapted from Nistal and Paniagua¹²).

gonads: the left gonad of patients 1 and 7, and the right gonad of patients 2 and 4. The left gonad of patient 7 was not found, but the ipsilateral absence of müllerian duct derivatives and the presence of wolffian duct derivatives suggested a unilateral vanishing testis. In the other 3 patients, the biopsy of one of the gonads was not suitable for histologic analysis.

There were 5 streak gonads (the left gonad of patients 2, 6, 9, 10, and 13), which were all in an abdominal position.

Table 2 shows values for the mean tubular diameter, TFI, and number of Sertoli cells per tubular profile observed in the 17 remaining gonads.

Eleven gonads showed marked tubular hypoplasia, 4 showed severe tubular hypoplasia, and one showed slight tubular hypoplasia (Figures 2 through 4). The mean tubular diameter was normal in only one gonad (the right gonad of patient 13).

The TFI was severely reduced in 9 gonads, markedly reduced in 2 gonads (Figures 2 through 4), and normal in 6 gonads.

The Sertoli cell number per tubular profile was elevated in 16 of 17 gonads analyzed (Figures 2 through 4). Only the right gonad of patient 13 showed a normal number of Sertoli cells.

COMMENT

Ambiguous development of the genital ducts, urogenital sinus, and external genitalia occurs in patients with dysgenetic gonads. These patients usually present with evidence of AMH deficiency as well as androgen deficiency, and therefore have müllerian duct derivatives and ambiguous external genitalia.⁸ Mutations and deletions in genes involved in the testes determination and differen-

654 Arch Pathol Lab Med—Vol 125, May 2001

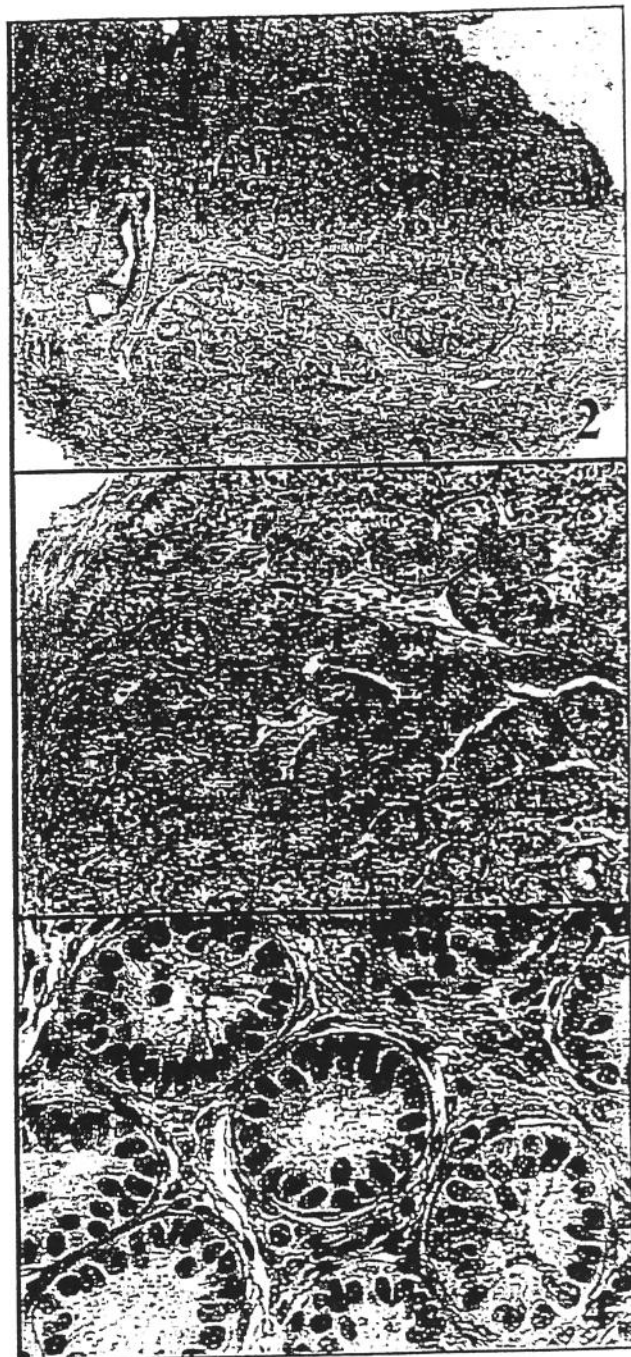


Figure 2. Tissue from patient 4. An area of left gonad (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 75$).

