ELIANA GABAS STUCHI PEREZ

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS DE LEYDIG E DE SERTOLI EM 24 CASOS DE AMBIGÜIDADE GENITAL COM CARIÓTIPO 46,XY.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: **Prof. Dr. GIL GUERRA JÚNIOR**

Campinas - SP

1999

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
N.º CHAMADA :

V Ex
TOMBO BC/ 39754
PROC. 229/99
C D
PREÇO R$ 11,00
DATA 17-12-99
N.º CPD

CM-00130650-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

Perez, Eliana Gabas Stuchi

P415a Avaliação funcional das células de Leydig e Sertoli em 24 casos de ambigüidade genital com cariótipo 46,XY / Eliana Gabas Stuchi Perez. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador : Gil Guerra Júnior

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

1. Testículo. 2. Testosterona. 3. Gonadotrofinas. 4. Andrógenos. I. Gil Guerra Júnior . II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE MESTRADO

Aluno: ELIANA GABAS STUCHI PEREZ

Orientador: Prof. Dr. GIL GUERRA JÚNIOR

Membros:

1. Prof. Dr. GIL GUERRA JÚNIOR - FCM - UNICAMP

2. Prof. Dr. CARLOS ALBERTO LONGUI - FCM - Santa Casa - SP

3. Prof. Dr. MARCOS ANTONIO TAMBASCIA - FCM - UNICAMP

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da

Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Resultado:

Data:

DEDICATÓRIA

A todos os pais de crianças que nasceram com ambigüidade genital, cuja angústia diante de tal situação foi a razão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. GIL GUERRA JÚNIOR, amigo e orientador, por ter acreditado neste trabalho e por sua dedicação e entusiasmo.

À Dra. MARIA TEREZA MATIAS BAPTISTA, amiga e mestre, pelo constante incentivo e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. RODOLFO REY, pelas dosagens do hormônio anti-Mülleriano e pelo entusiasmo e cooperação neste trabalho.

À Dra. MÁRCIA SCOLFARO, amiga e companheira, pelos muitos auxílios.

À Prof.a Dra. NATHALIE JOSSO, e a todo seu grupo, por toda contribuição científica e à Dra. CÉLINE LUKAS-CROISIER, pelas dosagens do hormônio anti-Mülleriano.

À todos os que participam do GRUPO INTERDISCIPLINAR DE ESTUDOS DA DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO SEXO do Hospital das Clínicas da UNICAMP (GIEDDS), por permitir compartilhar do entusiasmo do grupo e pela salutar convivência.

Ao Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética Médica da FCM - UNICAMP, em especial à Prof.a. Dra. CHRISTINE HACKEL, pelos diagnósticos citogenéticos.

Ao Laboratório de Fisiologia do Departamento de Patologia Clínica da FCM - UNICAMP, em especial à Prof.a. Dra. MARGARET DE CASTRO, pela cooperação e realização das dosagens hormonais.

Ao Departamento de Anatomia Patológica da FCM - UNICAMP, em especial à Prof.a. Dra. IZILDA AP. CARDINALLI, pelos diagnósticos anatomopatológicos realizados.

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.

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.

À Prof.a. Dra. MARIA LUIZA MORETTI BRANCHINI, por acreditar neste trabalho.

Aos pacientes, razão deste estudo.

Ao embriologista Dr. ALFRED JOST, pioneiro dos estudos em diferenciação sexual, e responsável pela primeira demonstração da existência do hormônio anti-Mülleriano.

A todos que, direta ou indiretamente, permitiram e colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório SERONO Ltda., por ter fornecido a gonadotrofina coriônica humana (Profasi hp ®) usada neste trabalho.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Aos meus pais, VERA e ÂNGELO, amigos e maiores mestres, pelo apoio e incentivo.

Aos meus sogros, NEUSA e JOSÉ, pelo apoio e amizade.

E em especial ao meu esposo, SÉRGIO, sempre amigo e companheiro, pela compreensão, presença importante e auxílio.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1: Classificação dos graus de virilização da genitália externa feminina (PRADER, 1954). 30

Tabela I: Valores de hormônio anti-Mülleriano sérico (HAM) em homens normais agrupados por idade e desenvolvimento puberal. 48

Tabela II: Idade e desenvolvimento puberal à 1ª. consulta, grau de ambigüidade genital, presença de seio urogenital e derivados dos dutos de Müller, e localização e tipo de gônada de 24 casos de ambigüidade genital com cariótipo 46,XY avaliados no GIEDDS entre 5/96 e 5/98. 57

TABELA III: Idade e desenvolvimento puberal à 1ª. consulta, dosagens séricas de LH e FSH, LH/FSH, testosterona total (T) basal com ou sem estímulo de gonadotrofina coriônica, dehidrotestosterona (DHT), relação T/DHT, e hormônio anti-Mülleriano (HAM) de 24 casos com ambigüidade genital e cariótipo 46,XY acompanhados no GIEDDS entre 5/96 e 5/98. 59

Tabela IV: Idade e desenvolvimento puberal, valores séricos da fração β - gonadotrofina coriônica após teste de estímulo com gonadotrofina coriônica humana (β-hCG), e basais de androstenediona (A-Δ4), dehidroepiandrosterona (DHEA), e DHEA após estímulo agudo com ACTH em 11 casos de ambigüidade genital com cariótipo 46,XY sem produção de testosterona, acompanhados no GIEDDS entre 5/96 e 5/98. 61

Figura 2: Distribuição normal dos valores séricos de hormônio anti-Mülleriano (pMol/L) (média ± 1 e 2 DP) para o sexo masculino de acordo idade e desenvolvimento puberal (REY *et al.*, 1999) e valores encontrados em 24 casos de ambigüidade genital com cariótipo 46,XY, acompanhados no GIEDDS entre 5/96 e 5/98, separados por diagnóstico etiológico 65

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 1

REVISÃO DE LITERATURA 5

A diferenciação sexual normal 6

O estado sexualmente neutro 7

O estabelecimento do sexo genético 8

A diferenciação sexual masculina normal 12

Ambigüidade genital: definição 14

Classificação dos distúrbios da diferenciação sexual 15

1. Distúrbios da diferenciação gonadal 16

2. Pseudo-hermafroditismo masculino 19

A abordagem diagnóstica dos casos com ambigüidade genital e cariótipo 46,XY 29

A definição do sexo de criação 33

Hormônio anti-mülleriano 34

CASUÍSTICA E METODOLOGIA 45

RESULTADOS 55

DISCUSSÃO 66

CONCLUSÕES 74

RESUMO 76

ABSTRACT 79

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 81

ANEXO 104

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As ambigüidades genitais envolvem não somente complexas e urgentes questões médicas, como também problemas psicológicos extremamente sérios. Embora a sociedade tenha se tornado muito mais esclarecida sobre a questão, os problemas que afetam a diferenciação sexual ainda estão cercados de preconceitos. Seu manejo exige muita sensibilidade, de modo que não exista confusão ao longo do tempo a respeito da identificação sexual da criança.

Portanto, frente a um paciente com ambigüidade genital, os objetivos principais são o diagnóstico preciso de sua etiologia e a correta definição do sexo de criação. O diagnóstico permitirá o aconselhamento genético do indivíduo e da família, e, quando necessário, a estimativa do risco de malignização gonadal e da época adequada para a realização da gonadectomia. É possível também a definição da época e do tipo de correção cirúrgica reconstrutiva da genitália externa, e a previsão quanto ao desenvolvimento de caracteres sexuais secundários espontâneos, a necessidade de terapia hormonal de reposição e, ainda, quanto à possibilidade de fertilidade futura (PAGON, 1987; DAMIANI, 1989).

Uma vez que a diferenciação sexual masculina normal envolve um maior número de eventos geneticamente determinados quando comparada com a feminina, as ambigüidades genitais com cariótipo 46,XY apresentam portanto uma maior complexidade para sua definição etiológica. Este grupo heterogêneo de doenças inclui as anomalias da diferenciação gonadal (hermafroditismo verdadeiro e disgenesia gonadal) e os pseudo-hermafroditismos masculinos (em especial os defeitos na síntese, metabolismo ou ação dos andrógenos).

A função testicular tem sido tradicionalmente avaliada por meio da capacidade de esteroidogênese das células de Leydig e pela espermatogênese. Para avaliação da produção de testosterona em crianças pré-puberais fora dos primeiros meses de vida é necessária a realização de teste de estímulo com gonadotrofina coriônica, estando descritos inúmeros protocolos na literatura (GRANT *et al.*, 1976; SMALS *et al.*, 1979; DAMIANI, 1989; RODRIGUES,TARDELLI & PIEROLA, 1998).

As confirmações diagnósticas etiológicas de determinadas doenças, em especial as insensibilidades androgênicas e a deficiência de 5α-redutase tipo 2, necessitam estudos *in vitro* com cultura de fibroblastos de região genital ou estudos moleculares dos respectivos genes (THIGPEN *et al.*, 1993; QUIGLEY *et al.*, 1995). Estas avaliações apresentam metodologia complexa, alto custo, e freqüentemente só são realizadas em laboratórios de pesquisa na área de diferenciação sexual.

Nos últimos anos tem-se procurado um novo marcador da função testicular, em especial das células de Sertoli, sendo utilizadas mais freqüentemente para este fim as determinações séricas da inibina B e do hormônio anti-Mülleriano. Os estudos têm demonstrado que o hormônio anti-Mülleriano pode ser utilizado como um marcador das células de Sertoli imaturas, não necessitando de qualquer estímulo fisiológico para sua determinação, diferentemente da inibina que mantém relação inversa com o hormônio folículo-estimulante e necessita estímulo para sua dosagem. (JOSSO *et al.*, 1990; JOSSO, 1995; BYRD, *et al.*, 1998; LONGUI *et al.*, 1998).

O hormônio anti-Mülleriano, regulado negativamente pelos andrógenos, parece ser também um bom marcador da ação da testosterona, pois apresenta-se elevado em pacientes com insensibilidade androgênica durante o primeiro ano de vida e na puberdade (REY *et al.*, 1994).

Recentemente, o hormônio anti-Mülleriano tem sido utilizado não somente para a determinação da presença de tecido testicular em indivíduos do sexo masculino com gônadas não palpáveis, mas também como método auxiliar na investigação de determinadas doenças que cursam com ambigüidade genital, em especial as insensibilidades androgênicas e as disgenesias gonadais (LEE *et al.*, 1997; REY *et al.*, 1999).

Portanto, os objetivos deste estudo foram avaliar em crianças portadoras de ambigüidade genital com cariótipo 46,XY:

1. a função das células de Leydig pela determinação dos níveis séricos de testosterona, com ou sem estímulo de gonadotrofina coriônica humana,

2. a função das células de Sertoli pela determinação dos níveis séricos basais de hormônio anti-Mülleriano,

3. e verificar a utilidade destas determinações no diagnóstico etiológico diferencial.

REVISÃO DE LITERATURA

"... Eu decidi tentar outro caminho, que investigasse diretamente a atividade endócrina - se existente - das gônadas fetais, usando cirurgia do feto intra-uterina. Isto não tinha sido feito antes e o primeiro sucesso só foi obtido após muitos meses difíceis... Foi demorado não somente porque era difícil de se obter coelhos suficientes para os experimentos naquele tempo[1], mas também porque eu não tinha a mínima experiência em cirurgia mais refinada..."

Alfred Jost, 1988 (*apud* JOSSO *et al.*, 1993a)
[1]Segunda Guerra Mundial

Nos casos de crianças com ambigüidade genital, é fundamental que o diagnóstico correto seja realizado antes que elas apresentem uma identidade sexual social e, principalmente, psicológica (MONEY, 1965; BAKER, 1980). Portanto, o ideal é a identificação desses casos ainda no período neonatal, devendo-se nessa época iniciar-se uma investigação que deve ser a mais ágil, rápida e adequada (PAGON, 1987).

Para tanto, é necessário o envolvimento de vários profissionais da área da saúde para alcançar tal objetivo; entre eles, pediatras, geneticistas, endocrinologistas, cirurgiões, ginecologistas, radiologistas, anatomopatologistas, médico legistas, psicólogos ou psiquiatras e assistentes sociais.

Entretanto, a atuação de forma conjunta e integradora desses profissionais, unindo os conhecimentos de cada área ou disciplina, permite não somente a rapidez do diagnóstico, mas também a uniformização das informações à família, e conseqüentemente uma maior confiança da família na equipe médica como um todo (GUERRA JR, 1997).

Ensinar a diferenciação sexual normal, bem como utilizar os termos embriológicos na caracterização dos achados anatômicos da genitália, parecem ser a melhor forma de começar a informar a família de como pode se desenvolver um distúrbio na diferenciação sexual e que passos necessitam ser dados na investigação diagnóstica para esclarecê-lo.

A DIFERENCIAÇÃO SEXUAL NORMAL

Deve-se aos experimentos de ALFRED JOST (1947) grande parte do que se sabe até hoje acerca da diferenciação sexual normal. Ele demonstrou que fetos de animais mamíferos castrados precocemente durante a gestação desenvolviam fenótipo feminino normal. Também demonstrou que no estádio onde os ductos de Wolff e Müller coexistem, altas doses de cristais de testosterona colocados nos locais dos testículos retirados, estimulam apenas o desenvolvimento do ducto de Wolff ipsilateral. Essas

demonstrações combinadas às recentes revelações da importância do cromossomo Y na diferenciação sexual masculina, estabeleceram grande parte dos conhecimentos a respeito da diferenciação sexual normal.

Até cerca de 7 semanas após a fertilização, o embrião humano é potencialmente um organismo bissexual, equipado com primórdios gonadais e genitais capazes de se diferenciar em fenótipo masculino ou feminino. Nessa fase, portanto, não é possível fazer a distinção macro ou microscópica entre embriões com predestinação masculina ou feminina. O que existe até então são rudimentos gonadais (gônadas bissexuais ou indiferentes), os primórdios dos conductos genitais internos masculinos e femininos (representados por dois sistemas de canais bilaterais, os ductos de Wolff e os ductos de Müller), e rudimentos genitais externos (MOORE, 1978).

O ESTADO SEXUALMENTE NEUTRO

Do ponto de vista embriológico, o estado sexualmente neutro caracteriza-se pelo surgimento sobre as saliências mesonéfricas, na região ventral mediana do embrião, em torno da 4ª. a 5ª. semana após a fertilização, de novas saliências de tecido mesenquimatoso cobertas pelo epitélio celômico, as chamadas saliências gonadais. Esse surgimento é induzido pela migração para essa região do mesonefro das células germinativas primordiais, originárias da parede da vesícula umbilical próximo ao alantóide. São células grandes que se locomovem por meio de movimentos amebóides ao longo do mesentério do intestino posterior, dividindo-se em duas correntes para atingir o epitélio celômico de cada uma das futuras gônadas (MOORE, 1978).

Em torno da 6ª. semana, células do epitélio celômico invadem o mesênquima formando agregados celulares, os cordões sexuais primitivos, que cercam as células germinativas e distribuem-se em uma região cortical e outra medular (MOORE, 1978).

Os ductos de Wolff, ou ductos mesonéfricos, são ductos de excreção dos rins medianos (mesonefros) e desembocam inicialmente na cloaca; após a divisão desta pelo

septo urorretal, o local de abertura dos ductos de Wolff passa a denominar-se seio urogenital (MOORE, 1978).

Os ductos de Müller, ou ductos paramesonéfricos, surgem de cada lado a partir de invaginações do epitélio celômico. Suas extremidades cranianas, em forma de funil, abrem-se na cavidade peritoneal; correm então paralelamente aos ductos de Wolff no sentido caudal e fundem-se na linha média formando um canal uterovaginal em forma de Y, que penetra na parede do seio urogenital formando uma saliência no interior dessa cavidade, o chamado tubérculo Mülleriano (MOORE, 1978).

Os rudimentos genitais externos compreendem um tubérculo genital, que se desenvolve no início da 4ª. semana, logo seguido por saliências labioescrotais e pregas urogenitais que ladeiam a membrana cloacal. Ao final da 6ª. semana, essa membrana é dividida pelo septo urorretal, surgindo assim a membrana urogenital, que logo se rompe para formar a abertura do seio urogenital. O tubérculo genital alonga-se e é denominado falo, e um sulco coronário delimita sua haste do primórdio da glande do futuro pênis ou clitóris; um sulco uretral revestido por endoderme surge na superfície ventral do falo e é contínuo com a abertura do seio urogenital (MOORE, 1978).

A diferenciação subseqüente, para o sexo masculino ou feminino, depende do sexo genético do embrião. Na dependência dele teremos o sexo gonadal (diferenciação da gônada primordial em testículo ou ovário) e o sexo fenotípico (diferenciação específica dos ductos genitais internos, seio urogenital e genitália externa).

O ESTABELECIMENTO DO SEXO GENÉTICO (DETERMINAÇÃO SEXUAL)

O sexo genético do zigoto é estabelecido pela fertilização de um óvulo normal por um espermatozóide contendo um cromossomo X ou um Y. Em humanos o sexo heterogamético (XY) é masculino e o homogamético (XX) é feminino. O papel do cromossomo Y como determinante da masculinidade já era conhecido desde o final dos anos 50, quando teve início o estudo do cariótipo humano.

O antígeno H-Y foi precocemente responsabilizado pela diferenciação testicular. Em 1955, EICHWALD & SILMSER (*apud* STYNE, 1996) notaram que o transplante de pele de ratos machos eram rejeitados pelas fêmeas da mesma espécie, o que não ocorria entre machos ou de fêmea para macho. Em 1971, GOLDBERG *et al.* sugeriram que o antígeno H-Y, presente no esperma, fosse o responsável por tais rejeições. Posteriormente, novas evidências sugeriram que o antígeno H-Y fosse o antígeno determinante do sexo e estivesse associado ao complexo maior de histocompatibilidade (HLA = *human leukocyte antigen*) (WACHTEL, 1984). Os genes para o antígeno H-Y foram localizados nos braços curtos dos cromossomos Y e X, e as descobertas mais recentes não o credenciam para ser o fator de determinação testicular.

Desde essa época, a partir do estudo citogenético de indivíduos portadores de anomalias da diferenciação sexual (mulheres 45,X com síndrome de Turner, homens 47,XXY com síndrome de Klinefelter, e portadores de diversas aberrações numéricas e estruturais dos cromossomos sexuais), as evidências apontavam para a existência de um gene no cromossomo Y envolvido especificamente na determinação testicular, denominado *TDF* (*testis determining factor*). O *TDF* foi recentemente isolado por meio de estratégias de clonagem posicional e informações obtidas a partir de homens com cariótipo 46,XX (sexo reverso) nos quais o cromossomo X paterno carregava o *TDF* como resultado de um *crossing-over* desigual dos cromossomos sexuais durante a meiose, e a partir de mulheres 46,XY com microdeleções no braço curto do cromossomo Y (PAGE *et al.*, 1990; PEREIRA *et al.*, 1991; PIVNIK *et al.*, 1992).

Dentro de um intervalo genético mínimo de 35 Kb, um gene foi identificado e denominado *SRY* (*sex-determining region on the Y chromosome*), na região 1A1 do braço curto do cromossomo Y, contendo um grupo de 80 aminoácidos encontrado em uma classe de proteínas ligadas à cromatina, chamadas de proteínas de alta mobilidade (*HMG*) (PAGE *et al.*, 1987; GUBBAY *et al.*, 1990; SINCLAIR *et al.*, 1990; HAQQ *et al.*; 1993; WHITFIELD *et al.*; 1993; GIESE *et al.*, 1994). O *SRY* é encontrado nos cromossomos Y de praticamente todos os mamíferos e se expressa quando as gônadas indiferenciadas se transformam em testículos (HAWKINS, 1993).

A identificação, em indivíduos com disgenesia gonadal XY, de mutações no *SRY*, bem como a produção de camundongos transgênicos XX carreando o gene *SRY* que desenvolveram fenótipo masculino, provam que o *SRY* é o *TDF* (KOOPMAN *et al*, 1991) e, conseqüentemente, que o *SRY* é um elemento crítico em zigotos masculinos para a diferenciação testicular e não ovariana, além de ser provavelmente o primeiro passo na cascata de eventos genéticos para a diferenciação masculina em mamíferos (NORDQVIST; 1995; JIMÉNEZ *et al.*, 1996).

O *SRY* não somente se liga ao DNA por meio do seu *HMG box*, mas também o dobra em aproximadamente 80° de uma maneira seqüência-específica, e desse modo aproximando de si seqüências distantes de DNA que podem afetar a transcrição de genes por ele regulados (*"downstream" genes*). Portanto, o *HMG box* é essencial para a função do *SRY*, e substituições em seus aminoácidos podem causar disgenesia gonadal XY ao abolir ou modificar a ligação, bem como afetar o ângulo em que o *SRY* dobra o DNA (HAWKINS, 1993).

Mutações no *SRY* humano são responsáveis por aproximadamente 20% dos casos de disgenesia gonadal XY, e o *SRY* está ausente em cerca de 20% dos homens 46,XX (BOUCEKKINE *et al*, 1994). Portanto, apesar do *SRY* ser a principal chave na diferenciação testicular, um grande grupo de evidências indica que o controle da gonadogênese é um processo muito mais complexo, e que deve haver um número indefinido de genes autossômicos ou ligados ao X nessa cascata de transcrição (MOORE & GRUMBACH, 1992; JIMÉNEZ *et al.*, 1996).

De fato, a seqüência conservada de 80 aminoácidos encontrada no *SRY* também está presente em uma família de genes clonados com base na seqüência homóloga de DNA e chamados de *SOX* (*genes for SRY-box homologous*). Alguns genes *SOX* são conhecidos e se expressam no desenvolvimento embrionário em tecidos específicos. Mutações que levam à perda de função no gene *SOX9*, localizado no braço longo do cromossomo 17, causam uma doença de herança recessiva denominada Displasia Camptomélica, que pode cursar também com sexo reverso em embriões 46,XY

(TOMMERUP *et al.*, 1993; WAGNER *et al.*, 1994). O gene *SOX9* se expressa no desenvolvimento de estruturas esqueléticas, bem como da crista genital, e mutações nesse gene não causam disgenesia gonadal na ausência de Displasia Camptomélica.

O gene *WT-1* (*Wilms tumor supressor locus*, localizado em 11p13), por sua vez, afeta o desenvolvimento tanto do rim quanto da gônada primordial, e age antes do gene *SRY* e de genes determinantes de ovários (COPPES *et al.*, 1994). Mutações nesse gene ocorrem nas síndromes de Denys-Drash (pseudo-hermafroditismo masculino disgenético e doença degenerativa renal) (PELLETIER *et al.*, 1991; COPPES *et al.*, 1993) e *WAGR* (tumor de Wilms, aniridia, malformação genitourinária e/ou gonadoblastoma, e retardo mental) (ROSE *et al.*, 1990).

Sabe-se, ainda, que a duplicação de um gene no braço curto do cromossomo X (Xp21) em indivíduos XY causa disgenesia gonadal e sexo reverso independentemente da presença do *SRY*, enquanto que a deleção desse *locus* não afeta a diferenciação testicular. Especula-se que esse gene, agora chamado *DSS* (*Dosage Sensitive Sex reversal*) esteja ainda envolvido na diferenciação ovariana (BARDONI *et al.*, 1994).

