

HELENA CAMPOS FABBRI

**“ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *NR5A1* EM PACIENTES
46,XY COM DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO DO SEXO”**

CAMPINAS

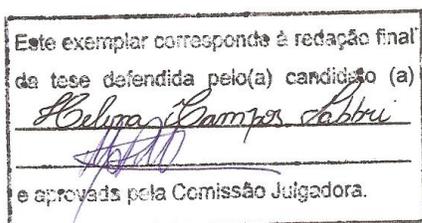
2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA
HELENA CAMPOS FABBRI**

**“ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *NR5A1* EM
PACIENTES 46,XY COM DISTÚRBIOS DA
DIFERENCIAÇÃO DO SEXO”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a) Maricilda Palandi de Mello

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

F111a Fabbri, Helena Campos, 1987-
Análise molecular do gene NR5A1 em pacientes
46,XY com distúrbios da diferenciação do sexo / Helena
Campos Fabbri. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Maricilda Palandi de Mello.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Disgenesia gonadal. 2. Fator esteroideogênico 1.
3. Distúrbios de diferenciação sexual. I. Mello,
Maricilda Palandi de. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: NR5A1 molecular analysis in 46,XY patients with disorders of sex development

Palavras-chave em Inglês:

Gonadal dysgenesis

Steroidogenic factor 1

Sex differentiation disorders

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Maricilda Palandi de Mello [Orientador]

Andréa Maciel Guerra

Edmilson Ricardo Gonçalves

Data da defesa: 22-02-2013

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 22 de fevereiro de 2013.

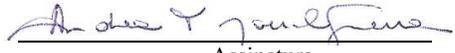
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Andréa Maciel Guerra



Assinatura

Prof. Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves



Assinatura

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

Assinatura

Profa. Dra. Angela Maria Spinola-Castro

Assinatura

“Por mais longa que seja a caminhada, o mais importante é dar o primeiro passo.”

Vinicius de Moraes

**AOS MEUS QUERIDOS PAIS LUIZ ALBERTO
E ELENÍ, E IRMÃ ISABEL,
DEDICO.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por todos os momentos e oportunidades que Ele proporciona em minha vida.

Aos meus queridos pais Luiz Alberto e Eleni, por todo amor, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

A minha querida irmã Isabel, que está sempre ao meu lado com uma palavra acolhedora, obrigada por todo amor e carinho.

Ao meu namorado Enio, obrigada por esses nove anos de muito amor, carinho, amizade, paciência e companheirismo. É maravilhoso ter você em minha vida!

A todos da minha família: avós, primos, primas, tios e tias que sei que sempre torcem por mim, e fazem da nossa família uma família maravilhosa.

A todos os meus queridos amigos e amigas que fazem parte da minha vida há tantos anos. Obrigada pelas risadas, conversas, brincadeiras e momentos maravilhosos que passamos juntos!

Gostaria de agradecer à Professora Maricilda, por ser um exemplo de pessoa para mim. Obrigada professora, por ter me acolhido no laboratório e ter me dado esta oportunidade, obrigada também por toda paciência e carinho que tem comigo! Graças a você estou realizando um sonho, muito obrigada Professora, você é muito querida para mim!

À Professora Dra. Edi Sartorato, muito obrigada por me acolher no laboratório, por estar sempre pronta a ajudar e pelos momentos divertidos que você nos proporciona.

A todos os amigos do laboratório: Mara, Cris, Adriana, Flávia (Flor), Reginaldo, Ana Paula, Débora, Rose, Fer2, Luli, Taciane, Pâmela, Ana Letícia, Zélo, Emerson, Marcel, Larissa, Laura, Isabela, Carol PR, Sueli, Vanessa, Priscila, Fábio, Rogério, Paulo, Nathy,

Lilian, Foka, Aliane, e todos os outros que passaram por lá, muito obrigada pelo companheirismo e bons momentos que passamos!

Em especial gostaria de agradecer à Cris, Mara, Flor, Regi, Dri e Ana Paula pela amizade, carinho, conversas e risadas. Obrigada por toda ajuda que vocês me deram nesse tempo todo, aprendi MUITO com vocês. Sem dúvida, sem vocês estes anos vividos no laboratório não seriam tão agradáveis e divertidos como foram!

Agradeço ao Dr. Gil, Dra Andréa e a todos que participam do grupo GIEDDS, sem vocês não seria possível a realização do nosso trabalho.

À Dra. Andréa, Dra. Mônica e Dr. Edmilson, que aceitaram participar da minha banca e me ajudaram com boas sugestões para a realização deste trabalho.

Aos professores, alunos e funcionários do CBMEG, muito obrigada por toda ajuda nesses anos todos!

Aos pacientes e familiares, muito obrigado por contribuírem para a realização deste trabalho.

À agência financiadora FAPESP.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento da minha tese.

LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUÇÃO	1
2. <i>DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO DO SEXO (DDS)</i>	7
3. <i>O GENE NR5A1 E A PROTEÍNA SF-1</i>	12
4. <i>MUTAÇÕES NO GENE NR5A1</i>	17
OBJETIVOS.....	21
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	25
1. <i>CASUÍSTICA</i>	27
2. <i>MÉTODOS</i>	28
2.1 Obtenção das amostras e extração de DNA genômico	29
2.3 Amplificação do gene <i>NR5A1</i>	30
2.4 Purificação dos produtos da PCR.....	33
2.5 Reação de Sequenciamento.....	33
2.6 Purificação da reação de sequenciamento.....	34
2.7 PCR Alelo-específica	35
2.8 Estudo <i>in silico</i>	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
1. <i>Mutação p.Cis65Tir</i>	44

2.	<i>Mutação p.Arg39Cis</i>	50
3.	<i>Mutação p.Lis38*</i>	56
4.	<i>Mutação p.L80Wfs*8</i>	57
5.	<i>Mutação p.Ser32Asn</i>	58
6.	<i>Mutação p.Cis247*</i>	65
7.	<i>Mutações p.Asp364Trefs*18 e c.-133G>A</i>	66
8.	<i>Mutação c.1138+1G>T</i>	70
9.	<i>Alteração c.-156_-136ins18pb</i>	72
10.	<i>Alterações c.-208C>A e alteração c.-413G>A</i>	75
11.	<i>Alteração c.-762C>T</i>	79
12.	<i>Alteração c.*1286C>T</i>	81
13.	<i>Polimorfismo p.Gli146Ala</i>	84
14.	<i>Polimorfismos encontrados neste trabalho</i>	85
15.	<i>Correlação fenótipo-genótipo</i>	89
CONCLUSÕES		90
REFERÊNCIAS		90
ANEXOS		90