Figure 3. Tissue from patient 12. An area of right gonad showing marked tubular hypoplasia, severe germinal hypoplasia, and hyperplasia of Sertoli cells (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 150$).

Figure 4. Tissue from the right gonad of patient 12 (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 300$).

tiation cascade have been implicated in the etiology of DMP.¹⁵

Our 13 patients presented with some interesting findings: all had a male sex assignment before the first consultation, and there was a delay in the evaluation of the

Dysgenetic Male Pseudohermaphroditism—Scolifaro et al

Table 2. Morphometric and Histologic Data of 22 Gonads From 13 Children With Dysgenetic Male Pseudohermaphroditism*

Patient	Age, mo†	No. Tubular Profiles Examined	MTD, μ m	STH	TFI, %	SGH	SCN	HSC
1	11	R, 110	52.3	Marked	12	Severe	28	+
2	122	L, —	...	Streak	...	Streak	...	Streak
3	36	R, 69	29.1	Severe	0	Severe	19	+
		L, 104	35.8	Severe	15	Severe	22	+
4	16	L, 117	49.6	Marked	10	Severe	29	+
5	16	R, 102	46.8	Marked	78	Normal	23	+
		L, 101	49.1	Marked	97	Normal	24	+
6	108	R, 99	59.5	Slight	6	Severe	29	+
		L, —	...	Streak	...	Streak	...	Streak
7	84	R, 104	39.4	Severe	111	Normal	21	+
8	19	R, 126	54	Marked	68	Normal	19	+
		L, 116	52.4	Marked	166	Normal	19	+
9	26	R, 42	38.3	Severe	50	Severe	26	+
		L, —	...	Streak	...	Streak	...	Streak
10	27	R, 98	43.9	Marked	0	Severe	18	Normal
		L, —	...	Streak	...	Streak	...	Streak
11	36	R, 104	49.6	Marked	33	Marked	30	+
		L, 115	53.1	Marked	45	Marked	33	+
12	37	R, 98	49.2	Marked	0	Severe	37	+
		L, 80	43.4	Marked	10	Severe	32	+
13	51	R, 66	64.1	Normal	115	Normal	24	+
		L, —	...	Streak	...	Streak	...	Streak

* MTD indicates mean tubular diameter; STH, severity of tubular hypoplasia according to Nistal and Paniagua¹³; TFI, tubular fertility index; SGH, severity of germinal hypoplasia according to Nistal and Paniagua¹³; SCN, Sertoli cell number per tubular profile; HSC, hyperplasia of Sertoli cells according to Nistal and Paniagua¹³; R, right gonad; L, left gonad; —, absence of seminiferous tubules; and +, present.

† Age at which gonadal biopsy was performed.

ambiguous genitalia (mean age at the time of evaluation, 3 years and 1 month). Although all patients had a predominance of FSH over LH, only 5 of them had high FSH levels for their age. Among these 5 patients, 3 were older than 6 years, 1 was 15 days old, and 1 was 1 year old, suggesting that gonadotropins may be useful in the diagnosis of DMP at the extremes of prepubertal age. Variable degrees of masculinization of the external genitalia were noted, and the gonads were located outside of the labioscrotal folds in all patients. One patient (patient 12) had features of Denys-Drash syndrome.

The diagnostic confirmation of DMP is based on the histologic finding of variable degrees of bilateral dysgenetic testes, which range from an almost "normal" testis to a testis that grossly resembles a streak gonad. Although the abnormalities observed in dysgenetic testes are well defined, pathologists usually have some difficulties establishing the diagnosis of dysgenetic testes, and the characteristics of dysgenetic gonads are not routinely evaluated.