Foi, ainda, descrito o gene *DAX-1* (DSS - Hipoplasia Adrenal Congênita, em uma região crítica do cromossomo X, gene 1), expresso nas glândulas supra-renais e testículos (ZANARIA *et al.*, 1994). Os portadores de hipoplasia adrenal congênita e hipogonadismo hipogonadotrófico, doenças de herança ligada ao cromossomo X, apresentam deleções ou mutações deste gene (MUSCATELLI *et al.*, 1994).

Finalmente, também descreveu-se o *SF-1* (*steroidogenic factor-1*), um receptor nuclear único codificado por um gene autossômico, como o principal regulador das enzimas envolvidas na esteroidogênese adrenal e gonadal, e que se expressa na gônada indiferenciada. Mutações no gene do *SF-1* em camundongos causa morte celular programada (apoptose) nas adrenais e gônadas fetais (LUO *et al.*, 1994).

Há relatos também de outros genes autossômicos envolvidos na diferenciação sexual: um gene localizado em 9p24.1 (FRYNS *et al.*, 1986; CROCKER *et al.*, 1988;

FELLOUS *et al.*, 1996) relacionado a sexo reverso em indivíduos XY; e outro em 8q22.1, que determina anomalias somáticas (hipertelorismo ocular, orelhas de implantação baixa, malformações de linha média, clinodactilia) e ambigüidade genital, em especial hipospadia (NUNES *et al.*, 1996); e, ainda, a associação de sexo reverso em indivíduos XY com deleção terminal do braço longo do cromossomo 10 (WILKIE *et al.*, 1993). Outros genes, especialmente autossomos, estão sendo pesquisados, com o objetivo de esclarecer toda a cascata de genes envolvidos na diferenciação testicular.

Na ausência do SRY, as gônadas permanecem no estadio indiferente até o final da 10ª. semana de gestação, quando então se inicia a diferenciação ovariana, sendo portanto mais tardia que a testicular. Para a manutenção ovariana é necessária a presença de dois cromossomos X íntegros, caso contrário os folículos ovarianos degeneram e a gônada torna-se disgenética.

A DIFERENCIAÇÃO SEXUAL MASCULINA NORMAL

Na presença do *SRY*, associado aos outros determinantes gênicos da diferenciação testicular normal, o primeiro evento observável na gônada bissexual é a diferenciação, por volta da 7ª semana, de células epiteliais em células de Sertoli na região medular dos cordões sexuais primitivos, enquanto que as células da região cortical degeneram. As células de Sertoli agrupam-se formando cordões que englobam as células sexuais primitivas, que se tornam, assim, as espermatogônias. Esses cordões testiculares desenvolvem-se para formar os túbulos seminíferos, túbulos retos e rede testis. Sob o epitélio surge uma espessa cápsula fibrosa, a túnica albugínea. As células intersticiais (de Leydig), derivadas do mesênquima, podem ser observadas entre os túbulos a partir da 8ª semana. Uma vez iniciada a diferenciação do testículo, este determinará o restante da diferenciação masculina por meio dos hormônios por ele produzidos (MOORE, 1978).

As células de Sertoli produzem o chamado hormônio anti-Mülleriano (HAM) a partir da 7ª. semana. Trata-se de uma glicoproteína de alto peso molecular (145.000 daltons) que induz a regressão dos ductos de Müller por auto-digestão por enzimas lisossômicas. Assim, nos indivíduos do sexo masculino esses ductos são encontrados

apenas como resquícios embrionários representados pelo utrículo prostático e apêndices testiculares (JOSSO, 1992a,b).

A ação do HAM tem diversas peculiaridades. Ele não age por via circulatória, e sim por difusão célula a célula ligando-se ao seu receptor específico, de modo que cada testículo é responsável pela destruição do ducto de Müller de seu lado. Além disso, há uma época específica para sua produção, já que esses ductos somente são sensíveis ao HAM até a 8ª. semana. A partir de então, sua diferenciação em genitais internos femininos ocorre mesmo em presença desse hormônio. Finalmente, uma vez iniciado o processo de degeneração dos ductos de Müller pela ação do HAM, ele segue até o final mesmo com o desaparecimento do testículo (JOSSO *et al.*, 1991; JOSSO, 1992a,b).

A partir da 8ª./9ª. semana, as células de Leydig fetais produzem a testosterona, que estabiliza os ductos de Wolff e permite sua diferenciação em epidídimo, canal deferente, vesícula seminal e ducto ejaculatório. A ação local da testosterona sobre os ductos de Wolff é muito mais importante que sua ação sistêmica, como se pode deduzir do fato de que embriões femininos expostos a andrógenos intra-útero não apresentam conductos genitais internos masculinos (GRUMBACH & DUCHARME, 1960; MOORE, 1978; GRUMBACH, 1996). Estudos recentes demonstraram que a testosterona é secretada para dentro dos ductos de Wolff, havendo, portanto, uma concentração local biologicamente ativa (TONG *et al.*, 1996). A próstata surge por volta da 10ª. semana a partir de evaginações endodérmicas da uretra pélvica (MOORE, 1978).

A testosterona é convertida pela enzima 5α-redutase 2 em dehidrotestosterona, que viriliza os rudimentos genitais externos entre a 9ª. e a 12ª. semanas de gestação. A partir da 9ª. semana, por ação desse hormônio, o tubérculo genital torna-se a glande do pênis e inicia-se o alongamento do falo juntamente com as pregas genitais, formando, assim, o corpo do pênis. A fusão das pregas genitais no sentido distal ao longo da superfície ventral do pênis faz com que o sulco uretral recoberto por endoderma dê origem à uretra peniana. O orifício uretral externo desloca-se progressivamente em direção à glande, onde uma invaginação ectodérmica dá origem a um novo sulco, contínuo com o sulco uretral do pênis. O fechamento desse sulco move o orifício uretral

para a extremidade da glande, unindo, assim, as porções balânica e peniana da uretra por volta da 12ª. semana de gestação, época em que se inicia a formação do prepúcio. Este envolve quase por completo a glande em torno da 14ª. semana. A bolsa escrotal origina-se da fusão das saliências labioescrotais na linha média. A migração dos testículos para a bolsa escrotal só se iniciará, porém, por volta da 28ª. semana, completando-se, via de regra, em torno da 32ª. semana. (MOORE, 1978).

A gonadotrofina coriônica estimula as células de Leydig a produzirem andrógenos até o final da primeira metade da gestação; a partir de então, e até o termo, esse estímulo é feito pelas gonadotrofinas hipofisárias do próprio feto, em especial o hormônio luteinizante (JOSSO, 1992b), que é portanto, fundamental para a completa descida testicular bem como para o crescimento peniano.

Em indivíduos geneticamente femininos, com a não produção de HAM, os ductos de Müller se desenvolvem para formar o trato genital feminino (útero, trompas e parte superior da vagina). A não produção e ação da testosterona determinam, por sua vez, a regressão dos ductos de Wolff em vestígios embrionários (epoóforo, paraóforo e ducto de Gartner). Na ausência da dehidrotestosterona, o tubérculo genital dá origem ao clitóris, as pregas genitais aos pequenos lábios, as saliências labioescrotais aos grandes lábios, e o seio urogenital à porção inferior da vagina (MOORE, 1978).

AMBIGÜIDADE GENITAL: DEFINIÇÃO

A detecção da ambigüidade genital será tanto mais fácil quanto mais grave for sua apresentação. Portanto, quando as alterações são discretas, é maior a chance de que não seja feito um diagnóstico precoce de grande importância. Assim sendo, os critérios bastante amplos de definição de ambigüidade genital elaborados por DANISH (1984) têm sido internacionalmente adotados. Segundo esses critérios, uma genitália pode ser considerada ambígua quando houver um ou mais dos seguintes achados ao exame clínico:

em uma genitália de aparente aspecto masculino:

- gônadas não palpáveis;
- gônadas pequenas (maior diâmetro inferior a 0,8 cm);
- microfalo (medida longitudinal do falo esticado menor que 2,5 desvios-padrão da média do tamanho normal para a idade);
- presença de hipospadia;
- presença de massa inguinal.

em uma genitália de aparente aspecto feminino:

- gônada(s) palpável(is);
- clitoromegalia (diâmetro clitoriano superior a 0,6 cm);
- algum grau de fusão das saliências labioescrotais;
- presença de massa inguinal.

CLASSIFICAÇÃO DOS DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL

A classificação dos distúrbios da diferenciação sexual vem acompanhando, logicamente, toda a evolução do conhecimento nessa área. Embora a nomenclatura utilizada para definir a maior parte das anomalias seja universal, os critérios para reuni-las em diferentes grupos é variável. E assim sendo, são várias as classificações encontradas na literatura pertinente. Todas elas podem ser questionadas em alguns de seus aspectos, como conseqüência da enorme complexidade do assunto.

À medida em que se amplia o conhecimento, ora abre-se um leque, descobrindo-se que algumas anomalias antes consideradas únicas eram, na verdade, um grupo heterogêneo que antes estava abrigado sob uma única denominação, como no caso das disgenesias gonadais, ora reúne-se numa mesma entidade anomalias antigamente consideradas distintas e que representavam, na verdade, uma expressividade variável de uma mesma doença básica, como no caso das resistências ou insensibilidades androgênicas.

Portanto, a classificação dos distúrbios da diferenciação sexual está longe de ser um assunto encerrado. Com toda certeza a biologia molecular vai determinar a modificação de diversas peças desse grande quebra-cabeça, e deve levar poucos anos para que consideremos nossos dogmas e nossas dúvidas atuais tão fora de propósito quanto os que encontramos em livros escritos nas décadas de 60 e 70.

Seguem abaixo as principais causas de ambigüidade genital em indivíduos portadores de cariótipo 46,XY:

1. DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO GONADAL

1.1. Disgenesia Gonadal Incompleta ou Parcial: atualmente, utiliza-se este termo para indivíduos com cariótipo 46,XY com diferenciação testicular parcial e ambigüidade genital. A histologia gonadal é variável, porém freqüentemente observam-se túbulos seminíferos hipoplásicos associados a áreas semelhantes ao estroma ovariano. A genitália interna consiste de combinação de derivados de Wolff e Müller. Existe risco de transformação neoplásica de ambas as gônadas para, particularmente, gonadoblastoma, ou até seminomas e disgerminomas. 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 de Wolff. Essa doença é considerada uma variante da disgenesia gonadal pura XY de herança recessiva ligada ao cromossomo X ou autossômica dominante com expressão limitada ao sexo masculino. Ambas as formas, completa e incompleta (ou parcial), podem ocorrer na mesma família (BERKOVITZ *et al.*, 1991).

1.2. Disgenesia Gonadal Mista: é um diagnóstico histopatológico, caracterizado pela presença de tecido testicular de um lado e gônada disgenética (ou gônada "em fita", constituída apenas por tecido conjuntivo, sem células da linhagem germinativa) do outro. O testículo é, em geral, anormal do ponto de vista estrutural e funcional, apresentando, na puberdade, aplasia germinativa com túbulos seminíferos compostos apenas por células de Sertoli. O cariótipo freqüentemente encontrado é o mosaicismo 45,X/46,XY, porém em poucos casos pode-se encontrar o cariótipo 46,XY. A genitália interna é constituída por vagina, útero e trompa, geralmente do lado da gônada disgenética, e, em alguns

casos, por derivados de Wolff do lado testicular. A genitália externa pode apresentar desde um aspecto masculino normal até um feminino normal, porém na maior parte dos casos há ambigüidade genital de diversos graus. Alguns pacientes, pela linhagem 45,X, apresentam anomalias freqüentes na síndrome de Turner, em especial baixa estatura e anomalias renais. Existe risco de transformação neoplásica de ambas as gônadas para, particularmente, gonadoblastoma, ou até seminomas e disgerminomas. 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 de Wolff (CHANG *et al.*, 1990; BERKOVITZ *et al.*, 1991).

1.3. Disgenesia Gonadal associada a Doença Degenerativa Renal: uma das formas, a síndrome de Denys-Drash, associa ambigüidade genital a testículos disgenéticos em indivíduos 46,XY com doença degenerativa renal (síndrome nefrótica, nefrite intersticial ou estágios finais de uremia de etiologia desconhecida), além de hipertensão e freqüentemente tumor de Wilms. Tanto os testículos quanto os rins são disgenéticos com predisposição para transformação maligna (PELLETIER *et al.*, 1991; COPPES *et al.*, 1993). Na outra forma, a síndrome *WAGR* (tumor de **W**ilms, **a**niridia, malformação genitourinária e/ou **g**onadoblastoma, e **r**etardo mental), os indivíduos do sexo masculino apresentam, na maioria das vezes, algum grau de ambigüidade genital (ROSE *et al.*, 1990). Ambas as síndromes ocorrem por mutações de ponto (Denys-Drash) ou deleções (WAGR) do gene supressor do tumor de Wilms (WT1) localizado no braço curto do cromossomo 11 (ROSE *et al.*, 1990; PELLETIER *et al.*, 1991; COPPES *et al.*, 1993). Também associada a mutações deste gene é a síndrome de Fraiser, que se caracteriza por gônadas disgenéticas, freqüentemente com gonadoblastoma, insuficiência renal e hipogonadismo, de herança autossômica dominante (BERTA *et al.*, 1992).

1.4. Disgenesia Gonadal associada a Displasia Camptomélica: trata-se de uma displasia óssea de herança autossômica recessiva que se caracteriza por retardo de crescimento pré e pós-natal, membros curtos, arqueamento do fêmur e tibia, malformações do sistema nervoso central, problemas respiratórios e de alimentação, além de outras malformações, com evolução letal no período neonatal ou na primeira

infância. Cerca de 60% dos pacientes 46,XY apresentam sexo reverso com fenótipo feminino completo, sendo a genitália interna e externa femininas. Alguns casos exibem ambigüidade genital. As gônadas se assemelham macroscopicamente a ovários, porém histologicamente contêm elementos tanto do estroma testicular como do ovariano, não caracterizando, porém, um ovotestis. O gene responsável por essa doença é o SOX9, localizado em 17q24.1-q25.1. Esse gene está envolvido tanto na condrogênese quanto no desenvolvimento testicular. Portanto, mutações no SOX9 não acarretam disgenesia gonadal na ausência de displasia camptomélica (TOMMERUP *et al.*, 1993; WAGNER *et al.*, 1994).

1.5. Hermafroditismo Verdadeiro (HV): é um diagnóstico histopatológico, com a demonstração de tecido testicular (com pelo menos túbulos seminíferos e/ou espermatozóides) e ovariano (com pelo menos folículos) presentes num mesmo indivíduo. É denominado lateral quando há ovário de um lado e testículo do outro, bilateral quando há tecido ovariano e testicular (ovotestis) de ambos os lados, e unilateral quando há ovotestis apenas de um lado, independentemente da gônada contra-lateral. Cerca de 60% dos casos apresentam cariótipo 46,XX, 20% mosaicos ou quimeras, e 10 a 20% 46,XY. Nenhuma característica clínica diferencia claramente o hermafrodita verdadeiro das outras causas de ambigüidade genital. O espectro de apresentações clínicas vai desde o homem normal e fértil até a mulher normal e fértil. No entanto, na maioria dos casos relatados existe ambigüidade genital, sendo mais freqüente a genitália predominantemente masculina. A partir da puberdade, porém, mais de 3/4 desenvolvem aumento de mamas, e cerca de 50% menstruam. Quanto à genitália interna, há uma variação ampla de apresentação, à semelhança da genitália externa. Quando diagnosticados em idade precoce, a melhor opção de criação é o sexo feminino, tentando-se quando possível preservar a porção ovariana das gônadas, com possibilidade de puberdade feminina espontânea, bem como fertilidade (NIEKERK & RETIEF, 1981; KROB *et al.*, 1994).

2. PSEUDO-HERMAFRODITISMO MASCULINO: termo usado para caracterizar indivíduos com cariótipo 46,XY e virilização ausente ou deficiente dos genitais externos, e, eventualmente, também dos internos. Suas gônadas são representadas por testículos; quando estes não estão presentes, como nas síndromes de regressão testicular, sua existência prévia é deduzida pela inibição do desenvolvimento dos ductos de Müller. O sexo de criação será determinado pelo grau de virilização da genitália externa, possibilidade de puberdade espontânea e de fertilidade (CONTE & GRUMBACH, 1996).

2.1. Deficiência de produção de testosterona:

2.1.1.hipogonadismo hipogonadotrófico: a deficiência de hormônio luteinizante pode ser isolada (herança autossômica recessiva) ou associada a outras deficiências hormonais hipotálamo-hipofisárias, e ainda primária ou secundária a doenças do sistema nervoso central, em especial malformações de linha média (STYNE, 1991). O hipogonadismo hipogonadotrófico pode se associar a hiposmia ou anosmia (por hipo ou aplasia dos lobos olfatórios), caracterizando a síndrome de Kallmann, entidade genética heterogênea cujo padrão de herança mais freqüente é o recessivo ligada ao X, com gene localizado em Xp22.3, e de manifestação clínica também heterogênea, podendo-se encontrar em uma mesma família pacientes com apenas comprometimento da função gonadal, outros com apenas distúrbios do olfato, e outros com associação dessas duas anomalias. Visto que a produção de testosterona pelas células de Leydig na primeira metade da gestação é estimulada pela gonadotrofina coriônica humana, e na segunda metade da gestação pelo hormônio luteinizante produzido pela hipófise fetal, o hipogonadismo hipogonadotrófico pode acarretar criptorquidia, micropênis e hipoplasia escrotal (SCHWANZEL-FUKUDA *et al.*, 1989; HARDELIN *et al.*, 1993).

2.1.2. hipoplasia ou agenesia das células de Leydig (insensibilidade testicular à gonadotrofina coriônica humana e ao hormônio luteinizante): resultam em deficiente produção de testosterona, de cuja magnitude depende a gravidade da ambigüidade genital. A genitália interna é masculina ou ausente, e a histologia gonadal

mostra testículo com ausência ou deficiência marcada das células de Leydig. Laboratorialmente, os níveis de testosterona são baixos e não respondem ao estímulo com gonadotrofina coriônica humana, e os níveis de hormônio luteinizante são elevados. O tratamento depende da idade de diagnóstico e do grau de virilização da genitália externa, porém sempre que possível o sexo de escolha deve ser o feminino. Já foram descritas a herança autossômica dominante com expressão limitada ao sexo masculino, e as mutações do gene do receptor de hormônio luteinizante-gonadotrofina coriônica humana, localizado em 2p21 (KREMER *et al.*, 1995; LATRONICO *et al.*, 1996).

2.1.3. erros inatos da biossíntese de testosterona: são cinco os níveis enzimáticos que podem estar afetados na síntese de testosterona, a partir do colesterol. É freqüente a presença de uma vagina curta que desemboca em fundo cego; os testículos são geralmente criptorquídicos, e, a partir da puberdade, haverá hiperplasia de células de Leydig devido ao excesso de hormônio luteinizante. Há diminuição da espermatogênese devido a ausência de testosterona intratesticular necessária tanto para iniciar quanto para manter a espermatogênese, e lesão de túbulos seminíferos, devido ao excesso de hormônio folículo estimulante. A genitália externa poderá se apresentar desde tipicamente feminina até com qualquer grau de ambigüidade. Dos cinco passos enzimáticos envolvidos até a produção de testosterona, três são comuns à via de síntese do cortisol (P450scc ou 20-22 desmolase, P450c17 ou 17-hidroxilase e 3ß-OH-esteróide desidrogenase) e são, portanto, formas de hiperplasia congênita das supra-renais. As outras duas enzimas (P450c17 ou 17-20 desmolase e 17ß-OH esteróide oxidorredutase tipo 3) são exclusivas da via de síntese de testosterona. Todas são doenças de herança autossômica recessiva. O sexo de escolha é o masculino, dependendo, logicamente, do grau de virilização da genitália externa (CONTE & GRUMBACH, 1996).

2.1.3.1. deficiência da 20-22 desmolase ou P450scc: essa enzima é necessária para conversão do colesterol em pregnenolona, o primeiro passo da esteroidogênse supra-renal e gonadal. Portanto, sua deficiência acarretará comprometimento de síntese de glicocorticóide, mineralocorticóide e andrógenos. Do ponto de vista anatomopatológico, as supra-renais apresentam-se com importante acúmulo de lípides (hiperplasia lipoídica supra-renal). Os afetados do sexo masculino

apresentam fenótipo feminino, e as crises de perda de sal são graves e precoces. Deficiências enzimáticas parciais causam ambigüidade genital no sexo masculino e perda de sal leve e tardia. Laboratorialmente, observa-se todos os precursores adrenais e gonadais diminuídos, quer após estímulo com gonadotrofina coriônica humana, quer com hormônio adrenocorticotrófico, e aumento da atividade de renina plasmática. O gene que codifica essa enzima está localizado no cromossomo 15, porém, surpreendentemente nenhuma mutação desse gene foi descrita até hoje. As mutações têm sido encontradas no gene que codifica a proteína reguladora aguda da esteroidogênese (**StAR** = **S**teroidogenic **A**cute **R**egulatory protein) localizado em 8p11.2; é essa proteína quem facilita o transporte do colesterol para dentro da mitocôndria (LIN *et al.*, 1995; CONTE & GRUMBACH, 1996).

2.1.3.2. deficiência da 3ß-OH-esteróide desidrogenase tipo 2: essa enzima é necessária à conversão da pregnenolona e 17-OH-pregnenolona em progesterona e 17-OH-progesterona, e da dehidroepiandrosterona em delta-4-androstenediona. Portanto, sua deficiência causará comprometimento da síntese de glicocorticóides, mineralocorticóides e andrógenos. Os afetados do sexo masculino podem apresentar vários graus de ambigüidade genital, e perda de sal nos primeiros meses de vida. Têm sido descritas, também, deficiências parciais dessa enzima. Laboratorialmente, caracterizam-se por altos níveis séricos de dehidroepiandrosterona e aumento da atividade de renina plasmática. O gene localiza-se em 1p13.1, e são as mutações no gene da 3ß-OH-esteróide desidrogenase tipo 2 que resultam no comprometimento da esteroidogênese adrenal e gonadal. As características puberais normais em vários destes casos são explicadas pela presença normal da 3ß-OH-esteróide desidrogenase tipo 1, que age em tecidos periféricos (MENDONÇA *et al.*, 1994; RUSSELL *et al.*, 1994; CONTE & GRUMBACH, 1996).