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Micro litro
μM	Micromolar
AF	<i>Activation Function</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>
DDS	Distúrbios da Diferenciação do Sexo
DG	Disgenesia Gonadal
DGM	Disgenesia Gonadal Mista
DGP	Disgenesia Gonadal Pura
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
EDTA	Ácido Etileno Diamono Trifosfatado
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GIEDDS	Grupo Interdisciplinar de Estudos dos Distúrbios da Diferenciação do Sexo
HAM	Hormônio Anti-Mulleriano
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
HCl	Ácido Clorídrico
kb	Kilo Bases
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i>
LH	Hormônio Luteinizante
M	Molar
MgCl₂	Cloreto de Magnésio

mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
NR5A1	<i>Nuclear Receptor Subfamily 5, Group A, Member 1</i>
°C	Graus Celsius
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
pb	Pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial Hidrogênico
pmol	Picomolar
POF	Falência Ovariana Precoce
rpm	Rotações Por Minuto
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SF-1	<i>Steroidogenic Factor – 1</i>
SRY	<i>Sex - determining Region on the Y chromosome</i>
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
TBE	Tris – Borato – EDTA
TE	Tris – EDTA
Tm	Temperatura Média
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidade

RESUMO

O termo Distúrbio da Diferenciação do Sexo (DDS) caracteriza-se pelo desenvolvimento genital ou gonadal incompleto ou desordenado. Os DDS com cariótipo 46,XY são caracterizados por genitália externa ambígua ou feminina, em alguns casos com gônadas disgenéticas, e presença ou ausência de derivados de Müller. Os mais frequentes são a insensibilidade androgênica, deficiência da 5-alfa-redutase tipo 2, disgenesia gonadal e DDS ovário-testicular. Vários são os genes que participam dos processos de determinação e diferenciação do sexo. Alterações no gene *NR5A1*, que codifica o fator de transcrição SF-1, é responsável por diferentes fenótipos de DDS. A proteína SF-1 é expressa principalmente em tecidos esteroidogênicos (gônadas, adrenais e placenta), nas células de Sertoli, nas células de Leydig e nos ovários; é o principal regulador do metabolismo do colesterol nas células esteroidogênicas. Além disso, regula a atividade de outros genes, como os *CYPs*, *HSD3B*, *StAR*, *SOX9*, *DAX1*, entre outros. Na literatura são descritas alterações no gene *NR5A1* associadas a DDS 46,XY, anorquia bilateral, amenorréia primária, falência ovariana precoce, hipospádia, infertilidade masculina, e alguns casos de tumores adrenais e endometrioses. Neste trabalho foi realizada a análise molecular do gene *NR5A1* em 86 pacientes com DDS 46,XY, incluindo-se disgenesia gonadal completa (n = 7), disgenesia gonadal parcial (n = 18), DDS 46,XY idiopático (n = 41) e outros (n = 20). Doze alterações foram identificadas neste trabalho, sendo: sete na região codificante (p.Ser32Asn, p.Arg39Cis, p.Lis38*, p.Cis65Tir, p.L80Wfs*8, p.Cis247*, and p.Asp364Trefs*18), uma em sítio de *splicing* (c.1138+1G>T), duas no exon 1 não-codificante (c.-133G>A e c.-156_-136ins18pb), três na região 5'UTR (c.-413G>A, c.-208C>A, e c.-762C>T) e uma na região 3'UTR (c.*1286C>T). As variações aqui descritas, não foram identificadas em controles saudáveis. As análises *in silico* demonstraram o possível efeito deletério de cada alteração e, suas relações com o fenótipo dos indivíduos. Embora estes resultados demonstrem a importância de cada alteração para o fenótipo, haverá ainda a necessidade de se investigar os efeitos funcionais *in vitro*. As alterações com potencial deletério foram identificadas em maior frequência nos casos dos distúrbios da diferenciação gonadal (20%) e DDS 46,XY idiopático (22%).

ABSTRACT

The term Disorders of Sex Differentiation (DSD) characterize incomplete or disorganized genital or gonadal development. The DSD with 46,XY karyotype may present either ambiguous or female genitalia, and also dysgenetic gonads in some cases, with presence or absence of Müllerian derivatives. The most frequent are androgen insensitivity, 5-alpha-reductase type 2 deficiency, gonadal dysgenesis and ovarian-testicular DSD. There are several genes that participate in both sex determination and differentiation processes. Mutations in *NR5A1* gene, which encoding SF-1, a transcription factor, are responsible for different phenotypes of DSD. The protein SF-1, which is expressed mainly in steroidogenic tissues (gonads, adrenal glands and placenta), is also expressed in Sertoli and Leydig cells, in the ovaries, and is the major regulator of cholesterol metabolism in steroidogenic cells. Moreover, it regulates the activity of other genes, such as CYPs, HSD3B, StAR, SOX9, DAX1, among others. The literature describes the association of changes in *NR5A1* gene with 46,XY DSD, bilateral anorchia, primary amenorrhea, premature ovarian failure, hypospadias, male infertility, and some cases of adrenal tumors and endometriosis. The present work involved the molecular analysis of *NR5A1* gene in 86 patients with 46, XY DSD including complete gonadal dysgenesis (n = 7), partial gonadal dysgenesis (n = 18), idiopathic 46,XY DSD (n = 41) and others (n = 20). Twelve variations had been identified: seven in the coding region (p.Ser32Asn, p.Arg39Cis, p.Lis38*, p.Cis65Tir, p.L80Wfs*8, p.Cis247*, and p.Asp364Trefs*18), one at a splice site (c.1138+1 G>T), two in the noncoding exon 1 (c.-133G>A and c.-156_-136ins18pb), three in the 5'UTR region (c.-413G>A, c.-208C>A and c.-762C>T) and one in the 3'UTR (c.*1286C>T). The variations herein described, have not been identified in healthy controls. In silico analysis showed possible deleterious effects for each change and its correlations to individual phenotypes. Although those results demonstrate the importance of each change for the phenotype, their *in vitro* functional effects must be investigated. The potentially deleterious changes were identified more frequently in cases of disorders of gonadal development (20%) and idiopathic 46,XY DSD (22%).

INTRODUÇÃO

1. DESENVOLVIMENTO SEXUAL NORMAL

O desenvolvimento sexual em humanos é um processo que pode ser dividido em três etapas: na primeira ocorre a determinação do sexo cromossômico que é estabelecido no momento da fecundação, levando à formação de um indivíduo do sexo feminino (XX) ou masculino (XY); a segunda é a diferenciação das gônadas bipotentes em ovários ou testículos e a diferenciação da genitália externa e interna a partir de estruturas indiferenciadas presentes no embrião; a última é a diferenciação sexual secundária, que ocorre em resposta aos hormônios produzidos pelas gônadas e que irá completar o fenótipo sexual do indivíduo na puberdade (Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010; de Mello *et al.*, 2011; Goodfellow & Darling, 1988).

Durante a quinta e sexta semana de gestação, as gônadas bipotentes são formadas. Os primórdios da genitália interna masculina são representados pelos ductos de Wolff e os do trato genital feminino pelos ductos de Müller. Os rudimentos da genitália externa compreendem um tubérculo genital, seguido de saliências labioescrotais e pregas urogenitais. Este estado, do ponto de vista embriológico, é chamado de “estado sexualmente neutro ou indiferenciado”, e a subsequente diferenciação para o sexo feminino ou masculino irá depender do sexo cromossômico do embrião (Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010) (FIGURA 1).