Testicular biopsy is essential for the diagnosis in some patients with ambiguous genitalia, and the evaluation of biopsies of prepubertal testes should involve assessment of the mean tubular diameter and the number of germ cells, Sertoli cells, and Leydig cells (when evaluated) per tubular profile, per unit area, per unit volume, or per testis.

Mean tubular diameter is a very good indicator of the development of the seminiferous epithelium.¹³ In the prepubertal testis, this diameter depends mainly on the number of Sertoli cells, and thus indicates whether they are adequately stimulated by FSH and responsive to this stimulus. Testicular diameter varies throughout childhood; it is smallest in the fourth year of life, increases slowly until 9 years of age, and increases rapidly thereafter, up to 15

years of age (Figure 1).¹³ Our patients with DMP showed a variable mean tubular diameter, from normal to severely decreased, but with a predominance of marked and severe tubular hypoplasia (15/17 gonads). Even though there are technical pitfalls in evaluating the mean tubular diameter, our data indicate the need for this evaluation in all testicular biopsies when there is clinical suspicion of gonadal dysgenesis, independent of the gonadal location.

Germ cells may be counted by several methods. The most common method is calculating the TFI, which reflects the percentage of tubular profiles containing germ cells. In neonates, 68% of tubular profiles contain at least one germ cell. From birth to 3 years, this value decreases to 50%, followed by a progressive increase to 100% at puberty (Figure 1).¹³ A more complete determination of germ cell number can be obtained by calculating the total number of germ cell per testis, but this approach requires morphometric assessment of the intratubular volume and careful clinical measurement of the 3 axes of the testis.¹⁴ The TFI was altered in 11 of the 17 testes that we evaluated. Among the 6 patients with dysgenetic testes and normal TFIs, 5 had a decreased and 1 had a normal mean tubular diameter. Therefore, our data suggest that mean tubular diameter is a better indicator of testicular dysgenesis than TFI.

Another histologic parameter evaluated was the number of Sertoli cells per tubular profile, which varies during childhood as a result of low levels of Sertoli cell proliferation between the ages of 4 and 12 years.¹⁷ Hyperplasia of Sertoli cells is usually pronounced in patients with DMP, and it is a sign of tubular dysgenesis.¹⁸ The number of Sertoli cells was increased in all of the gonads of our patients with DMP, but in one patient, this increase was not marked (Figure 1). This finding probably reflects the fact

that the ideal time for this evaluation is during the first year of life or at the onset of puberty.

Finally, it is important to emphasize that among the 22 evaluated gonads, only 5 grossly resembled streak gonads. It is interesting to point out that they were all found on the left side; among true hermaphrodites, there is also a predominance of ovaries and ovotestes on the left side.^{19,20}

In conclusion, the histologic findings in our patients with DMP, although highly variable, confirmed the clinical diagnosis. A careful histologic and morphometric evaluation, particularly the measurement of mean tubular diameter, may help establish and improve the diagnosis of DMP.

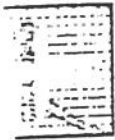
We wish to express our sincere gratitude to Rodolfo Rey, MD, PhD, for his expert technical assistance and continuous support. We also thank the members of the Cytogenetics Laboratory of Medical Genetics Department and the Main Clinical Laboratory of the University Hospital (UNICAMP).