2.1.3.3. deficiência da 17-hidroxilase/17-20 desmolase ou P450c17: uma única enzima tem tanto atividade 17-hidroxilase quanto 17-20 desmolase em tecido adrenal e gonadal. A 17-hidroxilase é necessária para a conversão da pregnenolona e da progesterona em 17-OH pregnenolona e 17-OH progesterona, respectivamente; portanto, sua deficiência acarreta excesso de produção

mineralocorticóide e comprometimento da síntese de glicocorticóide e andrógenos. Os afetados do sexo masculino apresentam fenótipo feminino ou variados graus de ambigüidade genital e hipertensão arterial. Formas parciais foram também descritas. Laboratorialmente apresentam altos níveis de corticosterona, desoxicorticosterona e atividade de renina plasmática baixa, e baixos níveis séricos de glicocorticóides e andrógenos, mesmo após estímulo com gonadotrofina coriônica humana ou hormônio adrenocorticotrófico. A 17-20 desmolase é necessária para conversão da 17-OH pregnenolona e da 17-OH progesterona em dehidroepiandrosterona e delta-4-androstenediona respectivamente. Portanto, sua deficiência acarreta apenas comprometimento da síntese de andrógenos. Clinicamente, os pacientes são semelhantes aos que apresentam a deficiência da 17-hidroxilase, porém com hipertensão arterial mais leve e sem hiperplasia congênita das supra-renais. Laboratorialmente também se assemelham à deficiência da 17-hidroxilase, porém com níveis mais baixos de mineralocorticóides e níveis mais elevados de 17-OH progesterona. O gene da P450c17 localiza-se em 10q23.4 e várias mutações já foram descritas, caracterizando formas completas ou parciais, isoladas ou com associação das duas deficiências enzimáticas. O sexo de criação preferencial é o masculino, porém na dependência do grau de virilização da genitália externa (YANASE *et al.*, 1991; CONTE & GRUMBACH, 1996).

2.1.3.4. deficiência da 17ß-OH-esteróide oxidorredutase tipo 3: essa enzima, expressa primariamente nos testículos, é necessária para a conversão da delta-4-androstenediona em testosterona, e portanto sua deficiência acarreta apenas defeito de síntese de testosterona com acúmulo de seus precursores, especialmente a delta-4-androstenediona, e também a estrona. Os pacientes apresentam variados graus de ambigüidade genital externa, com progressiva virilização na puberdade e ginecomastia. Formas parciais da doença já foram descritas, bem como várias mutações em seu gene localizado em 9q22. O sexo de criação é preferencialmente o masculino (ANDERSSON *et al.*, 1996; CONTE & GRUMBACH, 1996).

2.2. Defeito do metabolismo dos andrógenos nos tecidos periféricos

2.2.1. deficiência de 5α-redutase tipo 2: essa enzima é necessária para a conversão da testosterona em dehidrotestosterona, responsável pela diferenciação da genitália externa masculina na vida fetal, e, durante a puberdade, necessária para o desenvolvimento de pêlos sexuais e da próstata, e ainda de acne e recessão temporal do cabelo. Portanto, a deficiência dessa enzima causa, em indivíduos 46,XY, ambigüidade genital externa acentuada, geralmente com hipospadia grave (períneo-escrotal pseudo-vaginal), falo pequeno, e seio urogenital com vagina em fundo cego e os testículos diferenciam-se normalmente, porém a próstata é rudimentar. Esses pacientes, quando não diagnosticados precocemente, são criados freqüentemente como mulheres, mas na puberdade virilizam (sem as características dependentes de dehidrotestosterona e sem ginecomastia) e adquirem, na maioria das vezes, identidade masculina. É doença de herança autossômica recessiva e ocorre devido a mutações do gene da 5α-redutase tipo 2, localizado no cromossomo 2. O diagnóstico é suspeitado pela relação testosterona/dehidrotestorena aumentada após teste de estímulo com gonadotrofina coriônica humana, e confirmado pela diminuição da atividade *in vitro* da 5α-redutase em pele de região genital, pelo decréscimo da conversão de testosterona administrada *in vivo* para dehidrotestosterona, e/ou aumento da relação 5ß/5α dos esteróides urinários derivados de testosterona, ou ainda por estudo molecular do gene da 5α-redutase tipo 2. O sexo de criação deve ser o masculino com correção precoce da hipospadia, e uso de testosterona ou dehidrotestosterona para induzir o crescimento do falo (ODAME *et al.*, 1992; WILSON, GRIFFIN, RUSSEL, 1993; RUSSEL & WILSON, 1994).

2.2.2. insensibilidade androgênica ou defeito do receptor de andrógeno:

2.2.2.1. insensibilidade (ou resistência) completa aos andrógenos (ou síndrome de feminização testicular ou síndrome de Morris): doença de herança recessiva ligada ao cromossomo X. O gene do receptor de

andrógenos localiza-se em Xq11-Xq12 e suas alterações já descritas incluem deleção ou mutações de ponto na região de domínio da ligação esteróide ou de ativação da transcrição. Nesses casos, os testículos secretam normalmente testosterona na vida fetal e na puberdade. Porém, tanto a genitália quanto os outros orgãos-alvo não respondem aos andrógenos nessas fases, causando diferenciação feminina da genitália externa e do seio urogenital, além de feminização na puberdade. O eixo hipotálamo-hipofisário também não tem sensibilidade aos andrógenos, levando a um aumento do hormônio luteinizante, o que causará, na puberdade, grandes incrementos da produção de estradiol pelo testículo (daí a denominação fisiopatológica correta de *feminização testicular*). Tais pacientes se apresentam, portanto, com ausência de ductos genitais internos (os ductos de Wolff regridem pela não ação da testosterona, e os de Müller pela ação normal do hormônio anti-Mülleriano), vagina em fundo cego e genitália externa feminina normal, exceto pela freqüente presença de gônadas inguinais ou labioescrotais. Na puberdade, a distribuição de pêlos (geralmente escassos) e gordura é ginecóide, as mamas têm características femininas normais, e as pacientes apresentam amenorréia primária. A opção sexual é indubitavelmente feminina, porém há controvérsias quanto à época ideal para orquiectomia, se precoce pelo risco de malignização, ou se após a puberdade pela possibilidade de desenvolvimento espontâneo de caracteres sexuais secundários (GRIFFIN, 1992; GRIFFIN *et al.*, 1995; QUIGLEY *et al.*, 1995; PINSKY *et al.*, 1996).

2.2.2.2. insensibilidade (ou resistência) parcial (ou incompleta) aos andrógenos (ou síndrome de Reifenstein): doença de herança recessiva ligada ao X, visto que o gene é o mesmo da forma completa, porém as mutações causam um defeito parcial na função do receptor de andrógenos. Os pacientes podem apresentar os mais variados graus de masculinização da genitália externa e interna, e do seio urogenital. Os testículos podem ser criptorquídicos ou de localização normal, e freqüentemente ocorre ginecomastia na puberdade, além do comprometimento da espermatogênese. Laboratorialmente, também há aumento de hormônio luteinizante, testosterona e estradiol. A opção do sexo vai depender do grau de virilização da genitália externa, e, portanto, da gravidade da resistência androgênica (GRIFFIN, 1992; GRIFFIN *et al.*, 1995; QUIGLEY *et al.*, 1995; PINSKY *et al.*, 1996).

2.2.2.3. insensibilidade (ou resistência) leve aos andrógenos: a apresentação clínica pode ser de homens, geralmente criptorquídicos, com virilização normal na puberdade, algum grau de ginecomastia, mas caracteristicamente azoospêrmicos (síndrome do homem infértil) ou de homens com virilização deficiente, ginecomastia, porém com fertilidade normal (AIMAN *et al.*, 1979; GRIFFIN, 1992).

2.3. Persistência dos ductos de Müller: ocorre ou por uma deficiência de produção do hormônio anti-Mülleriano (gene em 19p) ou por defeito do receptor do mesmo hormônio (gene em 12q). Clinicamente, a maioria desses pacientes se apresentam com criptorquidia e hérnia inguinal, que contém, geralmente, trompas, útero e o testículo (chamada de *hernia uteri inguinalis*), com o restante da genitália externa masculina normal. O grau de desenvolvimento dos ductos de Müller é variável e, freqüentemente, assimétrico. A função testicular é normal, porém alguns pacientes podem desenvolver neoplasia testicular após a puberdade. O tipo de defeito genético pode ser suspeitado pelo nível sérico do hormônio anti-Mülleriano: se baixo ou indetectável, o defeito é decorrente de mutação do gene que codifica o hormônio; se elevado, mutação no seu receptor. Enquanto várias mutações do gene do hormônio anti-Mülleriano já foram descritas, apenas uma mutação, a deleção de 27 pares de base no exon 10, corresponde a 60% das alterações encontradas no gene do seu receptor. São doenças de herança autossômica recessiva (IMBEAUD *et al.*, 1996; JOSSO *et al.*, 1993b; JOSSO *et al.*, 1997).

2.4. Síndromes de regressão testicular bilateral: o fenótipo vai depender da fase do desenvolvimento embriológico em que ocorreu a regressão testicular. A prova da existência prévia de tecido testicular é, no mínimo, a regressão dos derivados de Müller. Esses pacientes se caracterizam, portanto, pela ausência de gônadas, de útero, trompas, e da porção superior da vagina, e pela presença de um retardo puberal com hipogonadismo hipergonadotrófico (JOSSO & BRIAND, 1980). De acordo com a época em que ocorreu a regressão testicular, pode ser classificada em:

2.4.1. agonadismo: a regressão testicular ocorre entre a 8ª. e a 12ª. semanas de gestação, e com isso na genitália interna observam-se ductos de Wolff

rudimentares ou hipoplásicos, e a genitália externa é geralmente feminina. O sexo de escolha de criação é o feminino (CLEARY *et al.*, 1977; MACIEL-GUERRA *et al.*, 1991).

2.4.2. síndrome dos testículos rudimentares: a regressão testicular ocorre entre a 14ª. e a 20ª. semanas de gestação, tendo havido o tempo suficiente para melhor desenvolvimento dos ductos de Wolff e, também, para virilização parcial da genitália externa, que, geralmente, se apresenta com micropênis, criptorquidia e graus leves de hipospadia. O sexo de escolha de criação vai depender da gravidade da ambigüidade genital (JOSSO & BRIAND, 1980).

2.4.3. anorquia: a regressão testicular ocorre após a 20ª. semana de gestação. Nessa fase, a produção de testosterona e dehidrotestosterona é necessária apenas para crescimento peniano e descida testicular. Portanto, dependendo da época da regressão teremos variados graus de micropênis e criptorquidia. O sexo de escolha de criação é o masculino (CONNORS & STYNE, 1985).

2.5. Interferência transplacentária da biossíntese de testosterona por drogas ingeridas pela mãe (iatrogênico): as drogas são basicamente progestágenos, e usadas freqüentemente com o objetivo, mal sucedido, de abortamento. A hipospadia é a manifestação mais comum, mas a dose, a potência, e a época do uso são fatores determinantes da gravidade da ambigüidade genital e da definição do sexo social. São duas as hipóteses fisiopatológicas principais: inibição da 3ß-OH-esteróide desidrogenase do testículo fetal ou ação direta no primórdio da genitália externa, interferindo no processo de invaginação ectodérmica da glande peniana (AARSKOG, 1979; DRISCOLL & TAYLOR, 1980).

2.6. Secundário a quadros sindrômicos:

2.6.1. com herança mendeliana: destacando-se, entre outros:

2.6.1.1. síndrome ATR-X: caracteriza-se pela associação com alfa-talassemia e retardo mental, com herança ligada ao X. São freqüentes os dismorfismos faciais (como telecanto, epicanto e hipoplasia da porção média da face) e as alterações geniturinárias (agenesia renal, hidronefrose e ambigüidade genital). É resultado de mutações do gene helicase-2 ligado ao cromossomo X (Xq13), membro de um subgrupo da superfamília de helicase, que inclui proteínas com função de recombinação e reparação de DNA, além de transcrição (HOUDAYER *et al.*, 1993).

2.6.1.2. síndrome RSH (ou Smith-Lemli-Opitz): caracteriza-se por retardo de crescimento e mental, microcefalia, hidrocefalia, ausência de corpo caloso, dismorfismos faciais (como ptose palpebral, epicanto, catarata, nariz em sela, micrognatismo e palato fendido), sindactilia, alterações geniturinárias (doença cística renal, hidronefrose, hipoplasia renal, ambigüidade genital), cardiopatia congênita (Tetralogia de Fallot, ventrículo único), e malformações gastrintestinais (distúrbios da deglutição, refluxo gastroesofágico e estenose de piloro). É doença de herança autossômica recessiva, e em vários casos encontra-se deleção parcial do cromossomo 7. Laboratorialmente, os pacientes apresentam baixo nível sérico e fecal de colesterol e acúmulo de 7-dehidrocolesterol, secundários a um defeito da síntese do colesterol, provavelmente por deficiência da 7-dehidrocolesterol redutase. A sobrevida maior com melhor prognóstico de crescimento e desenvolvimento neurológico e socialização está diretamente ligada à administração oral de altas doses de colesterol a esses pacientes (TINT *et al.*, 1995).

2.6.1.3. síndrome FG (ou Opitz-Kaveggia): caracteriza-se por retardo de crescimento e mental, hipotonia, convulsões, agenesia parcial de corpo caloso, macrocefalia, dismorfismos faciais (como telecanto, hipertelorismo ocular e orelhas dismórficas), surdez neurossensorial, alterações gastrintestinais (constipação, megacólon, ânus imperfurado), cardíacas, e criptorquidia. É de herança recessiva ligada ao X (OPITZ *et al.*, 1988).

2.6.1.4. síndrome G/BBB tipo I: caracteriza-se por defeitos de linha média, tais como: palato fendido, hipospadia, agenesia de corpo caloso, anomalias

laríngeas, esofágicas e cardíacas, e retardo de desenvolvimento neurológico. É doença de herança ligada ao X, com gene localizado em Xp22 (ROBIN *et al.*, 1995).

2.6.1.5. síndrome G/BBB tipo II: caracteriza-se por hipertelorismo ocular, telecanto, fenda laringotraqueoesofágica, labial, palatina, e de úvula, dificuldade de deglutição, choro rouco, hipospadia, criptorquidia, retardo mental e anomalias cardíacas. É de herança autossômica dominante com gene localizado em 22q11.2. O fenótipo dos tipos I e II é muito semelhante, e o diagnóstico diferencial entre elas necessita da avaliação molecular (ROBIN *et al.*, 1995).

2.6.1.6. síndrome de Aarskog: caracteriza-se por hipertelorismo ocular, braquidactilia e escroto em cachecol, associados a baixa estatura, hipodontia, problemas ortodônticos, leve *pectus escavatum*, hérnia inguinal e umbilical, e criptorquidia. É doença de herança autossômica dominante ou ligada ao X (AARSKOG, 1970).

2.6.2. sem herança mendeliana: são vários os quadros com associação de malformações complexas ou não que se acompanham de ambigüidade genital em indivíduos do sexo masculino (JONES, 1988).

2.6.3. quadros com malformações complexas não esclarecidos.

2.7. Idiopático: apesar de uma ampla e adequada avaliação laboratorial de todos os casos de pseudo-hermafroditismo masculino, uma proporção importante não tem sua etiologia esclarecida, variando de 25 a 50%, o que evidencia as dificuldades de diagnóstico e de conduta a serem tomadas nesses casos (BERKOVITZ *et al.*, 1984).

A ABORDAGEM DIAGNÓSTICA DOS CASOS COM AMBIGÜIDADE GENITAL E CARIÓTIPO 46,XY

Uma vez detectada a ambigüidade genital, a obtenção de dados de anamnese, de exame físico, de laboratório, anatomopatológicos e radiológicos, bem como a avaliação psicológica da criança (se possível, dependendo da faixa etária) e de seus familiares quanto à identidade sexual já presente são fundamentais para a correta orientação do caso.

Quando se trata de uma criança ainda sem registro civil, a família deve ser imediatamente comunicada de que existe uma anormalidade genital, que é necessária a realização de exames para esclarecimento diagnóstico, e, portanto, o registro civil deverá ser retardo até a definição do caso. Deve-se utilizar somente termos embriológicos na descrição da genitália externa, interna e gônadas na conversa com os pais, evitando, com isso, demonstrar alguma tendência de definição do sexo naquele momento. A cada passo da investigação, a família deve ser informada do que está ocorrendo, para entender a necessidade dos inúmeros exames a serem realizados. O objetivo é definir o sexo de criação e conseguir um diagnóstico etiológico preciso, a partir do qual sejam estabelecidas as possibilidades de puberdade e fertilidade espontâneas, e os riscos de neoplasias associadas e de recorrência familial. Sabe-se, no entanto, que um razoável número de casos não terá sua etiologia determinada, devendo, porém haver uma conduta definida quanto ao sexo de criação.

A abordagem diagnóstica dos casos de distúrbios da diferenciação sexual, entre eles os com cariótipo 46,XY, compreende (DAMIANI, 1989; WITCHEL & LEE, 1996):

1. ANAMNESE: deve-se investigar história materna de uso de medicamentos; consangüinidade entre os pais; história de casos semelhantes na família, ou de atraso ou avanço puberal, infertilidade, hipertensão arterial, ou ainda mortes inexplicadas nos primeiros meses de vida.

2. EXAME FÍSICO: é necessário avaliar o estado nutricional e de hidratação, pressão arterial, pilificação corpórea, acne, estadiamento puberal e dismorfismos ou malformações, principalmente anorretais e de coluna terminal. Apesar das ***características da genitália externa não definirem em qualquer caso o diagnóstico etiológico***, um cuidado especial deve ser dado ao exame dos genitais externos, o que pode ser importante na priorização dos exames laboratoriais. É fundamental a caracterização dos seguintes dados, podendo a genitália externa ser classificada de acordo com PRADER (1954) (Figura 1):

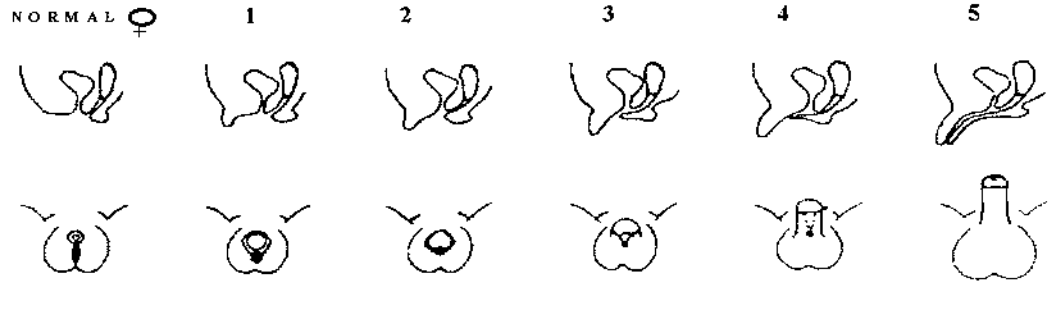
2.1. tamanho do falo em relação às medidas consideradas normais;

2.2. posicionamento do meato uretral, abertura vaginal, ou do seio urogenital;

2.3. grau de fusão, pigmentação, e enrugamento das saliências labioescrotais;

2.4. presença de massas inguinais;

2.5. localização e tamanho das gônadas.



Grau 1 = genitália de aspecto feminino, com somente aumento do falo;
Grau 2 = maior aumento do falo, associado a fusão posterior das saliências labioescrotais, sem seio urogenital;
Grau 3 = importante aumento do falo, associado a fusão quase completa das saliências labioescrotais, e presença de seio urogenital com abertura perineal;
Grau 4 = falo de aspecto peniano, associado a fusão completa das saliências labioescrotais, e presença de seio urogenital com abertura perineal na base do falo;
Grau 5 = falo de aspecto peniano bem desenvolvido, associado a fusão completa das saliências labioescrotais, e presença de seio urogenital com abertura no corpo do falo ou balânica;

Figura 1: Classificação dos graus de virilização da genitália externa feminina (PRADER, 1954).

3. EXAMES LABORATORIAIS: devem ser realizados segundo uma seqüência de investigação e de acordo com a faixa etária. Compreendem:

3.1. cariótipo: sempre que possível deve ser o primeiro exame a ser realizado para nortear a abordagem da ambigüidade genital. No entanto, em casos de hiperplasia congênita das supra-renais, forma perdedora de sal, nos quais o quadro clínico pode ser evidente, este exame pode ser realizado sem prioridade.

3.2. concentrações séricas de hormônio luteinizante, folículo-estimulante: as dosagens basais somente têm significado diagnóstico se realizadas até os 4 ou 6 primeiros meses de vida, quando ocorre uma estimulação fisiológica do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, ou em indivíduos durante a puberdade. Fora destas faixas etárias, as gonadotrofinas somente devem ser valorizadas quando elevadas: a persistência de níveis elevados de hormônio folículo-estimulante pode indicar a presença de tecido ovariano, ou de tecido testicular ausente ou disgenético, enquanto que o hormônio luteinizante elevado pode refletir um distúrbio da síntese de testosterona, insensibilidade androgênica ou defeito no receptor LH/hCG.

3.3. concentrações séricas de testosterona, dehidrotestosterona, estradiol, delta-4-androstenediona, dehidroepiandrosterona, progesterona: as dosagens basais somente têm valor nos primeiros meses de vida e na puberdade. Em crianças fora destas faixas etárias, para a avaliação funcional das células de Leydig é necessária a realização de estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG) e dosagem de testosterona e seus precursores, e dehidrotestosterona antes e após o teste de estímulo com hCG. Existem vários protocolos descritos na literatura com diferentes métodos de utilização do hCG e interpretação dos resultados (DAMIANI, 1989; GRANT *et al.*, 1976; RODRIGUES, TARDELLI & PIEROLA, 1998; SMALS *et al.*, 1979). Nos casos sem elevação dos níveis séricos da testosterona após o estímulo com hCG, é necessária a realização de teste de estímulo agudo com ACTH, com dosagem antes e após dos precursores de testosterona, para avaliação de casos de defeito de síntese de testosterona, acompanhados ou não de hiperplasia congênita das supra-renais.

3.4. concentrações séricas de aldosterona, atividade de renina plasmática, e eletrólitos (sódio e potássio): nos casos de hiperplasia congênita das supra-renais com deficiência ou excesso mineralocorticóide.

3.5. concentração sérica de hormônio anti-Mülleriano: especialmente nos pacientes com quadro clínico de persistência dos ductos de Müller, podendo indicar defeito de síntese deste hormônio, ou alteração no seu receptor. No entanto, tanto o hormônio anti-Mülleriano quanto a inibina B podem ser utilizados como marcadores de células de Sertoli, sendo o primeiro mais específico para indicar a presença de tecido testicular, já que a inibina B também é produzida pelo ovário (GROOME *et al.*, 1996; LONGUI *et al.*, 1998). Devido a correlação negativa do hormônio anti-Mülleriano com a testosterona, ele tem sido usado também na investigação de determinadas doenças que podem cursar com ambigüidade genital, como as insensibilidades androgênicas e as disgenesias gonadais (REY *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1997; REY *et al.*, 1999).

3.6. avaliação *in vitro* da ligação do andrógeno ao seu receptor, bem como da atividade da enzima 5α-redutase 2, a partir de cultura de fibroblasto de região genital: auxiliares no diagnóstico das insensibilidades aos andrógenos e da deficiência de 5α-redutase 2. A metodologia utilizada nestas avaliações é complexa e nem sempre acessível.