No final dos anos 1950 tornou-se conhecida a importância do cromossomo Y na determinação sexual masculina, porém apenas em 1990 foi descrito o gene especificamente envolvido na determinação do sexo masculino e desencadeamento do processo de diferenciação testicular (Berta *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990). Este gene se localiza na região do braço curto do cromossomo Y (região 1A1) e foi denominado *SRY* (*Sex - determining Region on the Y chromosome*) (Damiani *et al.*, 2000). Nessa época, com tal descoberta ficou estabelecido que na presença do gene *SRY* normal e ativo as gônadas bipotentes se diferenciam em testículos, enquanto que na ausência de *SRY* formam ovários.

O processo de diferenciação sexual masculino ocorre a partir da sexta semana de gestação, no qual as células epiteliais se diferenciam em células de Sertoli e as células

germinativas se diferenciam em espermatogônias. Posteriormente, na oitava semana, as células de Leydig se formam a partir do mesênquima (Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010). As células de Sertoli produzem o hormônio anti-mülleriano (HAM) que é responsável pela regressão dos ductos de Müller; já as células de Leydig produzem testosterona a partir do colesterol, este hormônio é responsável pela diferenciação dos ductos de Wolff. Para a diferenciação da genitália externa masculina, a testosterona é convertida em diidrotestosterona pela enzima 5-alfa-redutase tipo 2, hormônio fundamental no processo de virilização (Flück *et al.*, 2011). Além deles, outros hormônios estão envolvidos nessas etapas, como a gonadotrofina coriônica humana (hCG), que estimula as células de Leydig a secretar testosterona, e o hormônio luteinizante (LH), importante para a descida testicular e crescimento peniano (Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010).

A diferenciação sexual feminina depende basicamente da ausência do cromossomo Y e, conseqüentemente, do gene *SRY*. No entanto, hoje já se sabe que há necessidade da atividade de outros genes para que ocorra a diferenciação das gônadas em ovários a partir da décima semana de gestação, com a produção do hormônio folículo estimulante (FSH) e a formação de folículos primários (de Mello *et al.*, 2005). Como não há produção de HAM, os ductos de Müller se desenvolvem nos genitais internos femininos, e sem o estímulo de andrógenos, os ductos de Wolff se fragmentam. Para a manutenção ovariana é fundamental ainda a presença de dois cromossomos X íntegros (Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010).

que interage com o *WT1* e ativa o *SRY*; o *DAX1* (ou *NROB1* - *Nuclear Receptor subfamily 0, group B, member 1*), localizado em Xp21.3, que é um receptor nuclear altamente expresso no desenvolvimento sexual feminino cuja duplicação inibe *SRY*; o *WNT4* (*Wingless-Type MMTV integration site family, member 4*), mapeado em 1p36.1, que codifica um membro da família de fatores de crescimento envolvidos na sinalização intracelular e participa diretamente da formação das gônadas e dos ductos de Müller; além de muitos outros (Ozisk *et al.*, 2003; de Mello *et al.*, 2005; Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010) (FIGURA 2).

Os hormônios esteróides são produzidos pelas glândulas adrenais e pelas gônadas. Os esteróides desempenham um papel vital na reprodução, especialmente na diferenciação do sexo masculino durante o desenvolvimento fetal e na diferenciação sexual secundária masculina e feminina (Hughes, 2001). Sendo assim, alterações em algum desses genes da cascata de diferenciação gonadal ou da produção de esteróides, podem acarretar em distúrbios na diferenciação sexual e/ou problemas adrenais.

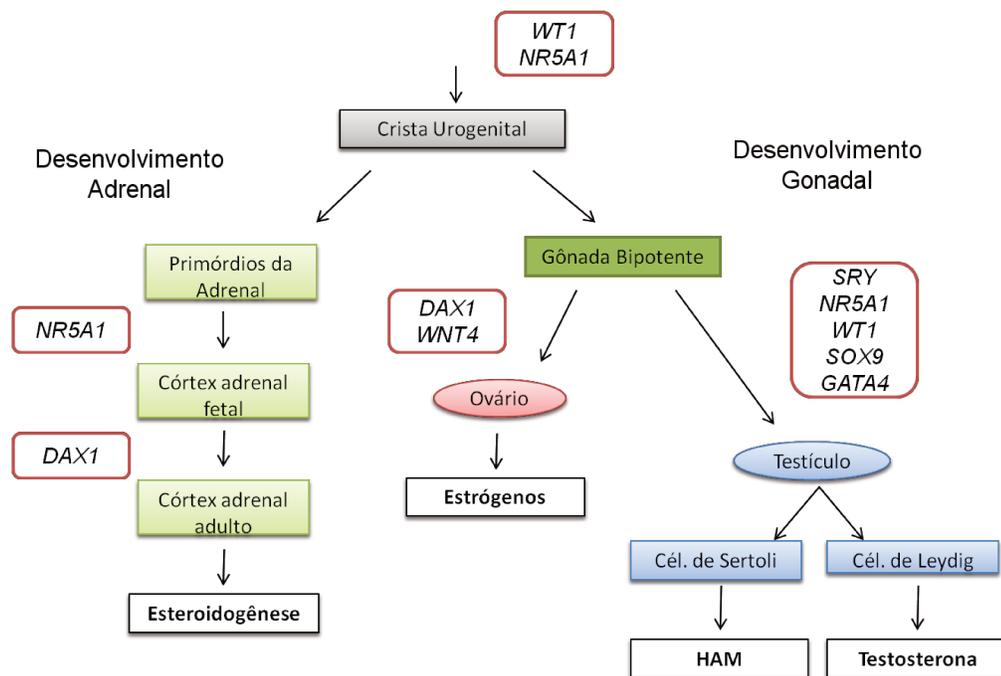


FIGURA 2: Alguns dos genes envolvidos na cascata de determinação e diferenciação gonadal, e no processo de desenvolvimento adrenal, ambos a partir da crista urogenital (Adaptado de Ozisik *et al.*, 2003).

2. DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO DO SEXO (DDS)

O termo DDS caracteriza o desenvolvimento genital ou gonadal incompleto ou desordenado, levando a uma discordância entre o sexo genético, gonadal e fenotípico do indivíduo afetado (Hughes *et al.*, 2006; Nabhan & Lee, 2007).

Esses distúrbios podem ser classificados em alguns grupos, mas para que isso seja feito, alguns conceitos básicos devem ser esclarecidos, como por exemplo (Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010):

- Gônada disgenética ou em fita: constituída por tecido fibroso, sem função hormonal e sem capacidade de produzir gametas (FIGURA 3A);
- Testículo disgenético: apresenta anomalias na diferenciação dos ductos de Wolff, na virilização da genitália externa e na regressão dos ductos de Müller, além de baixa produção de andrógenos (FIGURA 3B);
- DDS ovário-testicular: coexistência de tecido ovariano e testicular no mesmo indivíduo (FIGURA 3C).