References

1. Robboy SJ, Miller T, Donahoe PK, et al. Dysgenesis of testicular and streak gonads in the syndrome of mixed gonadal dysgenesis: perspective derived from clinicopathologic analysis of twenty-one cases. *Hum Pathol.* 1982;13:700-716.
2. Troche V, Hernandez E. Neoplasia arising in dysgenetic gonads. *Obstet Gynecol Surv.* 1986;41:74-79.
3. Krasna IH, Lee ML, Smilow P, Sciorra L, Eierman L. Risk of malignancy in bilateral streak gonads: the role of the Y chromosome. *J Pediatr Surg.* 1992;27:1376-1380.
4. Rohatgi M, Gupta DK, Menon PS, Verma IC, Mathur M. Mixed gonadal dysgenesis and dysgenetic male pseudohermaphroditism—a critical analysis. *Indian J Pediatr.* 1992;59:487-500.
5. Rey RA, Belville C, Nhou-Fékété C, et al. Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum antimüllerian hormone measurement. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:627-631.
6. Stuchi-Perez EG, Lukas-Croisier C, Castro M, et al. Evaluation of the tubular and interstitial functions of the testis in 46,XY patients with ambiguous genitalia. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000;13:605-612.
7. Chang HJ, Clark RD, Bachman H. The phenotype of 45,X/46,XY mosaicism: an analysis of 92 prenatally diagnosed cases. *Am J Hum Genet.* 1990;46:156-167.
8. Rajfer J, Walsh PC. Mixed gonadal dysgenesis: dysgenetic male pseudohermaphroditism. In: Josso N, ed. *The Intersex Child: Pediatric and Adolescent Endocrinology*. Basel, Switzerland: S. Karger; 1981:105-115.
9. Borer JG, Nitti VW, Classberg KI. Mixed gonadal dysgenesis and dysgenetic male pseudohermaphroditism. *J Urol.* 1995;153:1267-1273.
10. Donahoe PK, Crawford JD, Hendren WH. Mixed gonadal dysgenesis: pathogenesis and management. *J Pediatr Surg.* 1979;14:287-300.
11. Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, et al. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell.* 1991;67:437-447.
12. Carré-Eusebe D, Imheud S, Harbison M, New MI, Josso N, Picard JY. Variants of the anti-Müllerian hormone gene in a compound heterozygote with the persistent Müllerian duct syndrome and his family. *Hum Genet.* 1992;90:389-394.
13. Nistal M, Paniagua R. Non-neoplastic diseases of the testis. In: Bostwick DG, Eble JN, eds. *Urologic Surgical Pathology*. St Louis, Mo: Mosby; 1996:458-565.
14. Lennox B, Ahmad KN, Mack WS. A method for determining the relative total length of the tubules in the testis. *J Pathol.* 1970;102:229-238.
15. Jimenez R, Sanchez A, Burgos M, Dias de la Guardia RC. Puzzling out the genetics of mammalian sex determination. *Trends Genet.* 1996;12:164-166.
16. Müller J, Skakkebaek NF. Quantification of germ cells and seminiferous tubules by stereological examination of testicles from 50 boys who suffered from sudden death. *Int J Androl.* 1983;6:143-156.
17. Cortes D, Müller J, Skakkebaek NE. Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl.* 1987;10:589-596.
18. Nistal M, Abaurrea MA, Paniagua R. Morphological and histometric study on the human Sertoli cell from birth to the onset of puberty. *J Anat.* 1982;14:351-363.
19. Van Niekerk WA, Retief AE. The gonads of human true hermaphrodites. *Hum Genet.* 1981;58:117-122.
20. Guerra G Jr, De Mello MP, Assumpção JG, et al. True hermaphrodites in the southeastern region of Brazil: a different cytogenetic and gonadal profile. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 1998;11:519-524.
21. Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev.* 1995;16:271-321.



XXXVII REUNION DE LA SOCIEDAD LATINOAMERICANA
DE INVESTIGACION PEDIATRICA



XIII REUNION DE LA SOCIEDAD LATINOAMERICANA
DE ENDICRONOLOGIA PEDIATRICA

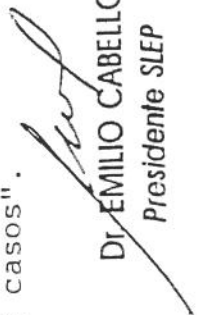
Arequipa, Perú, 7 al 11 de Noviembre de 1999

Certifico que Dr.(a) GIL GUERRA JUNIOR

ha participado en la XXXVII Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Investigación
Pediátrica y XIII Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Endocrinología Pediátrica

en calidad de ganador del premio de mejor trabajo presentado.

"Disgenesia gonadal XY: aspectos clínicos, hormonais, moleculares, radiológicos e histológicos
de 13 casos".


Dr. EMILIO CABELLO
Presidente SLEP


Dr. ROBERTO SHIMABUKU
Presidente SLAEP