3.7. exames anatomopatológicos: são realizados para a definição dos distúrbios de diferenciação gonadal, e, em alguns casos, para confirmação de pseudo-hermafroditismo masculino, e para verificar a presença de neoplasias, principalmente gonadais, em pacientes de risco. As biópsias gonadais em indivíduos com ambigüidade genital e cariótipo 46,XY estão sempre indicadas quando o FSH encontra-se persistentemente elevado, e nos casos de ambigüidade genital com cariótipo 46,XY não esclarecidos após ampla investigação, para serem afastadas as hipóteses de distúrbios da diferenciação gonadal (hermafroditismo verdadeiro ou disgenesia gonadal). São ainda indicadas nos casos de aberração estrutural ou numérica dos cromossomos sexuais, nos

mosaicismos, e nos quimerismos para diagnóstico adequado dos distúrbios da diferenciação gonadal.

3.8. avaliação molecular: em alguns casos é necessária para elucidação diagnóstica, e em outros é fundamental para a conduta terapêutica, especialmente na indicação de gonadectomia. Devido à complexidade de sua realização, estas avaliações estão disponíveis somente em serviços ligados à pesquisa na área de diferenciação sexual.

4. EXAMES POR IMAGEM: são especialmente necessários, porém nem sempre conclusivos, para definição da genitália interna (útero, gônadas, próstata), presença de seio urogenital, associação com má formações do trato urinário, e para oferecer ao cirurgião elementos para o planejamento cirúrgico. Compreendem, principalmente na avaliação do abdome e da pelve: ultrassonografia; genitografia; tomografia computadorizada; ressonância nuclear magnética. Não deve ser descartada a necessidade de realização de cistoscopia ou laparoscopia.

5. TESTES TERAPÊUTICOS: geralmente realizados com testosterona, com o intuito de verificar o aumento do tamanho do falo, e, portanto, avaliando de forma grosseira a sensibilidade do receptor de andrógenos (GUTHRIE, SMITH & GRAHAM, 1973).

A DEFINIÇÃO DO SEXO DE CRIAÇÃO

Na grande maioria dos casos, o diagnóstico do sexo é realizado de forma correta e sem qualquer dificuldade verificando-se as características da genitália externa, na grande maioria dos casos. Entretanto, em situações patológicas esse diagnóstico somente pode ser alcançado se forem levados em conta outros dados. Na realidade, o diagnóstico correto do sexo depende da concordância da aparência dos genitais externos (sexo genital externo) com os genitais internos (sexo genital interno) e com as gônadas (sexo gonadal). Além disso, é importante que pacientes com testículos, genitais internos e externos masculinos apresentem o cariótipo 46,XY, do mesmo modo que aqueles com

ovários, genitais internos e externos femininos tenham o cariótipo 46,XX (sexo cromossômico). Não se pode deixar de levar em consideração a diferenciação hormonal (sexo endocrinológico), pois ela tem papel básico tanto durante a puberdade, quando os indivíduos desenvolvem caracteres sexuais secundários e capacidade reprodutiva, quanto durante o desenvolvimento fetal. É certo que a concordância entre os sexos cromossômico, gonadal, genital interno, genital externo e endocrinológico pode ficar prejudicada se não houver identificação psicológica dos indivíduos com os sexos em que são classificados (sexo psicológico), além do que, deve-se levar em conta a aceitação social desses indivíduos em um ou outro sexo (sexo social) (BEIGUELMAN, 1982).

HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO

Em 1947, Alfred JOST descreveu seus clássicos experimentos com castração intra-uterina de fetos de coelho, que permitiram a compreensão de alguns dos mecanismos da diferenciação sexual. Estes experimentos demonstraram que a castração de embriões de coelhos masculinos causava efeitos na organogênese, na dependência do tempo em que ela era realizada.

Assim, quando a castração ocorria em fetos de 24 dias a organogênese masculina se seguia, ocorrendo a diferenciação dos ductos de Wolff em ductos eferentes, epidídimo, ductos deferentes e vesícula seminal, além da inibição do desenvolvimento e regressão dos ductos de Müller. Na castração em fetos de 23 dias faltavam ao embrião os canais deferentes e as vesículas seminais, e quando ocorria antes de 21 dias, os ductos de Wolff regrediam totalmente, enquanto que os ductos de Müller persistiam e se diferenciavam em trompas, útero e vagina, permanecendo os órgãos genitais externos com aspecto feminino. A próstata interrompia seu desenvolvimento ou estava completamente ausente se a castração fosse anterior a 19 dias de vida. A castração de fetos femininos não impedia que este adquirisse uma estrutura feminina, não ocorrendo nenhum efeito sensível quando realizado com 23 dias, e com 21 dias apenas se observou diminuição no volume dos órgãos derivados de Müller, fato que também ocorria igualmente nos embriões dos dois sexos.

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

Assim, demonstrou-se que a secreção testicular é a responsável pela diferença dos genitais entre os dois sexos, sendo a testosterona responsável pelo desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos (ductos de Wolff, seio urogenital, genitália externa), sem alterar o desenvolvimento ovariano no sexo feminino ou causar regressão dos derivados de Müller.

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

PICON (1969) demonstrou uma substância que inibe os derivados de Müller *in vitro* com cultura de trato genital de fetos de ratos Wistar incubados com testículos fetais de várias idades. Obteve a persistência dos ductos de Müller na cultura com feto masculino de14 dias sem testículo e a regressão dos ductos de Müller na cultura de feto feminino de 14 dias com testículo. Mostrou que a ação inibitória ocorre em tempo determinado do desenvolvimento do trato genital fetal, independentemente da idade do testículo associado à cultura, no entanto, após a data em que o trato genital sofre a influência gonadal, ocorre o desenvolvimento normal para o sexo com ou sem a presença de testículo.

Utilizando a mesma técnica de PICON, JOSSO (1971) associou trato genital de feto de ratos de 14,5 dias de idade com tecido testicular, adrenal e ovariano, demonstrando que apenas o tecido testicular inibia os ductos de Müller. Associando a mesma cultura, tecido testicular humano de 31 fetos, 11 recém-nascidos e 10 indivíduos pós-natal em cultura orgânica, obteve completa inibição dos ductos de Müller com testículos de fetos de até 28 semanas, com inibição variável após este período, e nenhuma inibição com testículos pós-natais (JOSSO, 1972a).

Nesta mesma cultura orgânica, JOSSO (1972b) utilizou membranas semi-permeáveis para separação de trato genital de fetos de ratos e testículos observando que a substância com atividade de inibição nos ductos de Müller é uma macromolécula e não ultrapassa membrana permeável a moléculas de até 15.000 Da de peso molecular.

JOSSO (1973) também demonstrou atividade anti-Mülleriana em testículos de fetos de bezerros, comparável a outras espécies, conseguindo determinar que esta atividade está presente no tecido testicular como um todo. Utilizando técnica de microdissecção, mostrou que esta atividade ocorre nos túbulos seminíferos isolados, não encontrando nenhuma inibição dos ductos de Müller na cultura com tecido intersticial puro. Estes achados indicavam que a síntese de uma substância capaz de inibir os ductos de Müller, também chamada de substância inibidora de Müller ou hormônio anti-Mülleriano (HAM) deve ocorrer nos túbulos seminíferos, provavelmente pelas células de Sertoli, células especializadas em síntese protéica, responsáveis por criar o meio físico e químico apropriado para a manutenção da espermatogênese nas suas diferentes fases (JÉGOU, 1993).

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

intersticiais e de Sertoli, anterior à esteroidogênese (TRAN, MEUSY-DESSOLLE & JOSSO, 1977).

DONAHOE *et al.* (1977b), utilizando cultura semelhante com trato reprodutivo de feto de rato de 14,5 dias, estimaram a atividade do HAM, graduando a inibição dos derivados de Müller de I a V, em tecido testicular humano após o nascimento. A atividade do HAM era alta durante o 1°. ano de vida, declinando durante o segundo ano de vida, e, então, desaparecia. Neste ensaio com cultura orgânica também observou-se que o grau de inibição dos ductos de Müller depende do tempo de exposição do trato genital de feto ao tecido testicular. Assim, a regressão somente se inicia após 12 horas de exposição, e somente é completada após 72 horas. (DONAHOE, ITO & HENDREN, 1977a).

Até esta época os estudos bioquímicos indicavam que a molécula era uma grande proteína com peso molecular maior que 100.000 Da, características favoráveis ao efeito local que a substância tem na regressão dos ductos de Müller no homem.

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

VIGIER, PICARD & JOSSO (1982) para produção de anticorpo monoclonal contra HAM bovino, utilizaram o HAM de bezerro parcialmente purificado para imunização em camundongos e fusão de seus esplenócitos com células de mieloma produzindo hibridomas, que eram selecionados através de precipitação de HAM e implantados em camundongos produzindo anticorpo monoclonal, removido por imunocomplexo, que bloqueava atividade anti-Mülleriana de testículos de bezerro, mas não de ratos.

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

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

A produção do HAM pelas células de Sertoli inicia-se no feto humano masculino a partir da 7ª. semana com a diferenciação destas células, sendo possível a visualização do seu RNAm através de hibridização *in situ* a partir da 8ª. semana no sexo masculino. O RNAm é negativo no sexo feminino. É neste período que o HAM exerce sua ação na inibição dos ductos de Müller, período em que estes ductos são sensíveis ao HAM, sendo esta ação unilateral, já que o HAM se difunde célula a célula (JÉGOU, 1993; JOSSO *et al.*, 1993c).

A ação do HAM somente é possível na presença do seu receptor. O receptor tipo II do HAM consiste em uma proteína de 573 aminoácidos. Seu gene de 8,2 Kb, localizado no braço longo do cromossomo 12, está arranjado em 11 éxons (éxons 1-3 codificam o domínio extra-celular, e o éxon 4, o segmento transmembrana) (DI CLEMENTE, *et al.*, 1994; IMBEAUD *et al.*, 1995; JOSSO *et al.*, 1997).

As células da granulosa ovariana também são capazes de produzir HAM, imunorreativo e bioativo, assim como as células de Sertoli, demonstrando mais uma homologia entre estas duas células (VIGIER *et al.*, 1984). A diferença existente entre elas é que no início da diferenciação testicular, no período fetal, as células de Sertoli produzem grande quantidade de HAM (TRAN *et al.*, 1977), enquanto as células da granulosa exibem ligeira imunorreatividade apenas em folículos com desenvolvimento mais avançado no feto e produção de pequenas quantidade de HAM pelas células da granulosa de folículos de ovários maduros após o nascimento (BÉZARD *et al.*,1987). Uma das funções do HAM nos folículos ovarianos pode ser a de inibir a meiose do oócito, como demonstrado em cultura de folículos de ratos com HAM (TAKAHASHI, KOIDE & DONAHOE,1986).

Experimentos com ovário de feto de ovelhas mostraram que, quando expostos a HAM, ocorre inibição da aromatase que converte testosterona em estradiol, sendo inclusive possível medir atividade anti-Mülleriana em ensaio usando aromatase fetal. Uma conseqüência desta inibição é a reversão da diferenciação gonadal com aparecimento de estruturas semelhantes aos túbulos seminíferos primordiais, sugerindo um papel do HAM na diferenciação gonadal (VIGIER *et al.*, 1989; DI CLEMENTE *et al.*, 1992). Apesar do HAM ser praticamente indosável em mulheres normais, pode estar aumentado em mulheres com tumor ovariano de células granulosas ou em raro tumor ovariano de células de Sertoli, servindo como marcador sensível e específico usado para avaliação de cura e recorrência precoce do tumor (GUSTAFSON *et al.*, 1992; REY *et al.*,1996). O HAM exibe alguma atividade citotóxica em tumores ovarianos epiteliais podendo ser também um agente quimioterápico em alguns tipos de tumor (DONAHOE *et al.*, 1979).

A monitorização do HAM no soro humano foi possível depois de três descrições de ELISA por três grupos diferentes (BAKER, METCALFE & HUSTON, 1990; HUDSON *et al.* 1990; JOSSO *et al.*,1990).

BAKER *et al.* (1990) utilizaram ensaio imunoenzimático tipo *sandwich* com anticorpos monoclonais contra HAM bovino (HAMb) (primeiro anticorpo) e anticorpos policlonais contra HAM recombinante humano (HAMrh) (segundo anticorpo), obtendo dosagem de HAM do soro de pacientes desde o nascimento até os 16 anos e observaram que o HAM aumenta do nascimento até 1 ano de idade, diminuindo até os 16 anos quando torna-se indetectável, sendo também indetectável no sexo feminino.

HUDSON *et al.* (1990) descreveram um ensaio imunoenzimático (ELISA) em fase sólida tipo *sandwich* com anticorpos anti-HAMrh monoclonais aderidos ao tubo que reagiam com soro, e, em seguida, com anticorpos anti-HAMrh, produzidos em coelhos, ligados a anticorpos anti-coelho conjugados com peroxidase. Neste ensaio observou-se aumento de HAM do nascimento até 1 ano de idade (entre 10-70 ng/mL), queda menos brusca até os 5 anos de idade, e mais acentuada a partir dos 10 anos de idade, no sexo masculino. No sexo feminino foi indetectável, com discreto aumento na segunda década de vida até valores basais, comparáveis ao do sexo masculino após a puberdade (~ 2 ng/mL), apenas uma mulher com tumor ovariano de células de Sertoli apresentou HAM extremamente elevado.

JOSSO *et al.* (1990) utilizaram ELISA para detecção de HAM baseado em anticorpo policlonal contra HAMb purificado, obtendo curva de calibração com HAMrh. A dosagem de HAM foi obtida em 117 controles masculinos a partir do nascimento até idade adulta: observando níveis elevados até 2 anos de idade, com queda progressiva até valores residuais após a puberdade, permanecendo indetectável na idade adulta, com exceção de um indivíduo de 22 anos com HAM de 2,5 ng/mL. No sexo feminino HAM foi indetectável, com exceção de uma mulher aparentemente saudável com HAM de 5,2 ng/mL.

Um estudo com dosagem de HAM em cordão umbilical de recém-nascidos mostrou concentrações relativamente altas entre 25 e 31 semanas de gestação (média de 86,4 $\pm$ 36,1 ng/mL), e, então, queda a partir de 32 semanas até termo (média 24,2 $\pm$ 14,0 ng/mL) (SCHWINDT, DOYLE & HUTSON, 1997). Uma das funções sugeridas para o HAM no 2°. e 3°. trimestres de gestação é a promoção da descida testicular, na sua fase

abdominal (com início entre 8 e 15 semanas de gestação) até a região inguinal (com início entre 25 e 28 semanas), sugerida pelas associações entre atividade anti-Mülleriana diminuída e criptorquidismo (DONAHOE *et al.*, 1977a), e síndromes de persistência de ductos de Müller e criptorquidismo. Mas uma ação apenas mecânica das estruturas de Müller bloqueando a descida poderia existir, já que outros trabalhos mostram HAM normal em crianças com criptorquidismo (JOSSO *et al.*, 1983; HUTSON & DONAHOE, 1986; JOSSO *et al.*, 1990; MILLER,1990). Outro efeito possível do HAM, demonstrado *in vitro*, é a inibição da formação de fosfatidilcolina na maturação pulmonar, sendo a imaturidade pulmonar mais freqüente entre recém-nascidos do sexo masculino que feminino (LEE *et al.*, 1993).

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

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

No período pré-natal, quando a testosterona e o HAM estão elevados, os andrógenos exercem pouca influência na maturação de túbulos seminíferos, não ocorrendo a formação de *tight junctions* e invaginações das células de Sertoli e o progresso da espermatogênese não progride além do estágio de espermatogônia. A

constatação de baixa expressão dos receptores de andrógenos nas células de Sertoli poderia ser a explicação para o HAM e a testosterona elevados (MAJDIC, MILLAR & SAUNDERS, 1995). Mesmo assim, a testosterona ainda tem efeito inibitório sobre HAM nos primeiros dias de vida, já que neonatos com defeitos de síntese de andrógenos (aplasia de Leydig ou deficiência de enzima da esteroidogênese) ou com insensibilidade androgênica apresentam valores séricos de HAM mais elevados (REY *et al.*, 1994; REY & JOSSO, 1996).

No período após 1 ano de idade, apesar da testosterona cair, o HAM também cai, mesmo nos casos de defeito de síntese ou ação dos andrógenos, nos quais HAM volta a aumentar na puberdade. No tratamento da puberdade precoce ocorre diminuição de testosterona com aumento de HAM, de 3 a 6 meses após a diminuição de testosterona, sugerindo um mecanismo indireto da testosterona sobre as células de Sertoli na regulação da secreção de HAM (REY *et al.*, 1993). Talvez o outro fator aí envolvido seja o FSH, mas até agora não foram encontrados elementos de resposta da célula de Sertoli ao FSH. Ou existe algum fator parácrino de regulação, já que em algum momento do período neonatal a expressão do receptor de andrógenos ainda está ausente das células de Sertoli, mas está presente nas células peritubulares, ou ainda é possível existir alguma regulação direta da própria célula germinativa (JÉGOU, 1993; LINDZEY *et al.*, 1994; SHAN *et al.*, 1995; MAJDIC *et al.*, 1995; REY & JOSSO, 1996).

Anteriormente aos ensaios de HAM, a dosagem de testosterona sérica era a única maneira de se verificar a presença de testículo em crianças com criptorquidismo ou a função testicular (no caso, as células de Leydig) em crianças com ambigüidade genital, sendo necessário muitas vezes o estímulo prolongado com hCG, especialmente após os primeiros 6 a 9 meses de vida até o início da puberdade (GRANT *et al.*, 1976). Atualmente temos a opção de avaliar as células de Sertoli com a dosagem de HAM e inibina B.

A inibina B também pode ser dosada em mulheres, com valores séricos mais elevados na fase folicular (GROOME *et al.*, 1996). No homem, apresenta elevação do nascimento até o 1° ano de vida, com queda progressiva no 2° ano, permanecendo em

valores baixos até a puberdade quando torna a se elevar, mantendo pico entre 20 e 29 anos, diferentemente do HAM que diminui com a puberdade. Tem relação inversa com FSH, principalmente após a puberdade, período em que exerce inibição sobre FSH (BYRD *et al.*, 1998). Um estudo com crianças criptorquídicas até 4 anos de idade, mostrou valores basais elevados de FSH e baixos de inibina B em relação aos controles, sendo que, após os estímulos com hCG e hMG, as crianças criptorquídicas apresentavam relação inibina B/FSH mais baixa que os controles (LONGUI, *et al.*, 1998).

A presença de HAM detectável sugere existência de tecido testicular, porém o oposto não necessariamente é verdadeiro. Os resultados negativos devem ser interpretados com precaução pois podem ocorrer variações individuais, mostrando-se, ocasionalmente, negativo em meninos normais após 2 anos de idade e em disgenesias testiculares severas (JOSSO *et al.*, 1991). Assim, pode-se diferenciar pseudo-hermafroditismo feminino de hermafroditismo verdadeiro em indivíduos 46,XX com a dosagem sérica de HAM. Os valores de HAM aparecem elevados nos casos de insensibilidade androgênica ou deficiência de síntese de testosterona, e, como estão diminuídos nos de disgenesia gonadal, são de grande utilidade na investigação diagnóstica dos casos de pseudo-hermafroditismo masculino (HARBISON *et al.*, 1991; JOSSO *et al.*, 1991; JOSSO, 1992; GUSTAJSON *et al.*, 1993; JOSSO & REY, 1994; JOSSO, 1995).

Nos casos de síndrome de persistência dos derivados de Müller a dosagem do HAM é extremamente útil, guiando a investigação molecular. Podemos observar que metade dos casos tem níveis de HAM normais ou elevados e outra metade tem níveis muito baixos ou indetectáveis. A análise molecular mostrou presença de mutação no gene do receptor tipo II do HAM no primeiro grupo (chamado HAM-positivo) e no segundo grupo foi observado mutação no gene do HAM na maioria dos casos (chamado HAM-negativo) (JOSSO *et al.*, 1997).

REY *et al.* (1999) demonstraram recentemente uma grande utilidade da dosagem do HAM em pacientes com intersexo em um trabalho onde foram analisados 107 pacientes. Nos casos com diferenciação testicular anormal observou-se HAM

indetectável nos casos de disgenesia gonadal pura, porém nos casos de disgenesia gonadal parcial, disgenesia gonadal assimétrica ou hermafroditismo verdadeiro ocorreu grande variabilidade dos valores séricos de HAM, desde muito baixos nos casos de disgenesia testicular grave coexistindo com remanescentes müllerianos presentes, até valores quase normais nos casos de disgenesias menos graves, sem persistência dos ductos de Müller. Já nos casos de diminuição da secreção de testosterona ou da sua ação observou-se valores aumentados de HAM no primeiro ano de vida nos casos de aplasia de Leydig, defeitos da esteroidogênese, ou insensibilidade androgênica. Na infância (1-9 anos de idade) os valores de HAM retornam a valores normais, mas mesmo assim mais elevados do que os valores encontrados em disgensia gonadal. Na puberdade os valores de HAM se elevam nos casos com aplasia de Leydig e insensibilidade total aos andrógenos, e nos casos de insensibilidade parcial apresentam níveis significantemente mais altos que os controles. Não houve nenhum caso de deficiência de 5 α-redutase tipo 2 neste trabalho.

Assim, com o intuito de observar a utilidade da dosagem do HAM na investigação diagnóstica de crianças com ambigüidade genital e cariótipo 46, XY, em conjunto com as dosagens de gonadotrofinas, andrógenos e seus precursores, realizamos este trabalho.

CASUÍSTICA E METODOLOGIA

CASUÍSTICA

A casuística foi composta de 24 crianças portadoras de ambigüidade genital, segundo os critérios de DANISH (1985), atendidas no Ambulatório do Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo (GIEDDS) do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), de maio de 1996 a maio de 1998.

Todas estas crianças eram portadoras de cariótipo 46,XY após estudo com técnica de banda G em cultura de linfócitos de sangue periférico realizado no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP. Foram excluídos os pacientes com hipótese diagnóstica de pseudo-hermafroditismo feminino, visto que publicações anteriores mostram que indivíduos com cariótipo 46, XX e ovários têm hormônio anti-Mülleriano (HAM) praticamente indetectável (BAKER *et al.*, 1990, HUDSON *et al.* 1990, JOSSO *et al.* 1990).

A coleta de dados foi realizada pela autora, com o preenchimento da ficha de atendimento padronizada para o Ambulatório do GIEDDS. 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. Todos os exames realizados eram necessários para a investigação de rotina de cada caso.

METODOLOGIA

1. Coleta de dados clínicos:

Compreendeu dados como a idade na data da 1ª. consulta, antecedentes gestacionais e familiais, história de consangüinidade entre os pais, alterações de exame físico relevantes, principalmente em relação à genitália externa, palpação de gônadas (não palpável, ou palpável no canal inguinal ou na saliência lasbioescrotal) e desenvolvimento puberal.

A classificação das alterações da genitália externa seguiu os critérios de PRADER (1954). A avaliação do desenvolvimento puberal seguiu os critérios de MARSHALL & TANNER (1970), com avaliação de desenvolvimento genital (G1 a 5), presença de pêlos pubianos (P1 a 6), presença de tecido mamário (M1 a 5), e volume gonadal em cm^3 de acordo com o orquidômetro de Prader.