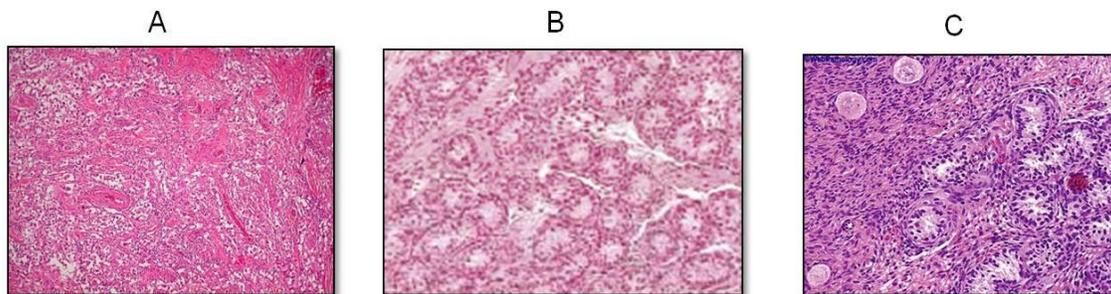


FIGURA 3: A) Corte histológico referente a uma gônada disgenética (Retirado de http://www.fcm.unicamp.br/deptos/anatomia/casostgf/casos.php?subaction=showfull&id=1260557995&archive=&start_from=&ucat=&-). B) Corte histológico referente a um testículo disgenético (Retirado de Scolfaro *et al.*, 2001). C) Corte histológico mostrando a coexistência de tecido ovariano e testicular em uma mesma gônada (DDS ovário-testicular) (Retirado de www.webpathology.com).

Desta maneira, a partir do Consenso Chicago, os DDS podem ser classificados em quatro grupos (Lee *et al.*, 2006):

- DDS associados a anormalidades cromossômicas: grupo que inclui os cariótipos 45,X (Síndrome de Turner e suas variantes), 47,XXY (Síndrome de Klinefelter e variantes), 45,X/46,XY (disgenesia gonadal mista e DDS ovário-testicular) e 46,XX/46,XY (quimera e DDS ovário-testicular);
- DDS 46,XY: inclui os distúrbios da diferenciação gonadal (disgenesia gonadal completa e parcial, regressão testicular e DDS ovário-testicular) e distúrbios na ação ou produção de andrógenos (defeitos na produção de testosterona, insensibilidade androgênica, deficiência da 5-alfa-redutase tipo 2 e síndrome da persistência dos ductos müllerianos);
- DDS 46,XX: inclui os distúrbios do desenvolvimento gonadal (disgenesia gonadal completa e DDS ovário-testicular) e os induzidos por excesso de andrógenos (hiperplasia adrenal congênita, deficiência da aromatase, luteoma, etc);
- Outros: casos de micropênis, hipospádia, ausência congênita de útero e vagina, e outras síndromes.

A casuística deste trabalho é composta por pacientes com DDS 46,XY, por essa razão um enfoque maior será dado a este grupo.

Uma característica comum em grande parte dos pacientes com DDS é a presença de uma genitália ambígua, sendo que muitas vezes, este é o primeiro indício da doença diagnosticada logo ao nascimento. É muito importante a investigação da origem da ambiguidade genital antes da definição do sexo de criação; caso contrário, pode haver grandes problemas psicossociais para a criança e para seus familiares (Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010). *Danish* em 1982 (citado em Damiani *et al.*, 2001) propôs que seja considerada ambiguidade genital se qualquer uma das características listadas abaixo estiver presente:

Em genitália de aspecto aparente masculino:

- Gônadas não palpáveis;
- Tamanho peniano esticado abaixo do normal;
- Gônadas pequenas;
- Presença de massa inguinal (pode corresponder a útero e trompas rudimentares);
- Hipospadia.

Em genitália de aspecto aparente feminino:

- Diâmetro clitoriano superior a 6 mm;
- Gônadas palpáveis em saliência lábio escrotal;
- Fusão labial posterior;
- Massa inguinal que possa corresponder a testículos.

Para melhor descrever a aparência da genitália externa ambígua, a classificação de Prader é a mais utilizada. Em 1954 este classificou as genitálias externas de pacientes 46,XX com hiperplasia congênita adrenal de acordo com o grau de virilização que essas meninas apresentavam, desde o mais leve (Prader I) até o mais virilizado (Prader V) (FIGURA 4). A classificação ficou da seguinte forma (Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010):

Prader I – genitália de aspecto feminino, com leve aumento do falo;

Prader II – maior aumento do falo, associado à fusão posterior das saliências labioescrotais, sem seio urogenital;

Prader III – importante aumento do falo, associado à fusão quase completa das saliências labioescrotais, e presença de seio urogenital com abertura perineal;

Prader IV – falo de aspecto peniano, associado à fusão completa das saliências labioescrotais, e presença de seio urogenital com abertura uretral na base do falo;

Prader V – falo de aspecto peniano bem desenvolvido, associado à fusão completa das saliências labioescrotais, e abertura da uretra na extremidade da glândula.

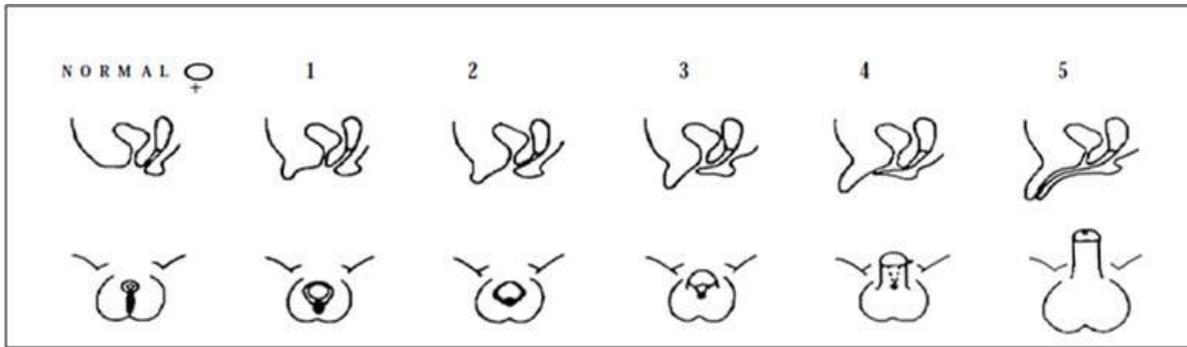


FIGURA 4: Classificação de *Prader* para os graus de ambiguidade genital a partir de uma genitália feminina normal, indo do mais leve (grau 1) até o mais ambíguo (grau 5) (Retirado de Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010).

Entre os DDS 46,XY, a disgenesia gonadal refere-se a um conjunto de anormalidades em indivíduos que apresentam gônadas disgenéticas por falhas em genes envolvidos no processo de desenvolvimento gonadal (Sohval, 1963). Ela pode se apresentar de várias maneiras: pura (completa), parcial (incompleta), mista, associada à doença renal e associada à displasia camptomélica (Lipay *et al.*, 2005). Os pacientes triados neste estudo se enquadram apenas nos casos de disgenesia gonadal pura e parcial.

A disgenesia gonadal pura (DGP) é caracterizada por indivíduos fenotipicamente femininos, sem ambiguidade genital, com presença de estruturas müllerianas, gônadas disgenéticas, e cariótipos normais 46,XX ou 46,XY. A DGP 46,XX é uma condição autossômica recessiva, em geral diagnosticada por amenorréia primária e atraso no desenvolvimento de caracteres sexuais secundários na presença de genitais internos e externos femininos e hipogonadismo hipergonadotrófico (Nishi *et al.*, 1988; Lipay *et al.*, 2005). Por sua vez, a DGP 46,XY, também conhecida como Síndrome de Swyer, se caracteriza por genitais internos e externos femininos, gônadas em fita (*streak*), e risco elevado para o desenvolvimento de tumores gonadais devido à presença do cromossomo Y (Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010; Gourlay *et al.*, 1994). Geralmente é diagnosticada na puberdade, também em casos de amenorréia primária, e hipogonadismo hipergonadotrófico (Lipay *et al.*, 2005). A DGP 46,XY pode resultar de deleções ou mutações no gene *SRY*, de uma duplicação da região DDS (*dosage sensitive sex reversal*)

localizada no braço curto do cromossomo X ou ser devido a mutações em genes autossômicos (Mendonça *et al.*, 2009). As alterações no gene *SRY* podem representar até 70% dos casos (Rocha *et al.*, 2011) e são predominantemente mutações *de novo*; geralmente são encontradas dentro do domínio HGM (high-mobility group), reduzindo a capacidade de ligação da proteína *SRY* ao DNA (Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010; Mendonça *et al.*, 2009), e resultando no fenótipo feminino em 10 a 15% dos casos (Paliwal *et al.*, 2011).

A disgenesia gonadal mista (DGM) ou assimétrica, foi descrita por Sohval em 1963, é a única forma que apresenta um cariótipo em mosaico, com linhagens 45,X/46,XY (Sohval, 1963). Devido ao mosaicismo, os portadores dessa doença representam um quadro fenotípico bastante variado, indo desde uma genitália externa feminina à masculina normal, passando por vários graus de ambiguidade genital. Devido à linhagem 45,X os indivíduos apresentam sinais de Síndrome de Turner. Além disso, é comum a persistência de derivados müllerianos, um testículo disgenético de um lado e uma gônada disgenética ou ausente de outro lado, com alto risco de malignização tumoral (Lipay *et al.*, 2005; Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010; Alvarez-Nava *et al.*, 1999). A DGM é bastante rara, podendo ser diagnosticada ao nascimento por ambiguidade genital, ou na puberdade por falta de desenvolvimento de caracteres sexuais secundários (Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010; Lipay *et al.*, 2005).

A disgenesia gonadal parcial ou incompleta é caracterizada pelo cariótipo 46,XY sem mosaicismo, diferenciação testicular parcial, com prejuízo na produção de testosterona durante a embriogênese, levando à presença de derivados de Müller e à ambiguidade genital. Ao contrário da DGM, os pacientes não apresentam sinais de Síndrome de Turner. A histologia gonadal é variável, e dependendo do grau de disgenesia, existe maior ou menor grau de virilização da genitália interna e externa. Assim como na DGP 46,XY há risco de malignização gonadal (Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010; Lipay *et al.*, 2005). A etiologia na maioria dos casos ainda é indefinida, sendo muito difícil encontrar mutações no gene *SRY* associado a esse quadro; com os recentes estudos envolvendo os genes da cascata de determinação e diferenciação sexual, descobriram-se novas mutações no gene *NR5A1* relacionadas com esta forma de disgenesia (Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010).

3. O GENE NR5A1 E A PROTEÍNA SF-1

Entre os genes estudados no desenvolvimento gonadal e nos casos de DDS, o gene *NR5A1* (*Nuclear Receptor Subfamily 5, Group A, Member 1*), que codifica a proteína SF-1 (*Steroidogenic Factor – 1*), apresenta um papel fundamental.

O gene *NR5A1*, mapeado em 9q33 (OMIM +184757), tem tamanho de 30 kb e possui 7 exons, sendo que o exon 1 é transcrito, mas não é traduzido. Até o momento, já foram identificados entre humanos, ratos e camundongos, cinco diferentes exons 1 (Ia, Io, Ig, Ix e II), que variam de acordo com cada transcrito, em espécies e tecidos específicos; segundo Kimura *et al.* (2000), provavelmente nem todos esses exons são expressos em humanos, sendo que o Ia é o que possui maior homologia entre as espécies, e é expresso em ratos e camundongos nos tecidos esteroideogênicos, no fígado, no hipotálamo e pituitária. Além disso, este grupo de pesquisadores acredita que possa haver diferentes promotores para cada um dos exons 1, e que esse múltiplos exons podem fazer *splicing* alternativos, controlando não só a transcrição do gene *NR5A1*, mas também explicando a capacidade que o gene tem de se expressar em diferentes tecidos (Kimura *et al.*, 2000).

O gene *NR5A1* codifica a proteína SF-1 que é formada por 461 aminoácidos e faz parte da família de receptores nucleares órfãos (Oba *et al.*, 1996) (FIGURA 5).

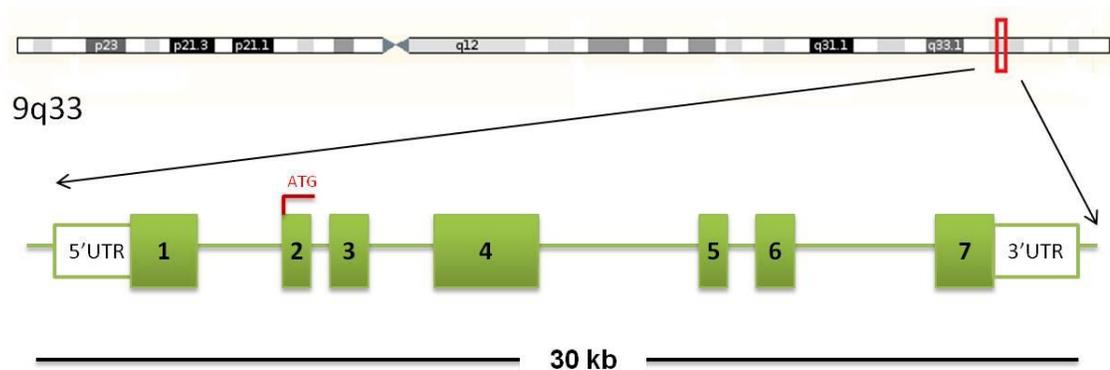


FIGURA 5: Esquema representando a estrutura do gene *NR5A1*. Localizado no cromossomo 9, é formado por 7 exons e possui 30 kb. O primeiro ATG está no início de exon 2, e por esta razão o exon 1 é apenas transcrito, mas não traduzido.