2. Avaliação hormonal:

Com a finalidade de não atrasar a investigação de cada caso, após a primeira coleta de sangue de cada paciente, o material era centrifugado e separado em 3 alíquotas. Uma delas enviada ao Laboratório Central do HC - UNICAMP para realização das dosagens rotineiras e as demais armazenada a -80°C no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Doença Clínica da FCM – UNICAMP para posterior análise.

Uma dessas alíquotas armazenadas serviu para determinação das gonadotrofinas e dos esteróides sexuais e a outra para determinação do HAM. A alíquota armazenada para dosagem de HAM foi enviada ao Laboratório da Dra. Nathalie Josso sob os cuidados do Dr. Rodolfo A. Rey na École Normale Supérieure em Montrouge, França, para análise por meio da técnica de ELISA utilizada no serviço.

Essa técnica, primeiramente descrita em 1990, utilizava anticorpos policlonais, obtidos por 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 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 homens normais agrupados de acordo com a idade e desenvolvimento puberal (MARSHALL & TANNER, 1970) podem ser vistos na Tabela I (REY *et al.*, 1999).

Tabela I: Valores de hormônio anti-Mülleriano sérico (HAM) em homens normais agrupados por idade e desenvolvimento puberal.

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

Após os testes de estímulos, o mesmo procedimento foi realizado, no entanto com separação em apenas 2 alíquotas, visto que para a determinação do HAM não há necessidade de qualquer estímulo, sendo suficiente a basal em qualquer faixa etária. Uma enviada ao Laboratório Central do HC - UNICAMP para dosagens rotineiras e a outra armazenada a -80°C no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Doença Clínica da FCM – UNICAMP para posterior análise.

Foram realizadas as determinações séricas basais de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH), testosterona total (TT), dehidrotestosterona (DHT), dehidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona (A-Δ4). Os resultados obtidos foram comparados aos padronizados pelo Laboratório de Fisiologia do Departamento de Doença Clínica da FCM - UNICAMP de acordo com o sexo e desenvolvimento puberal (Anexo 1).

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 gonadotrofina coriônica humana 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, DHT e A-Δ4 em amostra de sangue coletada 24 horas após a ultima aplicação (GRANT *et al.*, 1976).

Nos casos em que não havia produção de testosterona (TT sem incremento superior a 1,4 ng/mL após teste de estímulo com gonadotrofina coriônica humana) foi feita a determinação sérica da gonadotrofina coriônica - fração beta (β-hCG) na amostra pós-estímulo para fins de confirmação da aplicação da medicação, e os resultados comparados com os padronizados pelo Laboratório de Fisiologia do Departamento de Doença Clínica da FCM - UNICAMP (Anexo 1). Uma vez confirmada a aplicação, estes pacientes foram submetidos ao teste de estímulo agudo com ACTH sintético

(Cortrosina®), na dose de 0,25 mg endovenoso, e determinação sérica de cortisol, DHEA e A-Δ4 no basal e 60 minutos após estímulo endovenoso.

As determinações séricas hormonais foram realizadas pelo Laboratório de Fisiologia Clínica do Departamento de Doença Clínica da FCM – UNICAMP, sob a orientação da Prof.a. Dra. Margaret de Castro, em duplicatas utilizando kits comercializados de:

⇒ LH: por Stratus hLH Flurimetric Enzime Immunoassay Cat. Ref. B5700-52 DADE. Internation Inc., Miami, Fl. 33152-0672 USA.

⇒ FSH: por Stratus hFSH Flurimetric Enzime Immunoassay Cat. Ref. B5700-51 DADE. Internation Inc., Miami, Fl 33152-0672 USA.

⇒ TT: por Chemilumonescent Enzime 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-Δ4: por RIE, DSL, Diagnostic System Laboratories, Inc., Webster, TX, USA. Cat. Ref. DSL-3800.

⇒ DHEA: por RIE, baseado 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.

Com os valores encontrados, foi ainda determinada a relação T/DHT basal em pacientes nos primeiros 6 meses de idade ou em puberdade, e pós-estímulo com gonadotrofina coriônica humana nos demais. Valores desta relação menores que 20

foram considerados normais, entre 20 e 40 intermediários, e maiores de 40 sugestivos de deficiência da enzima 5α redutase tipo 2 .

Valores de DHEA superiores a 20 ng/mL sem incremento da A-Δ4 após estímulo com ACTH agudo foram considerados sugestivos do diagnóstico de defeito de síntese de testosterona por deficiência da enzima 3β-OH-esteróide desidrogenase.

3. Avaliação da genitália interna:

Foi realizada a genitografia, muitas vezes complementada com uretrocistografia miccional retrógrada, nos casos de genitália externa de aspecto mais maculinizado, e ultrassonografia pélvica (AL JURAYYAN *et al.*, 1995; POUILLAUDE, DAVID, FRANÇOIS, 1986). Como os casos de hipospadia apresentam maior freqüência de aumento do utrículo prostático, especialmente as hipospadias mais severas como peno-escrotal e perineal (DEVINE *et al.*, 1980), utilizamos a classificação do aumento do utrículo prostático em pacientes com hipospadias descrita por IKOMA *et al.* (1985) baseada na configuração radiológica do utrículo:

⇒ Grau 0: abertura localizada na uretra posterior, com utrículo que não se estende além do verumontanum;
⇒ Grau I: maior que grau 0 mas não alcança bexiga;
⇒ Grau II: maior aumento estendendo-se até bexiga;
⇒ Grau III: abertura do utrículo na uretra bulbar, distalmente ao esfíncter uretral.

4. Avaliação anatomopatológica:

Foi realizada em todos os casos em que não ocorreu incremento da testosterona após estímulo com gonadotrofina coriônica e não havia aumento de seus precursores após o mesmo estímulo e após ACTH endovenoso.

As biópsias gonadais foram realizadas pela equipe de Cirurgia Pediátrica do Departamento de Cirurgia da FCM-UNICAMP, e a avaliação anatomopatológica sob a supervisão da Prof.a. Dra. Izilda Aparecida Cardinalli do Departamento de Anatomia Patológica da FCM-UNICAMP.

5. Critérios diagnósticos utilizados:

⇒ **Disgenesia gonadal parcial XY ou pseudo-hermafroditismo masculino disgenético**: baseado na ausência de incremento da testosterona após teste de estímulo com gonadotrofina coriônica humana, sem acúmulo de precursores da testosterona, podendo ter ou não FSH elevado, sendo confirmado com os achados histológicos, que poderiam variar desde apenas diminuição da luz tubular até completa substituição da gônada por tecido fibro-adiposo vascularizado. Há descrição na literatura de valores séricos baixos de HAM nesta doença (JOSSO *et al.*, 1990; LEE *et al.*, 1997; REY *et al.*, 1999).

⇒ **Hipogonadismo hipogonadotrófico**: baseado na presença de ambigüidade genital sem hipospadia, na ausência de incremento da testosterona após teste de estímulo com gonadotrofina coriônica humana, sem acúmulo de precursores da testosterona, com LH muito baixo e com resposta diminuída ou ausente ao teste de estímulo com LHRH prolongado. Os casos já relatados mostravam níveis de HAM diminuídos (JOSSO *et al.*, 1990).

⇒ **Hipoplasia ou agenesia das células de Leydig**: baseado na ausência de incremento da testosterona após teste de estímulo com gonadotrofina coriônica humana, sem acúmulo de precursores da testosterona, podendo ter LH elevado. Há descrição na literatura de valores séricos elevados de HAM nesta doença (REY, *et al.*, 1994; REY *et al.*, 1999).

⇒ **Deficiência de 5α-redutase tipo 2**: baseado na presença de ambigüidade genital com gônadas palpáveis e na da relação entre testosterona e dihidrotestosterona (T/DHT)

maior que 30, podendo ou não ocorrer aumento das gonadotrofinas séricas. Não há descrição na literatura de valores séricos de HAM nesta doença.

⇒ **Insensibilidade completa aos andrógenos**: baseado na presença de gônadas palpáveis, confirmadas como testículos ao anatomopatológico, em indivíduos com genitália externa feminina normal, com vagina em fundo cego à genitografia, com níveis elevados de testosterona, relação entre testosterona e dihidrotestosterona em valores intermediários, e aumento das gonadotrofinas, com predomínio do LH em relação ao FSH. Há descrição na literatura de valores séricos elevados de HAM elevados nesta doença (REY *et al.*, 1994; REY *et al.*, 1999).

⇒ **Insensibilidade parcial aos andrógenos**: baseado na presença de ambigüidade genital com gônadas palpáveis, com níveis elevados de testosterona após estímulo com gonadotrofina coriônica humana, relação entre testosterona e dihidrotestosterona em valores intermediários, podendo ou não ocorrer aumento das gonadotrofinas, com predomínio do LH em relação ao FSH. Nestes casos foi realizado teste para verificar a sensibilidade do receptor aos andrógenos com a administração de 50 mg de testosterona de depósito ao mês, intra-muscular, por 3 meses consecutivos, observando-se resposta diminuída ou ausente no tamanho do falo (GUTHRIE *et al.*, 1973). Há descrição na literatura de valores séricos elevados de HAM nesta doença (REY *et al.*, 1994; REY *et al.*, 1999).

⇒ **Defeito de síntese de testosterona**: baseado na ausência do incremento da testosterona após teste de estímulo com gonadotrofina coriônica, e aumento de DHEA sem aumento correspondente de A-Δ4 após teste de estímulo com ACTH agudo na deficiência de 3β-OH-esteróide desidrogenase. O diagnóstico de deficiência de 20-22 desmolase baseado na ausência de incremento de quaisquer precursores, porém com quadro clínico e laboratorial de perda de sal. O diagnóstico da deficiência do complexo P450c17 baseado no aumento de progesterona sérica sem aumento correspondente de DHEA e A-Δ4. O diagnóstico da deficiência de 17β-hidroxiesteróide oxidorredutase tipo 3 baseado no aumento de A-Δ4, sem

correspondente aumento de testosterona e estradiol. Nestas doenças pode ou não ocorrer aumento de LH em relação ao FSH. Há descrição na literatura de valores séricos baixos de HAM em todas elas (REY *et al.*, 1994; REY *et al.*, 1999).

⇒ **Idiopático**: baseado na não confirmação dos demais diagnósticos acima citados, na realização de biópsia gonadal para confirmação de testículos, e afastada a hipótese de hermafroditismo verdadeiro. Os níveis de HAM para estes casos, já descritos, vão desde normais a ligeiramente diminuídos (JOSSO *et al.*, 1990; REY *et al.*, 1994).

RESULTADOS

1. Dados clínicos:

Dos 24 casos portadores de ambigüidade genital e cariótipo 46,XY incluídos neste estudo, avaliados no Ambulatório do GIEDDS no período de maio de 1996 a maio de 1998, 21 apresentaram registro civil masculino à primeira consulta, e apenas 3 com registro civil feminino (casos números 16, 19 e 20). Portanto, nenhum caso foi encaminhado ainda sem registro civil.

A idade destes 24 casos à 1ª. consulta no Ambulatório do GIEDDS variou de 15 dias a 16 anos (média de 5 anos e 6 meses e mediana de 4 anos), sendo apenas 5 casos (1, 12, 17-19) avaliados no 1º. ano de vida (Tabela II).

Não foram identificados tanto antecedentes gestacionais relevantes, em especial o uso de medicamentos que pudesse interferir na biossíntese de testosterona, quanto casamento consangüíneo entre os pais. Como antecedentes familiais importantes, em especial a presença de casos semelhantes, foi encontrado a repetição do quadro de ambigüidade genital nos irmãos números 9 e 10. Como antecedente pessoal, o caso 8 apresentou tumor de Wilms em rim direito e doença renal túbulo-intersticial contralateral no *follow-up* (Tabela II).

Três dos 24 casos apresentaram sinais de desenvolvimento puberal à 1ª. consulta no Ambulatório do GIEDDS, sendo que um deles (caso número 11) com 7 anos de idade nesta avaliação. Dos outros 2 casos, em idade puberal e com registro civil feminino, 1 apresentou-se com desenvolvimento puberal feminino (caso 16) e o outro com desenvolvimento puberal tipicamente masculino, sem mamas (caso 20) (Tabela II).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Tabela II: Idade e desenvolvimento puberal à 1ª. consulta, grau de ambigüidade genital, presença de seio urogenital e derivados dos dutos de Müller, e localização e tipo de gônada de 24 casos de ambigüidade genital com cariótipo 46,XY avaliados no GIEDDS entre 5/96 e 5/98.

	Idade[1]	**genitália[2]**	**SUG**	**Derivado de Müller**	**Biópsia gonadal[3]**	**Local gônada[4]**
1	10m	GIV	-	D: útero + trompa	D: GD E: TR	D e E: A
2	1a8m	GIII	+	D: útero + trompa	D: GD E: TR	D: A E: CI
3	3a9m	GIV	-	-	D e E: TR	D e E: CI
4	5a4m	GIII	+	E: útero + trompa	D: TR E: GD	D: CI E: A
5	5a8m	GIII	-	-	D e E: TR	D e E: CI
6	5a10m	GIII	-	-	D: TR E: Anorquia	D: CI
7	10a G1P1	GIV	-	utrículo GIII	D e E: TR	D e E: CI
8	1a9m	GIV	+	Útero rudimentar	D e E: TR	D e E: A
9	3a4m	GIII	-	utrículo GIII	NR	D e E: SLE
10	5a3m	GIII	-	-	NR	D e E: SLE
11	7a G2P3	GIII	-	-	NR	D e E: SLE
12	6m	GIII	-	utrículo GIII	NR	D e E: SLE
13	1a1m	GIII	+	-	NR	D e E: SLE
14	3a6m	GIII	-	-	NR	D e E: CI
15	8a7m	GIV	-	-	NR	D e E: CI
16	13a M3P1	F	+	-	NR	D e E: CI
17	0,5m	GIII	-	utrículo GIII	NR	D e E: SLE
18	5m	GIII	-	utrículo GIII	NR	D e E: SLE
19	10m	GIII	-	-	NR	D e E: CI
20	16a G2P3	GIII	-	-	NR	D e E: SLE
21	4a1m	GV	-	-	Testículos normais	D e E: CI
22	4a2m	GIV	-	-	Testículos normais	D e E: SLE
23	6a1m	GV	-	-	Testículos normais	D e E: CI
24	7a4m	GIV	-	-	Testículos normais	D e E: CI

[1] = idade (anos e meses) e desenvolvimento puberal (MARSHALL & TANNER, 1970).
[2] = grau de ambigüidade genital de acordo com PRADER (1954).
[3] = GD = gônada disgenética; NR = não realizada biópsia; TR = testículo rudimentar
[4] = A = abdominal; CI = canal inguinal; SLE = saliência labioescrotal
D = lado direito; E = lado esquerdo

Quanto ao exame da genitália externa, de acordo com a classificação de PRADER (1954), 1 caso (número 16) apresentou genitália tipicamente feminina, porém com gônadas palpáveis em região inguinal bilateralmente; nenhum caso com graus I e II; 14 casos com grau III; 7 casos com grau IV; e 2 casos com grau V (Tabela II).

Quanto à palpação das gônadas, em 2 casos (1 e 8) ambas não foram palpadas; em 3 casos (2, 4 e 6) apenas uma das gônadas foi palpada; e nos demais 19 casos ambas as gônadas foram palpadas bilateralmente, sendo 10 (casos 3, 5, 7, 14, 15, 16, 19, 21, 23 e 24) com ambas em canal inguinal, e os demais 9 (casos 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 20 e 22) com ambas em saliências labioescrotais (Tabela II).

O caso 11, apesar de estar em puberdade, G2 P3 de acordo com MARSHALL & TANNER (1970), não apresentou aumento do volume gonadal bilateralmente (volume entre 2 e 3 cm^3, de acordo com o orquidômetro de Prader). O caso 16 apresentou desenvolvimento puberal M3 P1 com gônadas de volume entre 6 e 8 cm^3. O caso 20 apresentou desenvolvimento puberal G3 P3, com gônadas de volume entre 8 e 10 cm^3.

2. Avaliação hormonal:

Os casos de 1 a 7 não apresentaram qualquer resposta da testosterona total ao estímulo com gonadotrofina coriônica humana. Em todos estes casos foi encontrado o FSH superior ao LH, sendo que em 5 deles (1 a 4, e 7) com FSH elevado para a idade e desenvolvimento puberal. Todos com a relação LH/FSH $\leq$ 0,3 e T/DHT normal, e com os precursores de testosterona normais para a idade (Tabelas III e IV).

TABELA III: Idade e desenvolvimento puberal à 1ª. consulta, dosagens séricas de LH e FSH, LH/FSH, testosterona total (T) basal com ou sem estímulo de gonadotrofina coriônica, dehidrotestosterona (DHT), relação T/DHT, e hormônio anti-Mülleriano (HAM) de 24 casos com ambigüidade genital e cariótipo 46,XY acompanhados no GIEDDS entre 5/96 e 5/98.

	Idade[1]	LH (mUI/mL)	FSH (mUI/mL)	LH/FSH	T[2] (ng/mL)	DHT (ng/mL)	T/DHT	HAM (pMol/L)
1	10m	0.7	4.7	0.1	AE: <0.1	0.02	5	91
2	1a8m	0.6	4.5	0.1	AE: <0.1	0.02	5	70
3	3a9m	0.5	3.5	0,1	AE : <0.1	0.02	5	186
4	5a4m	0.7	3.9	0,2	AE : <0.1	0.02	5	22
5	5a8m	0.4	2.4	0.2	AE: <0.1	0.02	5	25
6	5a10m	0.9	3.3	0,3	AE: <0.1	0.02	5	72
7	10a G1P1	0.6	4.7	0,2	AE : <0.1	0.02	5	52
8	1a9m	0.8	5.0	0.2	AE: 0.7	0.04	17	196
9	3a4m	2.3	0.7	3,3	AE: 0.3	0.02	15	436
10	5a3m	1.9	0.8	2,4	AE: 0.2	0.02	10	511
11	7a G2P3	4.2	0.5	8,4	AE: 0.7	0.05	14	503
12	6m	8.6	4.1	2.1	B: 1.8	0.05	36	468
13	1a1m	4.2	1.5	2,8	AE: 1,8	0.05	36	538
14	3a6m	2.8	0.4	7,0	AE: 2.2	0.06	37	409
15	8a7m	3.5	1.2	2,9	AE: 1,5	0.04	37	472
16	13a M3P1	7.9	3.7	2,1	B: 5.5	0.15	37	996
17	0.5m	1.9	1.5	1,3	B: 1.9	0.02	95	139
18	5m	1.1	0.5	2,2	B: 2.2	0.03	74	292
19	10m	3.3	3,9	0,8	AE: 2,6	0.04	65	64
20	16a G2P3	4.3	4.8	0,9	B: 4.9	0.06	82	16
21	4a1m	0.7	0.4	1,7	AE: 1.5	0,09	16	464
22	4a2m	0.5	0.3	1,7	AE: 1,5	0,09	16	428
23	6a1m	0.8	0.1	1,8	AE: 1.6	0.09	17	353
24	7a4m	0.7	0,8	0,9	AE: 1,5	0.08	18	382

[1] = idade (anos e meses) e desenvolvimento puberal (MARSHALL & TANNER, 1970).
[2] = B = dosagem basal; AE = dosagem após estímulo com gonadotrofina coriônica humana
[3] = NR = não realizado

Em todos estes casos (1 a 7) que não apresentaram qualquer resposta da testosterona ao estímulo com gonadotrofina coriônica, foi realizada a determinação sérica do β-hCG na amostra pós-estímulo. Em todos encontrou-se a dosagem sérica aumentada para a idade e sexo, variando de 143 a 365 mUI/mL, mostrando o uso adequado da medicação para o teste (Tabela IV).

Quatro casos (8 a 11) apresentaram resposta parcial da testosterona ao estímulo com gonadotrofina coriônica humana. No caso 8 foi encontrado um FSH elevado, e superior ao LH, com relação LH/FSH $\leq$ 0,3 e T/DHT normal, e com os precursores de testosterona normais para a idade (Tabelas III e IV).

Nos casos 9 a 11 foi encontrado o LH elevado para a idade e superior ao FSH (relação LH/FSH > 2). No caso 11 o LH foi normal para o grau de desenvolvimento puberal. Em todos estes casos encontrou-se a relação T/DHT normal e a concentração sérica basal e após estímulo com ACTH de DHEA elevada, sem aumento dos demais precursores da testosterona avaliados (Tabelas III e IV).

Os demais casos (12 a 24) apresentaram testosterona total basal ou após estímulo com gonadotrofina coriônica em valores normais para a idade. Em cinco destes casos (12 a 16) foi encontrado o LH superior ao FSH, estando também aumentado em relação à idade nos casos 12 a 15. No caso 16 as gonadotrofinas apresentaram-se em valores normais para a idade e desenvolvimento puberal. Nos casos 12 a 16 a relação T/DHT encontrou-se em valores intermediários (Tabela III). Os casos 12 a 16 apresentaram a relação LH/FSH > 2.

Nos casos 17 a 24 não foi observado um predomínio evidente de uma das gonadotrofinas avaliadas. Em quatro destes casos (17 a 20) encontrou-se a relação T/DHT extremamente elevada, e nos demais (21 a 24) em valores normais (Tabela III).

Tabela IV: Idade e desenvolvimento puberal, valores séricos da fração β - gonadotrofina coriônica após teste de estímulo com gonadotrofina coriônica humana (β-hCG), e basais de androstenediona (A-Δ4), dehidroepiandrosterona (DHEA), e DHEA após estímulo agudo com ACTH em 11 casos de ambigüidade genital com cariótipo 46,XY sem produção de testosterona, acompanhados no GIEDDS entre 5/96 e 5/98.

	Idade[1]	**β-hCG (mUI/mL)**	**A-Δ4 (ng/mL)**	**DHEA basal (ng/mL)**	**DHEA 60' pós-ACTH (ng/mL)**
1	10m	219	<0,1	1,6	NR
2	1a8m	365	<0,1	0,5	NR
3	3a9m	196	<0,1	2,6	NR
4	5a4m	351	<0,1	2,3	NR
5	5a8m	143	0,3	3,4	NR
6	5a10m	301	<0,1	0,5	NR
7	10a G1P1	319	0,4	6,0	NR
8	1a9m	NR	0,2	3,1	NR
9	3a4m	NR	<0,1	10,5	45,5
10	5a3m	NR	<0,1	11,5	48,5
11	7a G2P3	NR	0,4	30,0	>100,0

[1] = idade (anos e meses) e desenvolvimento puberal (MARSHALL & TANNER, 1970).

A análise destes resultados encontrados em relação às gonadotrofinas, à testosterona total basal ou pós-estímulo, à dehidrotestosterona, e aos precursores da testosterona quando a mesma não apresentava resposta ao estímulo com gonadotrofina coriônica humana foi feita ainda de forma individualizada, associada aos valores séricos de HAM encontrados, e utilizada para definição dos diagnósticos etiológicos.

Os valores séricos de HAM, de acordo com a idade para o sexo masculino, apresentaram-se abaixo de -2 desvios-padrão em 10 casos (1 a 8, 19, e 20); entre -1 e -2 desvios-padrão em 4 (14, 17, 18, e 23); entre -1 desvio-padrão e +1 desvio-padrão em 7 (9, 10, 12, 13, 21, 22, e 24); próximo de +2 desvios-padrão em 1 (15); e acima de +2 desvios-padrão em 2 casos (11 e 16) (Tabelas I e III, e Figura 1).

3. Avaliação da genitália interna:

A avaliação da genitália interna realizada nos 24 casos apresentou: 5 casos (2, 4, 8, 13 e 16) com presença de seio urogenital à genitografia, assim como outros 5 casos (7, 9, 12, 17 e 18) com utrículo grau III, segundo a classificação proposta por IKOMA *et al.* (1985). Em 4 casos (1, 2, 4 e 8) onde a laparoscopia foi necessária para realização de biópsia gonadal, visto que estes casos apresentaram uma ou ambas as gônadas não palpáveis, observou-se a presença de útero e trompa rudimentares do mesmo lado da gônada disgenética.

4. Avaliação anatomopatológica:

A biópsia gonadal foi realizada bilateralmente em 8 casos (1 a 8), todos sem incremento da testosterona total após estímulo com gonadotrofina coriônica humana e sem aumento de seus precursores.

Das 16 gônadas biopsiadas foram encontrados 3 gônadas disgenéticas (casos 1, 2 e 4) constituídas apenas por estroma tipo ovariano com tecido fibro-adiposo ricamente vascularizado, sem células germinativas. Uma das gônadas não foi encontrada (caso 6), sendo definida como anorquia pela ausência de derivados de Müller do lado desta gônada. As demais 12 gônadas biopsiadas foram definidas como testículos rudimentares pelo fato de apresentarem diminuição importante da luz tubular e presença de fibrose em graus moderado e intenso no tecido gonadal (Tabela II).

Como esperado, todas as gônadas disgenéticas apresentaram localização abdominal. Os chamados testículos rudimentares apresentaram localização abdominal em 2 casos (1 e 8) e no terço superior do canal inguinal nas demais 9 gônadas (Tabela II).

5. Diagnósticos etiológicos realizados:

Baseados nos dados clínicos, hormonais, radiológicos e anatomopatológicos, em 8 casos (1 a 8) o diagnóstico sindrômico foi de **disgenesia gonadal XY**, sendo 3 casos (1, 2 e 4) foi feito o diagnóstico de **disgenesia gonadal mista** (associação de gônada disgenética com testículo rudimentar). Em outros 3 casos (3, 5 e 7) foi feito o diagnóstico de **disgenesia gonadal parcial** (testículos rudimentares bilateralmente). Em 1 caso (6) foi estabelecido o diagnóstico de **pseudo-hermafroditismo masculino disgenético com síndrome de regressão testicular unilateral** (anorquia à esquerda). O outro caso (8) foi definido como **síndrome de Dennys-Drash** (associação de disgenesia gonadal, tumor de Wilms e ambigüidade genital em indivíduos com cariótipo 46,XY). Todos estes 8 casos apresentaram predomínio do FSH em relação ao LH (LH/FSH $\leq$ 0,3), ausência de incremento da testosterona e seus precursores após estímulo com gonadotrofina coriônica humana, e HAM extremamente diminuído (Tabelas II e III, Figura 2).

Em 3 casos (9 a 11) foi estabelecido o diagnóstico de **pseudo-hermafroditismo masculino devido a deficiência da enzima 3β-OH-esteróide desidrogenase**, baseado no predomínio do LH em relação ao FSH (LH/FSH > 2), na ausência de incremento de testosterona após estímulo com gonadotrofina coriônica humana, nos valores aumentados de DHEA basais e após estímulo agudo com ACTH, sem aumento correspondente de A-Δ4, sendo que 2 destes casos (9 e 10) apresentaram parentesco (irmãos). O outro caso (11) apresentou um quadro clínico compatível com pseudo-puberdade precoce (desenvolvimento puberal aos 7 anos de idade, sem aumento de volume testicular e com avanço de maturação esquelética, 11 anos nesta avaliação). Dois destes 3 casos (9 e 10) apresentaram valores de HAM próximos da média, para idade e desenvolvimento puberal, enquanto que o terceiro (caso 11) apresentou valor muito acima de +2 DP para o desenvolvimento puberal (Tabelas II, III e IV, Figura 2).

Em 5 casos (12 a 16) foi feito o diagnóstico de **pseudo-hermafroditismo masculino devido a síndrome da insensibilidade periférica aos andrógenos**, baseado

no predomínio do LH em relação ao FSH (LH/FSH > 2), resposta normal de produção de testosterona e relação T/DHT em valores intermediários. Em 5 casos (12 a 15) observou-se evidente ambigüidade genital, sendo provável o diagnóstico da forma parcial ou incompleta da síndrome. No caso 16 observou-se genitália externa feminina normal e paciente em franco desenvolvimento puberal com presença de mamas, sem pilificação, porém com aumento do volume testicular, ocorrendo neste caso a forma completa da síndrome. Em 3 destes casos (12 a 14) foram encontrados valores séricos do HAM próximos da média normal para idade e desenvolvimento puberal (paciente 14 com valores de HAM pouco abaixo de –1 desvio-padrão), em 1 caso (15) com valor próximo de +2 desvios-padrão para idade, e no outro caso (16) com valor muito acima de +2 desvios-padrão para idade e desenvolvimento puberal (Tabelas II e III, Figura 2).

Em 4 casos (17 a 20) foi feito o diagnóstico de **pseudo-hermafroditismo masculino devido a deficiência da enzima 5α-redutase tipo 2**, baseado na produção normal de testosterona e na relação extremamente elevada de T/DHT. Um destes casos (20) identidade social feminina procurou o serviço devido a ambigüidade genital, associação com puberdade masculina, com aumento peniano, testicular e pilificação, sem aparecimento de mamas, e à ultrassonografia pélvica não foi observado tecido prostático. Em 2 destes casos (19 e 20) os valores séricos de HAM encontraram-se muito abaixo de -2 desvios-padrão para idade e desenvolvimento puberal, e nos outros 2 (17 e 18) com valores entre -1 e -2 desvios-padrão para a idade (Tabelas II e III, Figura 2).

Nos demais 4 casos (21 a 24) foi feito o diagnóstico de **pseudo-hermafroditismo masculino idiopático**, baseado na ausência de dados clínicos relevantes, nos valores normais de gonadotrofinas, testosterona, relação T/DHT e nos achados anatomopatológicos de testículos normais. Em todos estes casos os valores séricos de HAM encontrados foram normais, em torno da média para a idade (apenas o caso 23 com níveis de HAM próximo de –1 desvio-padrão) (Tabelas II e III, Figura 2).

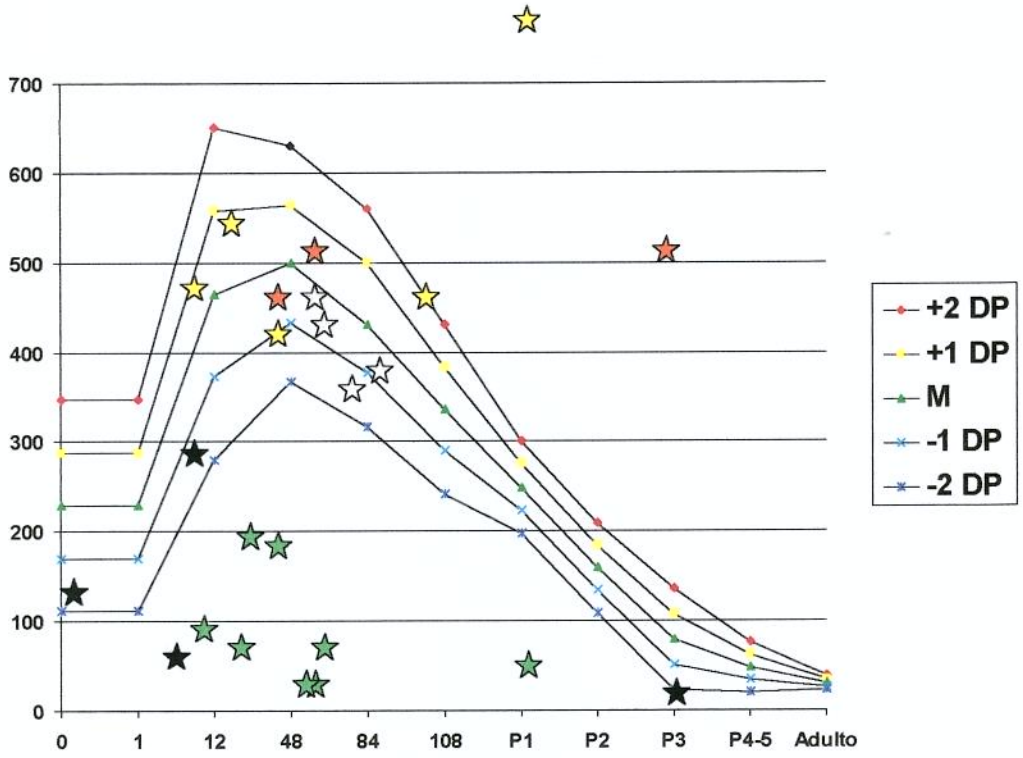


Figura 2: Distribuição normal dos valores séricos de hormônio anti-Mülleriano (pMol/L) (média ± 1 e 2 DP) para o sexo masculino de acordo idade e desenvolvimento puberal (REY *et al.*, 1999) e valores encontrados em 24 casos de ambigüidade genital com cariótipo 46,XY, acompanhados no GIEDDS entre 5/96 e 5/98, separados por diagnóstico etiológico (estrela verde = disgenesia gonadal; vermelha = deficiência de 3β-hidroxiesteróide desidrogenase; amarela = insensibilidade androgênica; preta = deficiência de 5α-redutase tipo 2; e branca = idiopático).

DISCUSSÃO

"A primeira pergunta que se faz sobre um recém-nascido é: "É menino ou menina?" Quando não se pode responder a essa pergunta sem pensar duas vezes, trata-se de uma emergência médica. O médico deve agir rapidamente para detectar condições potencialmente fatais, deixar os pais mais à vontade com a situação e iniciar uma avaliação que permitirá a pronta designação do sexo."

PAGON, 1987

Diante de uma criança com ambigüidade genital parece claro que a determinação da etiologia deve ser feita o mais rápido possível, tanto para que seja definido o sexo de criação mais adequado para cada caso, evitando-se problemas psicológicos, quanto para se identificar doenças potencialmente letais, como a hiperplasia congênita das supra-renais.

Dentre as várias causas da ambigüidade genital, o diagnóstico mais trabalhoso é o da criança com ambigüidade genital e cariótipo 46, XY, pela necessidade de avaliação hormonal complexa, e muitas vezes com confirmação por estudos de biologia molecular.

Podem ser várias as etilogias da ambigüidade genital em pacientes com cariótipo 46,XY, incluindo defeitos da diferenciação gonadal (disgenesias e hermafroditismo), além de anormalidades na síntese, metabolismo ou ação androgênica.

Um estudo recente de 163 casos com ambigüidade genital acompanhados pelo Ambulatório do GIEDDS mostrou que 41,7% dos casos apresentavam pseudo-hermafroditismo masculino e dentre eles foi alta a freqüência dos diagnósticos etiológicos não esclarecidos, talvez por falha no método de investigação. Os diagnósticos de insensibilidade androgênica e deficiência de 5α-redutase 2 necessitam freqüentemente métodos mais sofisticados (GUERRA JR, 1997).

Os estudos moleculares ajudam a estabelecer a origem do distúrbio, porém demandam tempo, experiência e custo. O exame clínico cuidadoso e estudos laboratoriais completos, em especial a avaliação hormonal, devem ser realizados para guiar o diagnóstico (PAGON, 1987; DAMIANI, 1989; HOROWITZ & GLASSBERG, 1992; HUGHES *et al.*, 1992).

Classicamente, os valores séricos de testosterona e gonadotrofinas têm sido utilizados em pacientes com ambigüidade genital para avaliar a função testicular. Deve-se lembrar que as determinações séricas de testosterona nos períodos em que o eixo hipotálamo-hipósife não está ativado (após os 6 meses de idade até início da puberdade) necessitam o estímulo com gonadotrofina coriônica.

Como demonstrado na literatura, neste estudo o resultado da determinação da testosterona basal ou após estímulo com gonadotrofina coriônica também separou os grupos diagnósticos: de um lado, aqueles com valores séricos baixos de testosterona, o grupo com disgenesia gonadal (8 pacientes: 1 a 8) e o grupo com defeito de síntese da testosterona (3 pacientes: 9 a 11) (Tabela III), e de outro lado, aqueles com valores normais de testosterona, o grupo com insensibilidade androgênica (5 pacientes: 12 a 16), o grupo com deficiência da enzima 5α-redutase 2 (4 pacientes: 17 a 20) e os idiopáticos (4 pacientes: 21 a 24).

Com relação às gonadotrofinas pudemos observar o predomínio do FSH sobre LH (LH/FSH $\leq$ 0,3) no grupo com disgenesia gonadal (pacientes 1 a 8) indicando uma disfunção tubular, confirmada pela biópsia gonadal. Os pacientes que apresentavam predomínio do LH sobre FSH (LH/FSH > 2) tinham deficiência na produção ou ação da testosterona. Entre eles o grupo de defeito de síntese de testosterona (pacientes 9 a 11), com valores de testosterona que não atingiram valores normais após estímulo com hCG e apresentavam valores de DHEA elevada (basal e pós-estímulo com ACTH), confirmando o diagnóstico de deficiência de 3β-OH-esteróide desidrogenase, e o grupo com insensibilidade androgênica (pacientes 12 a 16), com valores de testosterona basal ou após estímulo com hCG normais, e pouca ou nenhuma resposta de aumento do falo ao estímulo prolongado com testosterona exógena de depósito.

O restante dos pacientes que não apresentaram predomínio evidente de uma gonadotrofina foi composto pelo grupo com deficiência da 5α-redutase tipo 2 (pacientes 17 a 20), diagnóstico este confirmado pelos valores normais de

testosterona e pela relação T/DTH elevada, e pelo grupo idiopático (21 a 24), com valores hormonais normais sem nenhuma outra particularidade.

Neste estudo, nós analisamos os valores séricos de HAM, como indicador da função das células de Sertoli imaturas, na tentativa de observarmos o quanto ele pode ajudar na realização do diagnóstico.

A expressão do HAM (visualizado por imunohistoquímica) pelas células de Sertoli imaturas de testículos disgenéticos é normal. O grau de regressão de Müller e os níveis séricos do HAM refletem o número e não a função das células de Sertoli (REY *et al.*, 1996). Em todos os nossos casos de disgenesia gonadal (1 a 8) observamos valores de HAM baixos (abaixo de –2 desvios-padrão), valores estes apenas semelhantes ao grupo com deficiência da 5α-redutase tipo 2, com 2 pacientes (17 e 18) com valores abaixo de –1 desvio-padrão e os outros 2 pacientes (19 e 20) com valores abaixo de –2 desvios-padrão (Tabela III e Figura 2).

Quando comparamos os valores séricos de HAM com presença de derivados de Müller, não conseguimos demonstrar a presença destes derivados em 4 casos, apesar dos baixos valores séricos em 3 casos de disgenesia gonadal parcial (3, 5 e 7) e em 1 caso de pseudo-hermafroditismo masculino disgenético com regressão testicular unilateral (6). Estes achados podem demonstrar a baixa sensibilidade dos métodos utilizados para avaliação da genitália interna, ou a menor gravidade da disgenesia gonadal. Ainda neste grupo de casos, a presença de útero e/ou trompas relacionou-se ao maior comprometimento da gônada ipsilateral, onde observou-se a associação de gônada disgenética (1, 2 e 4) com a presença de derivados de Müller ipsilateral. No caso com anorquia à esquerda (6) foi possível estabelecer o diagnóstico de regressão testicular pois a ausência de derivados de Müller é evidência da existência de tecido testicular deste lado em torno da 8ª. semana de vida, época em que os ductos de Müller são sensíveis ao HAM. No caso da síndrome de Dennys-Drash (8) o grau de comprometimento testicular com valores séricos baixos de HAM é evidenciado pela presença de útero rudimentar.

Estes dados mostram como a ação do HAM é peculiar, ou seja, cada testículo produz HAM que vai agir do seu lado, fazendo a regressão dos ductos de Müller, que tem época certa para acontecer, exatamente na 8ª. semana de gestação (DONAHOE, *et et al.*, 1982; JOSSO, *et al.*, 1993).

Os casos com aumento do utrículo prostático (pacientes 7, 9, 12, 17 e 18) provavelmente estão relacionados com a diminuição de síntese ou ação da testosterona na masculinização do seio urogenital, dependente da enzima 5α-redutase, e também a uma maior associação com hipospadia (IKOMA *et al.*, 1985; SHIMA *et al.*, 1992).

Os casos em que os valores séricos de HAM foram normais ou elevados, indicando a preservação das células de Sertoli, foram compostos pelo grupo com deficiência de síntese de testosterona (9 a 11), insensibilidade androgênica (12 a 16) e idiopáticos (21, 22, e 24).

Observamos que os valores séricos mais elevados de HAM foram encontrados nos casos que apresentaram algum desenvolvimento puberal, um caso (11) com pseudo-puberdade e deficiência de 3β-OH-esteróide desidrogenase, e outro (16) com puberdade feminina e insensibilidade completa aos andrógenos. Estes dados que são concordantes com os de REY *et al.* (1994 e 1999) onde nos casos de deficiência de síntese ou ação da testosterona os valores de HAM estão elevados no 1°. ano de vida, retornam a valores normais na infância (1 a 9 anos de idade) e voltam a estar muito elevados na puberdade. A elevação do HAM nestes casos seria explicada pela falta de inibição da testosterona, que age por meio dos receptores androgênicos, sobre as células de Sertoli. Esta inibição é mais marcante durante o 1°. ano de vida e na puberdade (REY *et al.*, 1993; REY *et al.*, 1994; REY & JOSSO, 1996).

Observamos ainda que nos 4 casos de deficiência de 5α-redutase tipo 2, três (17 a 19) no primeiro ano de vida e outro (20) em puberdade, os valores de HAM foram baixos (17 e 18, abaixo de –1 desvio-padrão, e pacientes 19 e 20, abaixo de –2 desvio-padrão). Até o momento não foram descritos casos semelhantes na literatura,

mas parece lógico que isto ocorra, já que estes pacientes têm valores normais de testosterona, com tendência a elevação na puberdade com receptor androgênico normal (WILSON *et al.*, 1993; LINDZEY *et al.*, 1994).

Nos casos idiopáticos os valores de HAM foram normais para idade em todos os 4 casos, sendo três (21, 22 e 24) próximos da média, e um caso (23) entre –1 e –2 desvios-padrão. Estes dados são semelhantes aos já descritos na literatura, onde os valores de HAM que podem ser normais ou pouco diminuídos neste grupo de pacientes com cariótipo 46,XY e ambigüidade genital sem etiologia definida (JOSSO *et al.*, 1990; REY *et al.*, 1994).

Estes resultados mostram que com a análise combinada da testosterona basal ou após estímulo com gonadotrofina coriônica, as gonadotrofinas, e o HAM podemos ter uma idéia do diagnóstico etiológico.

Valores baixos de testosterona podem ser indicativos de disgenesia testicular, e distúrbio de síntese de testosterona, e hipoplasia das células de Leydig. Os valores de FSH podem estar elevados no primeiro grupo, e nos demais podem ser encontrados valores elevados de LH, mas eles podem se apresentar com valores normais, após o primeiro ano de vida e antes da puberdade. O HAM pode ser extremamente útil na diferenciação destes grupos pois estará diminuído nas disgenesias testiculares, e elevado ou normal nos distúrbios da síntese de testosterona e hipoplasia das células de Leydig. No entanto, é necessária a determinação dos precursores da testosterona para diferenciar os distúrbios da síntese dos demais casos. Assim, a análise combinada da testosterona após hCG, HAM e gonadotrofinas parece dar uma maior compreensão da função testicular dos pacientes com ambigüidade genital.

O mesmo pode-se aplicar quando comparamos pacientes com defeito de síntese e insensibilidade androgênica. Em ambos os casos, os níveis do HAM são quase sempre elevados, indicando que a função das células de Sertoli não está afetada, e esse achado reflete a ausência da ação androgênica normal, já que a

produção do HAM é inibida pela testosterona que atua sobre receptores androgênicos nas células de Sertoli (REY & JOSSO, 1996). Os valores de gonadotrofinas, especialmente o LH, podem estar elevados nos primeiros meses de vida após nascimento, mas aparecem normais após este período. A diferenciação etiológica nestes casos se fará pela avaliação da secreção androgênica, encontrando-se a função secretora das células de Leydig preservada na insensibilidade androgênica, enquanto a baixa produção de testosterona com algum dos seus precursores alterados indica uma função esteroidogênica anormal.

Nossos resultados quanto aos valores do HAM nos casos com disgenesia gonadal ou defeitos na síntese ou ação androgênica são similares àqueles descritos por REY et al. (1999). Entretanto, não havia nenhum caso de deficiência de 5α-redutase tipo 2 na amostra destes autores, bem como nos demais estudos descritos na literatura.

Os indivíduos portadores de deficiência de 5α-redutase tipo 2 caracterizam-se por ambigüidade genital em pacientes com cariótipo 46,XY, com valores séricos normais ou pouco elevados de testosterona e gonadotrofinas. A testosterona precisa ser metabolizada a dehidrotestosterona, pela enzima 5α-redutase tipo 2 para diferenciação normal da genitália externa masculina. Quando o gene que codifica esta enzima está alterado, o feto é incompletamente virilizado, embora na puberdade maior quantidade da produção de testosterona é transformada em dehidrotestosterona isoforma tipo1 da 5α-redutase expressada nos tecidos não-genitais (THIGPEN *et al.*, 1993; LINDZEY *et al.*, 1994). O diagnóstico desta desordem é às vezes difícil, não podendo ser descartada somente com a falta de uma relação T/DHT elevada.

Neste estudo, apresentamos 4 pacientes com deficiência da 5α-redutase 2 (17 a 20), nos quais os valores séricos de gonadotrofinas e testosterona são normais e não fazem o diagnóstico diferencial com insensibilidade androgênica. Este último grupo ainda possui a relação T/DHT pouco acima do normal, dificultando ainda mais o diagnóstico diferencial. Nos pacientes com deficiência da 5α-redutase 2,

diferentemente dos casos de insensibilidade androgênica, observamos que o HAM não está elevado, indicando que a testosterona é capaz de modular a sua produção pelas células de Sertoli.

Apesar do pequeno número de pacientes, estes achados sugerem que a determinação do HAM pode ser útil para distinguir entre insensibilidade androgênica e deficiência de 5α-redutase tipo 2 nos pacientes com ambigüidade genital que apresentam valores normais de testosterona, em especial entre os pacientes com deficiência de 5α-redutase tipo 2 nos quais a transformação periférica de testosterona em dehidrotestosterona pela isoforma 5α-redutase tipo 1 pode mascarar o diagnóstico.