Estudos mostraram que o gene *NR5A1* é extremamente conservado entre as espécies, e a similaridade global dos aminoácidos, entre camundongos e humanos, é de 95% (Ohno & Petkovich, 1993). Em camundongos este gene é expresso muito cedo no sulco urogenital e atua posteriormente no desenvolvimento das adrenais, das gônadas, da hipófise e do hipotálamo ventromediano (Hanley *et al.*, 1999). Deleções do *NR5A1* nesses animais causam completa agenesia adrenal e gonadal, defeitos na virilização e retenção dos dutos Müllerianos em animais XY, e anormalidades no hipotálamo ventromediano (Luo *et al.*, 1994; Sadovsky *et al.*, 1995).

O gene *NR5A1* é transcrito no cromossomo 9, no sentido do centrômero para o telômero (Schimmer & White, 2010). Seu promotor está dentro de 589 pb, se localiza na região 5'UTR e contém alguns sítios conservados para ligação de proteínas (Tremblay & Viger, 2001). Os primeiros 110 pb da região 5'UTR não contém um TATA *box*, mas possui um número pequeno de elementos regulatórios, incluindo um sítio de ligação para *SRY*, o que contribui para a expressão do SF-1 nas células de Sertoli; além de uma região E-*box*, CCAAT *box*, e sítios para Sp1/Sp3, que estão depois do início da transcrição, mas contribuem para otimizar a atividade do promotor (Schimmer & White, 2010; Hoivik *et al.*, 2010) (FIGURA 6).

Outros fatores de transcrição também influenciam na regulação do *NR5A1*, como o *GATA4*, *WT1*, *Lhx9*, *SOX15*, *SOX30*, *TEAD4* e *CBX2* (Schimmer & White, 2010).

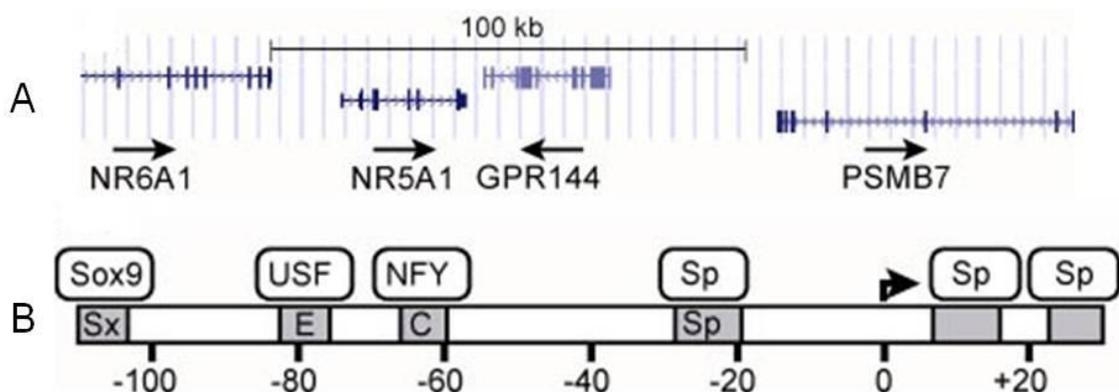


FIGURA 6: A) Região no cromossomo 9 ao redor do gene *NR5A1*, a seta indica o sentido da transcrição e as barras verticais representam os exons. B) Região promotora do gene *NR5A1*, a escala está representada em pares de bases, sendo o início da transcrição no ponto 0 (representado pela seta); as caixas cinzas representam regiões conservadas para ligação de proteínas (caixas ovais), sendo Sx um sítio de ligação para SOX9, E *box* sítio para USF1 e USF2, CCAAT *box* sítio para a isoforma do fator nuclear Y (NFY) e Sp sítio de ligação para os fatores de transcrição Sp1 e Sp3 (Retirado de Schimmer & White, 2010).

A proteína SF-1 foi isolada pela primeira vez no início da década de 1990 durante duas pesquisas independentes de Keith L. Parker e Ken-ichirou Morohashi, que procuravam por regiões promotoras do citocromo P450 da enzima 21-hidroxilase (Rice *et al.*, 1991; Lala *et al.*, 1992; Morohashi *et al.*, 1992). Sua estrutura segue os domínios típicos de um fator nuclear, formada por:

- Um domínio de ligação ao DNA (DBD), contendo dois dedos de zinco;
- Um domínio de ligação ao ligante (LBD);
- Dois domínios de ativação funcional (AF-1 e AF-2);
- Uma região acessória (FTZ-F1);

- Uma região de dobradiça (*hinge*).

Ao contrário da maioria dos receptores nucleares, a proteína SF-1 se liga ao DNA como um monômero, com alta afinidade para a região 5'YCAAGGYCR'3 (sendo Y = T/C; R = G/A) (Ueda & Hirose, 1991). A região DBD é estendida por uma região acessória (FTZ-F1 *box*), que além de ser importante para a ancoragem do DNA possui uma região A *box*, que juntamente com a região P *box*, presente no primeiro dedo de zinco, define esta especificidade de se ligar ao DNA como um monômero, além de estabilizar essa interação proteína-DNA. Como na maioria dos receptores nucleares a região AF-2 se localiza na porção C-terminal da LBD, sendo fundamental para a atividade transcricional e para interação com cofatores; já a AF-1 não segue os padrões dos outros receptores nucleares, e ao invés de se localizar na porção N-terminal, se encontra na região de dobradiça (Hammer *et al.*, 1999). A região de dobradiça é importante para a capacidade transcricional do SF-1, pois contém um sítio de fosforilação e dois de sumoilação (Little *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 1993; Hoivik *et al.*, 2010) (FIGURA 7).

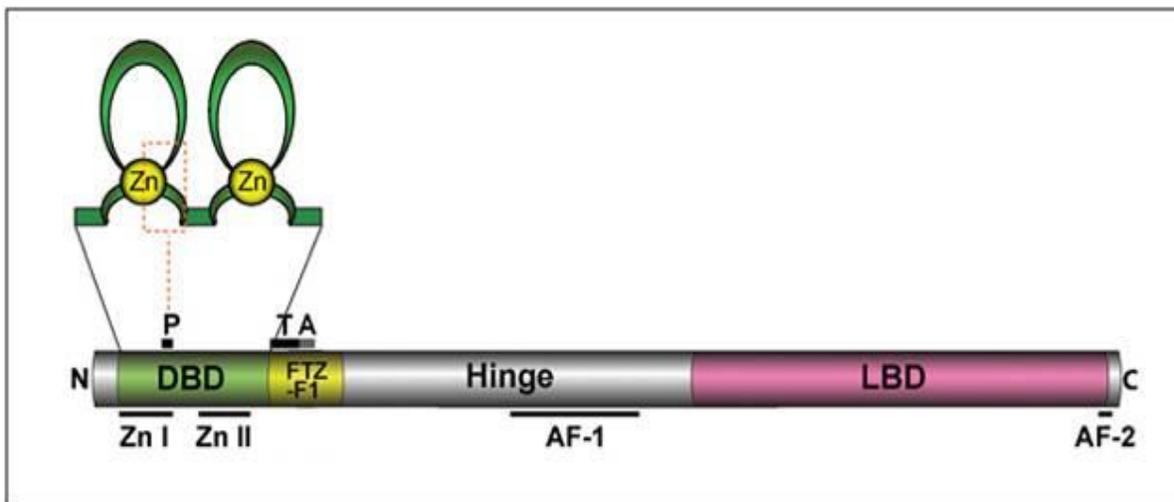


FIGURA 7: Esquema da estrutura da proteína SF-1, contendo um domínio de ligação ao DNA (DBD), um domínio de ligação ao ligante (LBD), dois domínios de ativação funcional (AF-1 e AF-2), uma região acessória (FTZ-F1) e uma região de dobradiça (*hinge*) (Adaptado de Hoivik *et al.*, 2010).