Além disso, esses resultados sugerem que a testosterona não necessita ser convertida em dehidrotestosterona para inibição do HAM.

No que se sabe uma análise combinada da relação T/DHT, juntamente com HAM ainda não havia sido descrita nos pacientes com deficiência de 5α-redutase tipo 2. Acreditamos que, do ponto de vista de investigação hormonal, a determinação sérica do HAM possa ser o ponto que separa o diagnóstico diferencial entre a insensibilidade androgênica e a deficiência da 5α-redutase tipo 2. Tendo em vista a recente comercialização do *kit* de ELISA para a determinação sérica do HAM, associada à facilidade da coleta que não necessita estímulo com hCG, e ainda por ser um procedimento rápido, a dosagem do HAM deve ser incluída na investigação hormonal de pacientes com ambigüidade genital e cariótipo 46, XY.

CONCLUSÕES

1. Em relação à avaliação das células de Leydig por meio da determinação sérica da testosterona, foram encontrados valores de testosterona baixos, basais ou pós-estímulo, nos casos de disgenesia gonadal, valores que mostravam resposta parcial pós-estímulo nos casos de deficiência de síntese da testosterona, e valores normais nos casos de insensibilidade androgênica e deficiência da 5α-redutase 2.

2. Em relação à avaliação das células de Sertoli pela determinação sérica do hormônio anti-Mülleriano, foram encontrados valores diminuídos nos casos de disgenesia gonadal, devido ao comprometimento do tecido testicular, e nos casos de deficiência da 5α-redutase 2, provavelmente significando que a testosterona, mesmo sem a conversão a dehidrotestosterona, é suficiente para inibir, através dos receptores androgênicos, a produção do hormônio anti-Mülleriano. Os valores séricos do hormônio anti-Mülleriano mostraram-se elevados ou normais nos casos de insensibilidade aos andrógenos, confirmando o defeito na ação da testosterona sobre as células de Sertoli, e nos casos de deficiência de 3β-hidroxiesteróide desidrogenase, onde os valores séricos de testosterona não foram suficientes para inibir a produção do hormônio anti-Mülleriano. Esta elevação do hormônio anti-Mulleriano ocorreu de forma mais marcante nos casos que já haviam iniciado a puberdade ou no 1°. ano de vida.

3. A determinação sérica do hormônio anti-Mülleriano permitiu diferenciar, dentre os grupos que apresentavam testosterona em valores baixos, os casos de disgenesia gonadal, com valores baixos do hormônio anti-Mülleriano, dos casos com deficiência de 3β-hidroxiesteróide desidrogenase, com valores altos ou normais deste hormônio. Dentre os grupos com testosterona normal, os valores do hormônio anti-Mülleriano permitiram diferenciar os casos de insensibilidade androgênica, com valores elevados ou normais deste hormônio e os casos de deficiência da 5α-redutase 2, com valores baixos do hormônio.

RESUMO

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS DE LEYDIG E DE SERTOLI EM 24 CASOS DE AMBIGÜIDADE GENITAL COM CARIÓTIPO 46,XY.

A investigação diagnóstica etiológica da ambigüidade genital é muito complexa. A diferenciação sexual é dependente da ação de dois hormônios testiculares: a testosterona e o hormônio anti-Mülleriano (HAM). Apesar da função testicular ser tradicionalmente avaliada apenas pela capacidade esteroidogênica das células de Leydig e pela espermatogênese, tem sido mostrado recentemente que a determinação sérica do HAM pode ser de grande utilidade para os clínicos, como marcador da função das células de Sertoli. O HAM é o responsável pela regressão dos ductos de Müller no feto, continua a ser secretado após o nascimento pelas células de Sertoli imaturas, e é negativamente regulado pela testosterona na puberdade. O objetivo deste estudo foi avaliar a função das células de Leydig e de Sertoli em pacientes com ambigüidade genital e cariótipo 46,XY para estabelecer parâmetros bioquímicos a fim de auxiliar no diagnóstico etiológico. Foram realizadas as determinações séricas dos andrógenos, do HAM e das gonadotrofinas em 24 pacientes com ambigüidade genital e cariótipo 46,XY. O diagnóstico etiológico destes casos foi: 8 com disgenesia gonadal, 5 com insensibilidade androgênica, 4 com deficiência de 5α-redutase tipo 2, 3 com deficiência da enzima 3β-OH-esteróide desidrogenase, e 4 idiopáticos. Os resultados mostraram que quando a testosterona estava baixa e as gonadotrofinas algumas vezes elevadas nos pacientes com disgenesia gonadal ou deficiência da enzima 3β-OH-esteróide desidrogenase, o HAM apresentou-se muito diminuído no primeiro grupo e normal ou elevado no segundo, auxiliando o diagnóstico. Os valores séricos de HAM e gonadotrofinas mostraram-se normais ou elevados em pacientes com deficiência da enzima 3β-OH-esteróide desidrogenase e insensibilidade androgênica, porém nestes casos a testosterona possibilitou o diagnóstico diferencial. Os valores séricos de testosterona e das gonadotrofinas foram normais ou elevados nas insensibilidades androgênicas e nos casos de deficiência de 5α-redutase tipo 2, entretanto, o HAM apresentou-se normal ou elevado nas insensibilidades androgênicas, e diminuído nos outros casos, indicando que a testosterona não necessita ser transformada em

dehidrotestosterona para inibir o HAM no testículo. Concluiu-se que a avaliação combinada de andrógenos, HAM e gonadotrofinas permite a compreensão fisiopatológica testicular e possibilita o estabelecimento do diagnóstico diferencial de pacientes com ambigüidade genital.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE TUBULAR AND THE INTERSTITIAL FUNCTIONS IN 24 PATIENTS WITH AMBIGUOUS GENITALIA AND XY KARYOTYPE.

The investigation of the origin of sex ambiguity is a very complex matter. Sex differentiation is dependent upon the action of two testicular hormones: testosterone and anti-Müllerian hormone (AMH). 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 the serum AMH may also help clinicians, as a marker of Sertoli cell function. AMH is responsible for the regression of Müllerian ducts in the male fetus, continues to be secreted after birth by immature Sertoli cells, and is negatively regulated by testosterone at puberty. The aim of this study was to evaluate both Leydig and Sertoli cell function 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 sex ambiguity and XY karyotype. The diagnosis of these cases was: 8 with gonadal dysgenesis, 5 with androgen insensitivity syndrome, 4 with 5α-reductase 2 deficiency, 3 with 3β-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency, and 4 idiopathic. Our results showed that while testosterone was low and gonadotropins sometimes elevated in patients with either gonadal dysgenesis or 3β-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency, AMH was very low in the former and normal or high in the latter, helping to guide the diagnosis. Serum AMH and gonadotropins were normal or high in patients with either 3β-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency or androgen insensitivity syndrome, but testosterone levels made the distinction. Serum testosterone and gonadotropins were normal or high in androgen insensitivity syndrome and 5α-reductase 2 deficiency patients; however, while AMH was normal or elevated in androgen insensitivity syndrome, it was not the case in 5α-reductase 2 deficiency patients, indicating that testosterone does not need to be transformed to dihydrotestosterone to inhibit AMH in the testis. We conclude that the combined measurement of androgens, AMH and gonadotropins enhances the comprehension of testicular pathophysiology and helps to establish the diagnosis in intersex patients.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARSKOG, D. - Maternal progestins as a possible cause of hypospadias. N. Engl. J. Med., 300: 75-78, 1979.

AIMAN, J.; GRIFFIN, J.E.; GAZAK, J.M.; WISON, J.D.; MACDONALD, P.C. - Androgen insensitivity as a cause of infertility in otherwise normal men. N. Engl. J. Med., 300: 223-227, 1979.

AL JURAYYAN, N.A.M.; PATEL, P.J.; AL HERBISH, A.S.; ABDULLAH, M.A.; ABO-BAKR, A.M.; AL RABEEAH, A.A.; JAWAD, A.J.; AL SAMMARA, A.I. - Ambigous genitalia: comparative role of pelvic ultrasonography and genitography. Ann. Trop. Paediatr., 15: 203-207, 1995.

ANDERSSON, M.; PAGE, D.C.; DE LA CHAPELLE, A. - Chromosome Y-specific DNA is transferred to the short arm of X chromosome in human XX males. Science, 233: 786-788, 1986.

BAKER, M.L.; METCALFE, S.A.; HUSTON, J.M. - Serum levels of Müllerian inhibiting substance in boys from birth to 18 years, as determined by enzyme immunoassay. J. Clin. Endocrinol. Metab., 70: 11-15, 1990.

BAKER, S.W. - Psychosexual differentiation in the human. Biol. Reprod., 22: 61-68, 1980.

BARDONI, B.; ZANARIA,E.; GUIOLI, S.; FLORIDIA, G.; WORLEY, K.C.; TONINI, G.; FERRANTE, F.; CHIUMELLO, G.; M CCABE, E.R.; FRACCARO, M. - A dosage-sensitive locus at chromossome Xp21 is envolved in male to female sex reversal. Nat. Genet., 7: 497-501, 1994.

BEIGUELMAN, B. - A diferenciação sexual normal e anômala e as aberrações dos cromossomos sexuais. In: _____ - Citogenética Humana, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1982. p. 243-301.

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.

BERKOVITZ, G.D.; LEE, P.A.; BROWN, T.R.; MIGEON, C.J. - Etiologic evaluation of male pseudohermaphroditism in infancy and childhood. Am. J. Dis. Child., 138: 755-759, 1984.

BERTA, P.; MORIN, D.; POULAT, F.; TAVIAUX, S.; LOBACCARO, J.M.; SULTAN, C.; DUMAS, R. - Molecular analysis of the sex determining region from the Y chromosome in two patients with Fraiser syndrome. Horm. Res., 37: 103-106, 1992.

BÉZARD, J.; VIGIER, B.; TRAN, D.; MAULÉON P.; JOSSO N. - Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. J. Reprod. Fert., 80: 509-516, 1987.

BLANCHARD, M.G. & JOSSO, N. - Souce of the anti-Müllerian hormone synthesized by the fetal testis: Müllerian-inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in tissue culture. Pediatr. Res., 8: 968-971, 1974.

BOUCEKKINE, C.; TOUBLANC, J.E.; ABBAS, N.; CHAABOUNI, S.; OUAHID, S.; SEMROUNI, M.; JAUBERT, F.; TOUBLANC, M.; McELREAVEY, K.; VILAIN, E.; FELLOUS, M. - Clinical and anatomical spectrum of 46,XX reversed patients. Relationship to the presence of Y specif DNA-sequences. Clin. Endocrinol. (Oxf.), 40: 733-42, 1994.

BYRD, W.; BENNETT, M., J.; CARR, B., C.; DONG, Y.; WIANS, F.; RAINEY, W. – Regulation of biological active dimeric inhibin A and B from infancy to adulthood in male. J. Clin. Endocrinol. Metab., 83: 2849-2854, 1998.

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.

CATE, R.L.; MATTALIANO, R.J.; HESSION, C.; TIZARD, R.; FARBER, N.M.; CHEUNG, A.; NINFA, E.G.; FREY, A.Z.; GASH, D.J.; CHOW, E.P.; FISTER, R.A.; BERTONIS, J.M.; TORRES, G.; WALLNER, B.P.; RAMACHANDRAN, K.L.; RAGUI, R.C.; MANGANARO, T.F.; MACFANGHLIN, D.T.; DONAHOE, P.K. - Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animals cells. Cell, 45: 685-698, 1986.

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. Genet., 46: 156-167, 1990.

CLEARY, R.E.; CARAS, J.; ROSENFIELD, R.; YOUNG, P.C. - Endocrine and metabolic studies in a patient with male pseudohermaphroditism and true agonadism. Am. J. Obstet. Gynecol., 128: 862-867, 1977.

COHEN-HAGUENAUER, O.; PICARD, J.Y.; MATTÉI, M.G.; SERERO, S.; NGUYEN, V.C.; DE TAND, M.F.; GUERRIER, D.; HORS-CAYLA, M.C.; JOSSO, N.; FRÉZAL, J. - Mapping of the gene for anti-Müllerian hormone to the short arm of human chromossome 19. Cytogenet. Cell Genet., 44: 2-6, 1987.

CONNORS, M.H. & STYNE, D.M. - Familial functional anorchism: a review of etiology and management. J. Urol., 133: 1049-1051, 1985.

CONTE, F.A. & GRUMBACH, M.M. - The pathophysiology, genetics, nosology, and diagnosis of male pseudohermaphroditism. Front. Endocrinol., 20: 153-172, 1996.

COPPES, M.J.; HABER, D.A.; GRUNDY, P.E. - Genetic events in the development of Wilms' tumor. N. Eng. J. Med., 331: 586-590, 1993.

COPPES, M.J.; HUFF, V.; PELLETIER, J. - Denys-Drash syndrome: relating a clinical disorder to genetic alterations in the tumor supressor gene WT1. J. Pediatr., 123: 673-678, 1994.

CROCKER, M.; COGHILL, S.B.; CORTINHO, R. - An unbalanced autosomal translocation (7;9) associated with feminization. Clin. Genet., 34: 70-73, 1988.

DAMIANI, D.- Abordagem diagnóstica das anomalias da diferenciação sexual. In: SETIAN, N. Endocrinologia Pediátrica: aspectos físicos e metabólicos do recém-nascido ao adolescente. Sarvier, São Paulo, 1989. p. 361-365.

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: Perinatologia-Neonatologia. Panamericana, Buenos Aires, 1985. p. 1081-1120.

DEVINE JR, C.J.; GONZALES-SERVA, L.; STECKER, J.F. Jr, DEVINE, P.C.; HORTON, C.E. - Utricular configuration in hypospadias and intersex. J. Urol., 123: 407-411, 1980.

DI CLEMENTE, N.; GHAFFARI, S.; PEPINSKY, R.B.; PIEAU, C.; JOSSO, N.; CATE, R.L.; VIGIER, B. - A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-Müllerian hormone: the fetal ovary aromatase assay. Development, 114: 721-727, 1992.

DI CLEMENTE, N.; WILSON, C.; FAURE, E.; BOUSSIN, L.; CARMILLO, P.; TIZARD, R.; PICARD, J.Y.; VIGIER, B.; JOSSO, N.; CATE, R. – Cloning,

expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. Mol. Endocrinol., 8: 1006-1020, 1994.

DONAHOE, P.K.; ITO, Y., HENDREN, W.H. - A graded organ culture assay for the detection of Müllerian inhibiting substance. J. Surg. Res., 23: 141-143, 1977a.

DONAHOE, P.K.; ITO, Y.; MORIKAWA, Y.; HENDREN, W.H. - Müllerian inhibiting substance in human testes after birth. J Pediatr Surg, 12: 323-330, 1977b.

DONAHOE, P.K.; SWANN, D.A.; HAYASHI, A.; SULLIVAN, M.D. - Müllerian duct regression in the embryo correlated with cytotoxic activity against human ovarian cancer. Science, 205: 913-915, 1979.

DRASH, A.; SHERMAN, F.; HARTMANN, W.H.; BLIZZARD, R.M. - A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. J. Pediatr., 76: 585-593, 1970.

DRISCOLL, S.G. & TAYLOR, S.H. - Effects of prenatal estrogen on the male urogenital system. Obstet. Gynecol., 56: 537-542, 1980.

FELLOUS, M.; NUNES, M.; VEITIA-SARMIENTO, R.; ION, R.; TELVI, L.; McELREAVEY, K. - Pathology of sex determination in man: an approach to isolate non Y sex determining genes. Braz. J. Genet., 19 (suppl.): 85, 1996. (Abstract 553)

FRYNS, J.P.; KLECZKOWASKA, A.; CASAER, P.; VAN DER BERGHE, H. - Double autosomal chromosomal aberration (3 trissomy/9p monossomy) and sex reversal. Ann. Génét., 29: 49-52, 1986.

GIESE, K.; PAGEL, J.; GROSSCHEDL, R. - Distinct DNA-binding properties of the HMG domain of murine and human SRY. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3368-3372, 1994.

GOLDBERG, E.H.; MCLAREN, A.; REILLY, B. - Male antigen defined serologically does not identify a factor responsible for testicular development. J. Reprod. Immunol., 20: 305-309, 1991.

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.

GRIFFIN, J.E. - Androgen resistance: the clinical and molecular spectrum. N. Engl. J. Med, 326: 611-618, 1992.

GRIFFIN, J.E.; McPAUL, M.J.; RUSSELL, D.W.; WILSON, J.D. - The androgen resistance syndromes: steroid 5α-reductase 2 deficiency, testicular feminization and related disorders. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. (eds) - The metabolic and molecular basis of inherited disease. McGraw-Hill, New York, 1995. p. 2967-2998.

GROOME, N.P.; ILLINGWORTH, P.J.; O'BRIEN, M.; et al. – Measurement of dimeric inhibin-B throughout the human menstrual cycle. J. Clin. Endocrinol. Metab., 81: 1401-1405, 1996.

GRUMBACH, M.M. - Abnormalities of sex determination and differentiation. In: RUDOLPH, A.M.; HOFFMAN, J.I.E.; RUDOLPH, C.D. (eds) - Rudolph's Pediatrics, Appletos & Lange, Norwalk, 1996. p.1773-1789.

GRUMBACH, M.M. & DUCHARME, J.R. - The effects of androgens on fetal development: androgen-induced female pseudohermaphroditism. Fertil. Steril., 11: 157-161, 1960.

GUBBAY, J.; COLLIGNON, J.; KOOPMAN, P.; CAPEL, B.; ECONOMOU, A.; MÜNSTERBERG, A.; VIVIAN, N.; GOODFELLOW, P.N.; LOVEL-BADGE,

R. - A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family embryonically expressed genes. Nature, 346: 245-250, 1990.

GUERRA JÚNIOR, G. – Análise da resolução de 163 casos de ambigüidade genital em atendimento interdisciplinar no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas de 1989 a 1995. Campinas, 1997 (Tese – Doutorado – Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas).

GUSTAFSON, M.L.; LEE, M.M.; ASMUNDSON, L.; MACLAUGHLIN, D.T.; DONAHOE, P.K. - Müllerian inhibiting substance inthe diagnosis and management of intersex and gonadal abnormalities. J. Pediatr. Surg., 28: 439-444, 1993.

GUSTAFSON, M.L.; LEE, M.M.; SCULLY, R.E.; MONCURE, A.C.; HIRAKAWA, T.; GOODMAN, A.; MUNTZ, H.G.; DONAHOE, P.K.; MACLAUGHLIN, D.T.; FULLER, A.F. - Müllerian inhibiting substance as a marker for ovarias sex-cord tumor. N. Engl. J. Med., 326: 466-471, 1992.

GUTHRIE, R.D.; SMITH, D.W.; GRAHAM, B.: Testosterone treatment for micropenis during early childhood. J. Pediatr., 83 (2): 247-252, 1973.

HAQQ, C.M.; KING, C.Y.; DONAHOE, P.K.; WEISS, M.A. - SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1097-1101, 1993.

HARBISON, M.D.; MAGID, M.L.; JOSSO, N.; MININBERG, D.T.; NEW, M.I. - Anti-Müllerian hormone in three intersex conditions. Ann Génét, 3-4: 226-232, 1991.

HARDELIN, J.P.; LEVILLIERS, J.; YOUNG, J.; PHOLSENA, M.; LEGOUIS, R.; KIRK, J.; BOULOUS, P.; PETIT, C.; SCHAISON, G. - Xp22.3 deletions in

isolated familial Kallmann's syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab., 76: 827-831, 1993.

HAWKINS, J.R. - The SRY gene. Trends Endocrinol., 4: 328-338, 1993.

HOROWITZ, M.; GLASSBERG, K.I. - Ambiguous genitalia: diagnosis, evluation and treatment. Urol. Radiol., 14: 306-318, 1992.

HOUDAYER, C.; TOUTAIN, A.; RONCE, N.; LEFORT, G.; SARDA, P.; TAIB, J.; BRIAULT, S.; LAMBERT, J.C.; MORAINE, C. - X-linked alpha-thalassemia/mental retardation syndrome: linkage analysis in a new family further supports localization in proximal Xq. Ann. Genet., 36: 194-199, 1993.

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

HUGHES, A.I.; WILLIAM, D.M.; BATCH, J.A.; PATTERSON, M.N. - Male pseudohermaphroditism: clinical management, diagnosis and treatment. Horm. Res., 38: 77-81, 1992.

HUTSON, J.M. & DONAHOE, P.K. - The hormonal control of testicular descent. Endoc. Ver., 7: 270-283, 1986.

IKOMA, F.; SHIMA, H.; YABUMOTO, H. – Classification of enlarged prostatic utricle in patientes with hypospadias. Brit. J. Urol., 57: 334-337, 1985.

IMBEAUD, S.; BELVILLE, C.; MESSIKA-ZEITOUN, L.; REY, R.; CLEMENTE, N.; JOSSO, N.; PICARD, J.Y. - A 27 base-pair deletion of the anti-Müllerian type II

receptor gene is the most common cause of the persistent Müllerian duct syndrome. Hum. Mol. Genet., 5: 1269-1277, 1996.

IMBEAUD, S.; FAURE,E.; LAMARRE, I.; MATTÉI, M.G.; DI CLEMENTE, N.; TIZARD, R.; CARRÉ-EUSÈBE, D.; BELVILLE,C.; TRAGETHON, L.; TONKIN, C.; NELSON, J.; MCAULIFFE, M.; BIDART, J.M.; LABABIDI, A.; JOSSO, N.; CATE, R.L.; PICARD, J.Y. – Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor. Nat. Genet., 11: 382-388, 1995.

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

JIMÉNEZ, R.; SÁNCHEZ, A.; BURGOS, M. & DE LA GUARDIA, R.C. - Puzzling out the genetics of mammalian sex determination. Trends Genet., 12: 164-166, 1996.

JONES, K.L. - Smith's recognizable patterns of human malformation. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 4th edition, 1988. 778p.

JOSSO, N. - Interspecific character of the Müllerian-inhibiting substance: action of the human fetal testis, ovary and adrenal on the fetal rat Müllerian duct in organ culture. J. Clin. Endocrinol. Metab., 32: 404-409, 1971.

JOSSO, N. - Evolution of the Müllerian-inhibiting activity of the human testis. Biol. Neon., 20: 368-379, 1972a.

JOSSO, N. - Permeability of membranes to the Müllerian-inhibiting substance synthesized by the human fetal testis in vitro: a clue to its biochemical nature. J. Clin. Endoc., 34: 265-270, 1972b.

JOSSO, N. - In vitro synthesis of Müllerioan inhibiting substance hormone by seminiferous tubules isolated from the calf fetal testis. Endocrinology, 93: 829-834, 1973.

JOSSO, N. - Anti-mullerian hormone. Baillieres Clin. Endocrinol. Metab., 5: 635-654, 1991.

JOSSO, N. - Anti-Müllerian hormone and Sertoli cell function. Horm. Res., 38 (Suppl 2): 72-76, 1992a.

JOSSO, N. - Hormonal regulation of sexual differentiation. Semin. Perinatol., 16: 279-288, 1992b.