A proteína SF-1 é expressa principalmente nos tecidos esteroidogênicos (gônadas, adrenais e placenta), regulando quase todas as enzimas relacionadas a este processo (Parker *et al.*, 2002). Ela é essencial no desenvolvimento adrenal e gonadal, diferenciação e determinação do sexo, e também exerce papéis fisiológicos importantes no eixo hipotálamo ventromedial (Hoivik *et al.*, 2010; Hanley *et al.*, 1999). Recentemente, Buaas *et al.* (2012), através da análise de animais mutantes, forneceram a primeira evidência genética e molecular *in vivo* de que a proteína SF-1 é necessária para a regulação dos genes esteroidogênicos nas células de Leydig no período fetal e adulto, nas células da teca e estroma, e nas células adrenocorticais do feto; sendo que todos os genes associados a produção dos hormônios esteróides a partir do colesterol, demonstraram uma expressão reduzida nos tecidos do animal mutante estudado. Além disso, o grupo demonstrou que a perda do SF-1 levou a interrupção da atividade de transcrição e a degradação de outros transcritos e outras proteínas ao longo do tempo; mostrando ainda, que a proteína SF-1 não regula apenas a expressão dos genes envolvidos na síntese dos esteróides, mas também controla a morfologia, sinalização e expressão de células não esteroidogênicas (Buaas *et al.*, 2012).

Durante o desenvolvimento embrionário, SF-1 aparece primeiramente na crista urogenital, representando o primeiro passo da diferenciação adrenal e gonadal (Hanley *et al.*, 1999; Ikeda *et al.*, 1994). Apesar de ser expresso também nos ovários, SF-1 tem um papel mais evidente no desenvolvimento sexual masculino. A proteína é expressa nas células de Sertoli, e juntamente com o SOX9 e o GATA4, regula a expressão do HAM, levando a regressão dos ductos de Müller; também é expressa nas células de Leydig, ativando a expressão do sistema enzimático esteroidogênico, resultando na virilização da genitália externa (Lin & Archemann, 2008; Schlaubitz *et al.*, 2007; Zimmermann *et al.*, 1998); por fim, também está envolvida no desenvolvimento masculino tardio, pois estimula o gene *INSL3* a promover a descida testicular (Zimmermann *et al.*, 1998).

O SF-1 é o principal regulador do metabolismo do colesterol nas células esteroidogênicas, uma vez que estimula a expressão de quase todos os fatores envolvidos na mobilização do colesterol e na biossíntese de hormônios esteróides (Parker & Schimmer, 1997).

A proteína SF-1 também é expressa nas células gonadotróficas, afetando diretamente o eixo reprodutivo através da estimulação da transcrição de genes que produzem os hormônios GnRH, α GSU, LH e FSH (Hoivik *et al.*, 2010).

Além disso, SF-1 regula a atividade de outros diversos genes, como por exemplo, *CYPs*, *HSD3B*, *StAR*, *SOX9*, *DAX1*, entre outros (Hoivik *et al.*, 2010).

4. MUTAÇÕES NO GENE NR5A1

A primeira mutação descrita em seres humanos foi a alteração p.Gli35Glu, relatada em uma mulher 46,XY com insuficiência adrenal primária, disgenesia gonadal severa e persistência dos dutos Müllermanos. Demonstrou-se como uma mutação *de novo* em heterozigose, levando à troca de um aminoácido na região *P box* do primeiro dedo de zinco da região de ligação ao DNA, o que afetou severamente a função do SF-1 (Achermann *et al.*, 1999; Achermann *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2000). Posteriormente, foi descrita a mutação p.Arg92Gln em homozigose em uma criança com fenótipo similar ao da primeira paciente, afetando a região *A box* do SF-1 e causando uma perda parcial de sua função (Achermann *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2000). Esta mutação foi herdada e os heterozigotos não apresentavam sinais típicos de afetados.

Devido às primeiras mutações terem sido encontradas em pacientes com fenótipos similares e sabendo do papel do *NR5A1* no desenvolvimento adrenal, por muito tempo acreditou-se que mutações neste gene estariam relacionadas sempre à insuficiência adrenal, porém hoje registram-se mais mutações identificadas no gene *NR5A1* em pacientes 46,XY com DDS sem insuficiência adrenal, do que em pacientes 46,XY com DDS e insuficiência adrenal (Tajima *et al.*, 2009).

Atualmente vários estudos mostraram as inúmeras manifestações que alterações no *NR5A1* podem causar. Alguns trabalhos exemplificam esse fato, como por exemplo:

- Calvo *et al.*, em 2001, relataram a mutação p.Arg365Pro no exon 6 em uma mulher com ovário policístico, e apesar de ainda não estar muito claro o papel desta mutação, esta alteração não foi encontrada em nenhum controle avaliado;
- Figueiredo *et al.*, em 2005, relacionaram o caso de crianças com tumores adrenais com duplicações na região 9q33 onde o gene *NR5A1* se localiza;
- Xue *et al.*, em 2007, demonstraram em seu trabalho a alta expressão de SF-1 em células do endométrio em casos de endometriose;
- Philibert *et al.*, em 2007, relataram a mutação p.Val355Met em um menino com micropênis e síndrome da regressão testicular, esta alteração levou à redução de 50% na atividade de transcrional da proteína;
- Lin *et al.*, em 2007, relataram a mutação p.Leu437Gln em um menino com micropênis, hipospádia e *chordee*;
- Lourenço *et al.*, em 2009, relataram 4 famílias que apresentavam mutação no gene *NR5A1*. Na primeira família de origem europeia, foi identificada a mutação c.666delC no caso índice de um indivíduo 46,XY com disgenesia gonadal completa e em sua mãe 46,XX com falência ovariana precoce (POF). O segundo caso, foi de uma família brasileira que apresentava a mutação p.Asp293Asn, na qual o caso índice era uma menina de 18 anos portadora da mutação em homozigose, diagnosticada com DDS 46,XY, pois apresentava amenorreia primária e sinais de virilização, sendo considerada como disgenesia gonadal parcial; sua irmã também era portadora da mutação em homozigose, porém foi diagnosticada com disgenesia gonadal pura 46,XX por amenorréia primária; dos outros oito irmãos estudados, quatro apresentaram a mutação em heterozigose, mas com desenvolvimento normal; posteriormente outra parente com disgenesia gonadal completa 46,XY foi identificada com a homozigose da mesma mutação (Soardi *et al.*, 2010). A terceira família de origem francesa, apresentava a mutação p.Met1Ile em duas irmãs, uma com disgenesia gonadal parcial 46,XY e a outra com POF 46,XX. Por último, outra família francesa, apresentou a mutação c.390delG em um caso de um menino com DDS 46,XY e em sua mãe com POF 46,XX;