JOSSO, N. - Paediatric applications of anti-Müllerian hormone research. - Horm. Res., 43: 243-248, 1995.

JOSSO, N.; BOUSSIN, L.; KNEBELMANN, B.; NOHOUL-FÉKÉTÉ, C.; PICARD, J.Y. - Anti-Müllerian hormone and intersex states. Trends Endocrinol. Metab., 2: 227-233, 1991.

JOSSO, N. & BRIAND, M.L. - Embryonic testicular regression syndrome: variable phenotypic expression in siblings. J. Pediatr., 97: 200-204, 1980.

JOSSO, N.; CATE, R.; PICARD, J.Y.; VIGIER, B.; DI CLEMENTE, N.; WILSON, C.; IMBEAUD, S.; PEPINSKY, R., B.; GUERRIER, D.; BOUSSIN, L.; LEGEAI, L.; CARRÉ-EUSÈBE, D. – Anti-Müllerian hormone: the Jost factor. Rec. Prog. Horm. Res., 48: 1-59, 1993a.

JOSSO, N.; FÉKÉTÉ, C.; CACHIN, O.; NEZELOF, C.; RAPPAPORT, R. - Persistence of Müllerian pseudohermaphroditism, and its relationship to cryptorchidism. Clin. Endocrinol., 19: 247-258, 1983.

JOSSO, N.; LAMARRE, I.; PICARD, J.Y.; BERTA, P.; DAVIES, N., MORICHON, N.; PESCHANSKI, M.; JENY, R. - Anti-Müllerian hormone in early human developement. Early Hum. Dev.; 33: 91-99, 1993b.

JOSSO, N.; LEGEAI, L., FORREST, M.G.; CHAUSSAIN, J.L.; BRAUNER, R. - An enzyme linked immonoassay 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.

JOSSO, N.; PICARD, J.Y.; IMBEAUD, S.; CARRÉ-EUSÈBE, D.; ZELLER, J.; ADAMSBAUM, C. - The persistent Müllerian duct syndrome: a rare cause of cryptorchidism. Eur. J. Pediatr., 152 (Suppl 2): S76-S78, 1993c.

JOSSO, N.; PICARD, J.Y.; IMBEUD, S.; DI CLEMENTE, N.; REY. R. - Clinical aspects and molecular genetics of the persitent Müllerian duct syndrome. Clin. Endoc., 47: 137-144, 1997.

JOSSO, N. & REY, R. - L'hormone anti-Müllerienne en clinique humaine. Contracept. Fertil. Sex., 22: 661-663, 1994.

JOST, A. Recherches sua la differenciation sexuelle de l'embryon de lapin. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.,36:271-315, 1947.

JOST, A. - Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. Recent Prog. Horm. Res., 8: 379-418, 1953.

KOOPMAN, P.; GUBBAY, J.; VIVIAN, N.; GOODFELLOW, P.; LOVEL-BADGE, R. - Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. Nature, 351: 117-121, 1991.

KREMER, H.; KRAAIG, R.; TOLEDO, S.P.A.; POST, M.; FRIDMAN, J.B.; HAYASHIDA, E.Y.; VAN HEEN, M.; MILGRON, E.; ROPERS, H.H.;

MARIMAN, E. - Male pseudohermaphroditism due to homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene. Nat. Genet., 9: 160-164, 1995.

KROB, G.; BRAUN, A.; KUHNLE, U. - True hermaphroditism: geographical distribution, clinical findings, chromosomes and gonadal histology. Eur. J. Pediatr., 153: 2-10, 1994.

LATRONICO, A.C.; ANASTI, J.; ARNHOLD, I.J.; RAPPAPORT, R.; MENDONÇA, B.B.; BLOISE, W.; CASTRO, M.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G.P. - Testicular and ovarian resistence to luteinizing hormone caused by homozygous inactiving mutations of the luteinizing hormone receptor gene. N. Engl. J. Med., 334: 507-512, 1996.

LEE, M.M. & DONAHOE, P.K. – Müllerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. Endoc. Rev.,14: 152-164, 1993.

LEE, M.M.; DONAHOE, P.K.; GUSTAFSON, M.L.; CHANG, Y.C.; MAC LAUGHLIN, D.T. - Measurements of serum Müllerian inhibiting substance in the evaluation of children with nonpalpable gonads. N. Eng. J. Med., 22: 1480-1486, 1997.

LIN, D.; SUGAWARA, S.; STRAUSS J.F. III; CLARK, B.J.; STOCCO, D.M.; SAENGER, P.; ROGOL, A. & MILLER, W.L. - Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. Science, 267: 1828-1831, 1995.

LINDZEY, J.; KUMAR, M.V.; GROSSMAN, M.; YOUNG, C.; TINDALL, D.J. – Molecular mechanisms of androgen action. Vit. Horm., 49: 383-432, 1994.

LIPPE, B. - Ambiguous genitalia and pseudhermaphroditism. Pediatr. Clin. N. Am., 26: 91-106, 1979.

LONGUI, C., A.; ARNHOLD, I., J., P.; MENDONÇA, B., B.; D'OSVALDO, A., F.; BLOISE, W. – Serum inhibin levels before and after gonadotropin stimulation in cryptorchid boys under age 4 years. J. Pediatr. Endocrinol. Metab., 11: 687-692, 1998.

LUO, X.; IKEDA, Y.; PARKER, K.L. - A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. Cell, 77: 481-490, 1994.

MACIEL-GUERRA, A.T.; FARAH, S.B.; GARMES, H.M.; PINTO JR., W.; SILVA, J.M.B.; BAPTISTA, M.T.M.; MARQUES-DE-FARIA, A.P.; GUERRA JR., G.; MELLO, M.P. - True agonadism: report of a case analysed with Y-specific DNA probes. Am. J. Med. Genet.,41: 444-445, 1991.

MAJDIC, G.; MILLAR, M.R.; SAUNDERS, P.T.K. - Immunolocalisation of androgen receptor to intersticial cells in fetal rat testes and to mesenchymal and epithelial cell of associated ducts. J. Endocrinol.,147: 285-293, 1995.

MARSHALL,W.A. & TANNER, J.M. – Variation in pattern of pubertal changes in boys. Ach Dis Child, 45: 13-17, 1970.

MENDONÇA, B.B.; RUSSELL, A.J.; VASCONCELOS-LEITE, M.; ARNHOLD, I.J.; BLOISE, W.; WAJCHENBERG, B.L.; NICOLAU, W.; SUTCLIFFE, R.G.; WALLACE, A.M. - Mutation in 3ß hydroxysteroiddehydrogenase type II associated with pseudohermaphroditism and premature pubarche or cryptic expression in females. J. Mol. Endocrinol., 12: 119-122, 1994.

MILLER, WL. - Immunoassays for human Müllerian inhibitory factor (MIF): new insights into the physiology of MIF. J. Clin. Endocrinol. Metab., 70: 8-10, 1990.

MONEY, J. - Psychologic evaluation of the child with intersex problems. Pediatrics, 36: 51-65, 1965.

MOORE, C.D. & GRUMBACH, M.M. - Sex determination and gonadogenisis: a transcription cascade of sex chromosome and autosome genes. Sem. Perinatol., 16: 266-278, 1992.

MOORE, K.L. - Sistema Urogenital. In: _____ - Embriologia Clínica, Interamericana, Rio de Janeiro, 1978. p. 219-258.

MUSCATELLI, F.; STROM, T.M.; WALKER, A.P.; ZANARIA, E.; RECAN, D.; MEINDE, A.; BARDONI, B.; GUIOLI, S.; ZEHETNER, G.; RABL, W.; SCWARZ, A.P.; KAPLAN, J.C.; CAMERINO, G.; MEITINGER, T.; MONACO, A.P. - Mutations in DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. Nature, 372: 672-676, 1994.

NIEKERK, V.W.A. & RETIEF, A.E. - The gonads of human true hermaphrodites. Hum. Genet., 58: 117-122, 1981.

NORDQVIST, K. - Sex differentiation - gonadogenesis and novel genes. Int. J. Dev. Biol., 39: 727-736, 1995.

NUNES, M.; ION, A.; BOURGERON, N.; SOULEYREAU, N.; BARBAUX, S.; VEITIA, R.; WEISSENBACH, J.; LE PALIER, D.; FELLOUS, M.; McELREAVEY, K. - Rearrangements of chromosome 8q associated with abnormal development of external genitalia. Braz. J. Genet., 19 (suppl.): 214, 1996. (Abstract 533)

ODAME, I.; DONALDSON, M.D.C.; WALLACE, A.M.; COCHRAN, W & SMITH, P.J. - Early diagnosis and management of 5a-reductase deficiency. Arch. Dis. Child., 67: 720-723, 1992.

OPITZ, J.M.; RICHIERI-DA-COSTA, A.; AASE, J.M.; BENKE, P.J. - FG syndrome update 1988; note of 5 new patients and bibliography. Am. J. Med. Genet., 30: 309-328, 1988.

PAGE, D.C.; FISHER, E.M.; McFILLIVRAY, B.; BROWN, L.G. - Addtional deletion in sex-determining region of the human Y chromosome resolves paradox of 46,X,t(Y;22) female. Nature, 346: 279-281, 1990.

PAGE, D.C.; MOSHER, R.; SIMPSON, E.M.; FISHER, E.M.; MARDON, G.; McGILLIVRAY, B.; DE LA CHAPELLE, A.; BROWN, L.G. - The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. Cell, 51: 1091- 1104, 1987.

PAGON, R.A., MD. Diagnostic aproach to the new born with ambiguous genitalia. Pediatr. Clin. N. Am., 34: 1019-1031, 1987.

PELLETIER, J.; BRUENING, W.; KASHTAN, C.E.; MAUER, S.M.; MANIVEL, J.C.; STRIEGEL, J.E.; HOUGHTON, D.C.; JUNIEN, C.; HABIB, R.; FOUSER, L.; FINE, R.N.; SILVERMAN, B.L.; HABER, D.A.; HOUSMAN, D. - Germline mutations in the Wilms' tumor supressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. Cell, 67: 437-447, 1991.

PEPINSKY, B.R.; SINCLAIR, L.K.; CHOW, E.P.; MATTALIANO, R.J.; MANGANARO, T.F.; DONAHOE, P.K.; CATE, R.L. - Proteolytic processing of Müllerian inhibiting substance produces a transforming growth factor-β-like fragment. J. Biol. Chem., 263: 18961-18964, 1988.

PEREIRA, E.T.; de ALMEIDA, J.C.; GUNHA, A.C.; PATTON, M.; TAYLOR, R.; JEFFERY, S. - Use of probes for ZFY, SRY, and the Y pseudoautosomal boundary in XX males, XX true hermaphrodites, and an XY female. J. Med. Genet., 28: 591-595, 1991.

PICARD, .J.Y.; BENAROUS, R.; GUERRIER, D.; JOSSO, N.; NAHN, A. - Cloning and expression of cDNA for anti-Müllerian hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 5464-5468, 1986.

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

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

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

PINSKY, L.; BEITEL, L.K.; KAZEMI-ESFARJANI, P.; LUMBROSO, R.; VASILIOU, D.M.; SHKOLNY, D.; ABDULLAH, A.A.R.; GOTLIEB, B.; TRIFIRO, M.A. - Lessons from androgen receptor gene mutations that cause androgen resistence in humans. Front. Endocrinol., 20: 95-114, 1996.

PIVNIK, E.K.; WACHTEL, S.S.; WOODS, D.; SIMPSON, J.L.; BISHOP, C.E. - Mutations in the conserved domain of SRY are uncommon in XY gonadal dysgenesis. Hum. Genet, 90: 308-310, 1992.

POULLAUDE, J.M.; DAVID, L., FRANÇOIS, R. - Génitographie dans les ambiguïtés sexuellees de l'enfant. Rev. Fr. Gynécol. Obstét., 81: 319-320, 1986.

PRADER, A. - Der genital befund bein pseudohermaphroditismus femininus des kongenitalen adrenogenitalen syndrome. Helv. Paediatr. Acta., 9: 231-248, 1954.

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

REY, R.; AL-ATTAR, L.; LOUIS, F.; JAUBERT, F.; BARBET, P.; NIHOUL-FÉKÉTÉ, C.; CHAUSSAIN, J.L.; JOSSO, N. – Testicular dysgenesis does not affect expression of anti-Müllerian hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. Am. J. Pathol., 148: 1689-1698, 1996-b

REY, R.A.; BELVILLE, C.; NHOUL-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 mesurement. J. Clin. Endocrinol. Metab., 84: 627-631, 1999.

REY, R.A. & JOSSO, N. – Regulation of anti-Müllerian hormone secretion. Eur. J. Endocrinol., 135: 144-152, 1996.

REY, R.A.; LHOMMÉ, C.; MARCILLAC, I.; LAHLOU, N.; DUVILLARD, P.; JOSSO, N.; BIDART, J.M. - Antimüllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumors of ovary: Comparative study with serum α-inhibin and estradiol. Am. J. Obstet. Gynecol., 174: 958-965, 1996-b.

REY, R.A.; LORDEREAU-RICHARD, I.; CAREL, J.C.; BARBET, P.; CATE, R.L.; ROGER, M.; CHAUSSAIN, J.L.; JOSSO, N. - Anti-Müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. J. Clin. Endocrinol. Metab., 77:1220-1226, 1993.

REY, R.A.; MEBARKI, F.; FOREST, M.G.; MOWAZOWICS, I.; CATE, R.L.; MOREL, Y.; CHAUSSAIN, J.L.; JOSSO, N. - Anti-Müllerian hormone in children with androgen insensitivity. J. Clin. Endocrinol. Metab., 79:960-964, 1994.

ROBIN, N.H.; FELDMAN, G.J.; ARONSON, A.L.; MITCHELL, H.F.; WEKSBERG, R.; LEONARD, C.O.; BURTON, B.K.; JOSEPHSON, K.D.; LAXOVA, R.; ALECK, K.A.; ALLANSON, J.E.; GUION-ALMEIDA, M.L.; MARTIN, R.A.; LEICHTMAN, L.G.; PRICE, R.A.; OPITZ, J.M.; MUENKE, M. - Opitz syndrome is genetically heterogeneous, with one locus on Xp22, and a second locus on 22q11.2. Nat. Genet., 11: 459-461, 1995.

RODRIGUES, A.G.; TARDELLI, A.M.D. & PIEROLA, I.C.: Testes dinâmicos. In: MONTE, O.; LONGUI, C.A.; CALLIARI, L.E.P.: Endocrinologia para o pediatra. Atheneu, São Paulo, 1998. pg 634-650.

ROSE, E.A.; GLASER, T.; JONES, C.; SMITH, C.L.; LEWIS, W.H.; CALL, K.M.; MINDEN, M.; CHAMPAGNE, E.; BONETTA, L.; YEGER, H.; HOUSMAN, D.E. - Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candite Wilms' tumor gene. Cell, 60: 405-508, 1990.

RUSSEL, A.J.; WALLACE, A.M.; FOREST, M.G.; DONALDSON, M.D.; EDWARDS, C.R.; SUTCLIFFE, R.G. - Mutation in the human gene for 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II leading to male pseudohermaphroditism without salt loss. J. Mol. Endocrinol, 12: 225-237, 1994.

RUSSEL, D.W. & WISON, J.D. - Steroid 5α-reductase: two genes/two enzymes. Ann. Rev. Biochem., 63: 25-61, 1994.

SCHWANZEL-FUKUDA, M.; BICK, D.; PFAFF, D.W. - Luteinizing-hormone-releasing-hormone (LHRH) expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. Mol. Brain Res., 6: 311-316, 1989.

SCHWINDT, B.; DOYLE, L.W.; HUTSON, J.M. - Serum levels of Müllerian inhibiting substance in preterm and term male neonates. J. Urol., 158: 610-612, 1997.

SHAN, L.X.; ZHU, L.J.; BARDIN, C.W.; HARDY, M.P. - Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig cell and sertoli cells by *in situ* hybridization. Endocrinology, 136: 3856-3862, 1995.

SHIMA, H.; YABUMOTO, H.; OKAMOTO, E.; ORESTANO, L.; IKOMA, F. - Testicular function in patients with hypospadias associated with enlarged prostatic utricle. Br. J. Urol., 69: 192-195, 1992.

SINCLAIR, A.H.; BERTA, P.; PALMER, M.S.; HAWKINS, J.R.; GRIFFITHS, BL.; SMITH, M.J.; FOSTER, J.W.; FRISCHAUF, A.M.; LOVEL-BADGE, R.; GOODFELLOW, P.N. - A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature, 346: 240-244, 1990.

SMALS, A.G.H.; GERLAG, F.F.M.; PIETERS, G.F.F.; DRAYER, J.I.M.; BENRAAD, T.J.; KLOPPENBORG, P.W.C.: Leydig cell responsiveness to single and repeated human chorionic gonadotrophin administration. J. Clin. Endocrinol. Metab., 49: 12-14, 1979.

STYNE, D.M. - Puberty and its disorders in boys. Endocrinol. Metab. Clin. N. Am., 20: 43-70, 1991.

STYNE, D.M. - The testes: disorders of sexual differentiation and puberty. In: SPERLING, M.A. (ed.) - Pediatric Endocrinology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1st. edition, 1996. p. 423-476.

TAKAHASHI, M.; KOIDE, S.S.; DONAHOE, P.K. - Müllerian inhibiting substance as oocyte meiosis inhibitor. Mol. Cell Endocrinol., 47:225-234, 1984.

THIGPEN, A.E.; SILVER, R.I.; GUILEYARDO, J.M.; CASEY, M.L.; MCCONNELL, J.D.; RUSSEL, D.W. – Tissue distribution and ontogeny of steroid 5α-reductase isozyme expression. J. Clin. Invest., 92: 903-910, 1993.

TINT, G.S.; SALEN, G.; BATTA A.K.; SHEFER, S.; IRONS, M.; ELIAS, E.R.; ABUELO, D.N.; JOHNSON, V.; LAMBERT, M.; LUTZ, R.; SCHANEN, C.; MORRIS, C.A.; HOGANSON, G., HUGHES-BENZIE, R. - Correlation of severity and outcome with plasma sterol levels in variants of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. J. Pediatr., 127: 82-87, 1995.

TOMMERUP, N.; SCHEMPP, W.; MEINECKE, P.; PEDERSEN, S.; BOLUND, L.; BRANDT, C.; GOODPASTURE, C.; GULDBERG, P.; HELD, K.R.; REINWEIN, H. - Assignment of an autossomal sex reversal locus (SRA1) and camptomelic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3-q25.1. Nat. Genet., 4: 170-174, 1993.

TONG, S.Y.; HUTSON, J.M.; WATTS, L.M. - Does testosterone diffuse down the wolffian duct during sexual differentiation? J. Urol., 155: 2057-2059, 1996.

TRAN, D.; MEUSY-DESSOLLE, N.; JOSSO, N. - Anti-Müllerian hormone is a marker of foetal Sertoli cells. Nature, 269: 411-412, 1977.

VIGIER, B.; FOREST, M.G.; EYCHENNE, B.; BÉZARD, J.; GARRIGOU, O.; ROBEL, P. - Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 3684-3688, 1989.

VIGIER, B.; PICARD, J.Y.; JOSSO, N. - A monoclonal antibody against bovine anti-Müllerian hormone. Endocrinology, 110: 131-137, 1982.

VIGIER, B.; PICARD, J.Y.; TRAN, D.; LEGEAI, L.; JOSSO, N. - Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. Endocrinology, 114:1315-1320, 1984.

WACHTEL, S.S. - Human sexual development. J. Endocrinol. Invest., 7: 663-667, 1984.

WAGNER, T.; WIRTH, J.; MEYER, J.; ZABEL, B.; HELD, M.; ZIMMER, J.; PASANTES, T.; BRICARELLI, F.D.; KEUTEL, J. & HUSTERT, E. - Autosomal sex reversal and camptomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. Cell, 79: 1111-1120, 1994.

WHITFIELD, L.S.; LOVEL-BADGE, R. & GOODFELLOW, P.N. - Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. Nature, 364: 713-715, 1993.

WILKIE, A.O.; CAMPBELL, F.M.; DAUBENEY, P.; GRANT, D.B.; DANIELS, R.J.; MULLARKEY, M.; AFFARA, N.A.; FITCHETT, M. & HUSON, S.M. - Complete and partial XY sex reversal associated with terminal deletion of 10q: report of 2 cases and literature review. Am. J. Med. Genet., 46: 597-600, 1993.

WILSON, C.A.; DI CLEMENTE, N.; EHRENFELS, C.; PEPINSKY, R.B.; JOSSO, N.; VIGIER, B.; CATE, R.L. – Müllerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-β superfamily. Mol. Endocrinol., 7: 247-257, 1993.

WILSON, J.D.; GRIFFEN, J.E.; RUSSELL, D.W. - Steroid 5a-reductase 2 deficiency. Endoc. Rev., 14: 577-593, 1993.

WILSON, J.D.; HARROD, M.J.; GOLDSTEIN, J.L.; HEMSELL, L.C.D.L.; MACDONALD, P.C. - Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 1. N. Engl. J. Med., 290: 1097-1103, 1974.

WITCHEL, S.S. & LEE, P.A. - Ambiguous genitalia. In: SPERLING, M.A. (ed.) - Pediatric Endocrinology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1st. edition, 1996. p. 31-49.

YANASE, T.; SIMPSON, E.R.; WATERMAN, M.R. - 17a hydroxylase/17,20 lyase deficiency . From clinical investigation to molecular definition. Endoc. Rev., 12: 91-108, 1991.

ZANARIA, E.; MUSCATELLI, F.; BARDONI, B.; STROM, T.M.; GUIOLI, S.; GUO, W.; LALLI, E.; MOSER, C.; WALKER, A.P.; McCABE, E.R.B.; MEITINGER, T.; MONACO, A.P.; SASSONE-CORSI, P.; CAMERINO, G. - An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. Nature, 372: 635-641, 1994.

ANEXO

Valores normais para o sexo masculino das determinações séricas hormonais realizadas neste estudo padronizadas no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Patologia Clínica da FCM - UNICAMP:

1. **LH:**
   basal pré-puberal: 0,1 a 1,0 mUI/mL
   basal puberal: 0,1 a 8,7 mUI/mL
2. **FSH:**
   basal pré-puberal: 0,1 a 1,4 mUI/mL
   basal puberal: 0,1 a 4,9 mUI/mL
3. **Testosterona total:**
   basal pré-puberal: < 0,1 a 0,7 ng/mL
   basal adulto: 2,2 a 18,0 ng/mL
   pós-estímulo hCG: > 1,5 ng/mL
4. **Dehidrotestosterona:**
   basal pré-puberal: < 0,06 ng/mL
   basal puberal: 0,05 a 0,65 ng/mL
5. **Dehidroepiandrosterona:**
   basal pré-puberal: 0,1 a 8,0 ng/mL
   60' pós-estímulo ACTH: < 20 ng/mL
6. **Androstenediona:**
   basal pré-puberal: 0,1 a 0,5 ng/mL
   basal puberal: 0,4 a 1,9 ng/mL
7. **Gonadotrofina coriônica - fração beta:**
   homens normais: < 25 mUI/mL