- Philibert *et al.*, em 2010, relataram 5 novas mutações, sendo 3 trocas nucleotídicas (p.Met1Val, p.Arg39Pro e p.Asp380Tyr), 1 deleção (p.Glu51Argfs*23) e uma inserção (p.Pro124Profs*24), em meninas 46,XY com amenorréia primária e concentração baixa de testosterona;
- Bashamboo *et al.*, em 2010, identificaram 7 mutações em heterozigose (p.Gli123Ala, p.Pro129Leu, p.Pro131Leu, p.Arg191Cis, p.Gli212Ser e p.Asp238Asn) em 7 de 315 homens triados com infertilidade;
- Camats *et al.*, em 2012, encontraram em um grupo de 102 pacientes com quadro de DDS e falência ovariana precoce, 10 novas mutações (p.Val20Leu, p.His24Tir, p.His24TrefsX*51, p.Pro130Argfs*165, p.Cis30Trp, p.Gli90Arg, p.Gln206Trefs*20, p.Leu231_Leu233dup, p.Pro235Leu, p.Trp302*), eles realizaram as análises funcionais para essas mutações, resultando em redução na atividade da proteína;
- A substituição p.Gli146Ala, foi descrita por WuQiang *et al.*, em 2003 em casos de micropênis e criptorquidia; esta alteração prejudica a capacidade de transativação da proteína, podendo também estar relacionado com uma maior susceptibilidade a doenças adrenais. Atualmente, esta alteração encontra-se registrada como polimorfismo (rs1110061) por ser freqüente e nem sempre estar associada a alguma característica fenotípica de DDS 46,XY.

A FIGURA 8 mostra a localização das várias mutações na proteína SF-1.

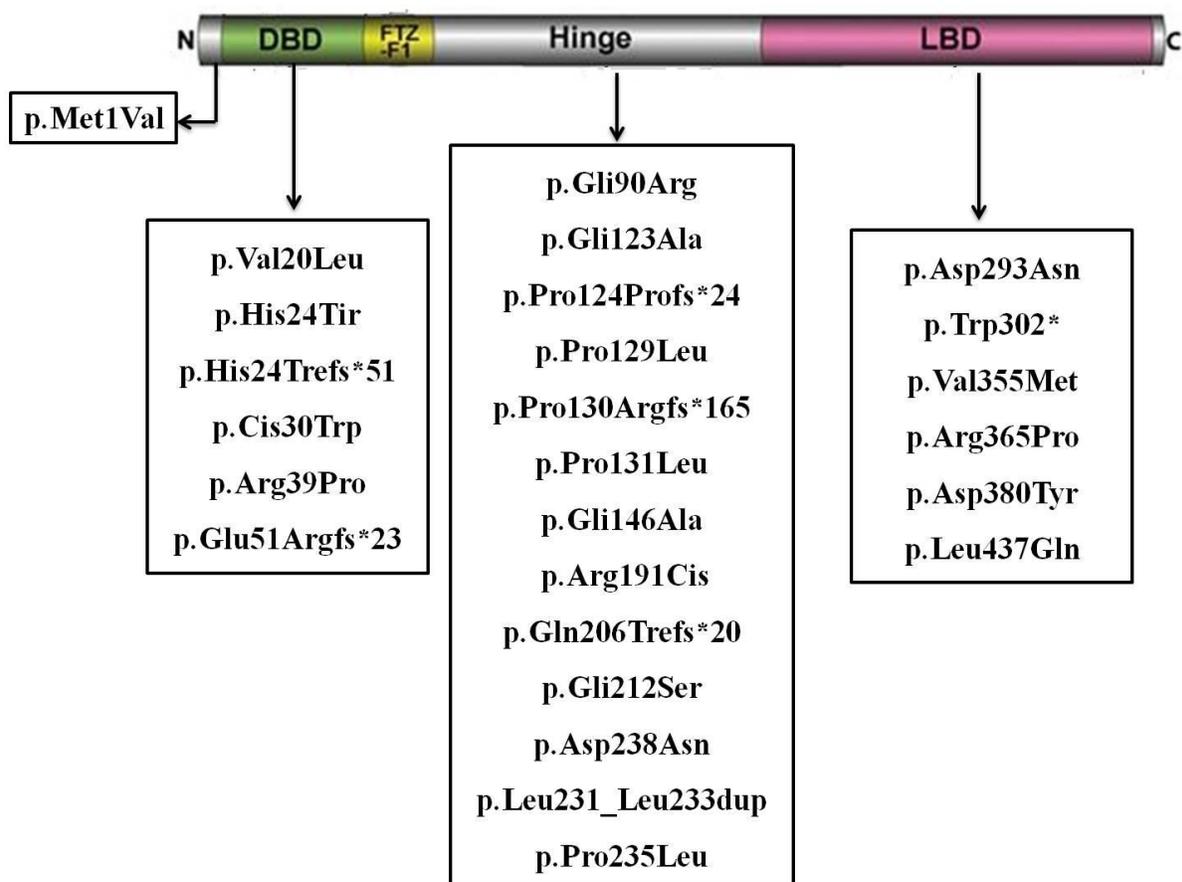


FIGURA 8: Esquema da estrutura da proteína SF-1 mostrando cada local onde se encontram algumas das mutações já descritas, na qual: DBD representa o domínio de ligação ao DNA, LBD representa o domínio de ligação ao ligante, FTZ-F1 representa a região acessória e *Hinge* representa a região de dobradiça (Adaptado de Hoivik *et al.*, 2010).

Desde a primeira mutação descrita em 1999, atualmente mais de 50 já foram identificadas, a maioria em heterozigose, algumas em heterozigotos compostos e poucas em homozigose (Camats *et al.*, 2012), indicando predominância de herança dominante com diferentes graus de penetrância (de Mello *et al.*, 2011).

Considerando os inúmeros fenótipos que mutações em um mesmo gene podem causar, ainda se torna difícil estabelecer uma correlação fenótipo-genótipo para as mutações encontradas no gene *NR5A1*. Por esta razão maiores estudos para o esclarecimento do papel dessas mutações em indivíduos com DDS, são fundamentais.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Identificar alterações moleculares no gene *NR5A1* em indivíduos com DDS 46,XY.

Objetivos específicos:

1. Identificar alterações moleculares no gene *NR5A1* em indivíduos com distúrbios na diferenciação gonadal;
2. Identificar alterações moleculares no gene *NR5A1* em indivíduos ambiguidade genital associada a presença de testículos, produção normal de testosterona e ausência de mutações nos genes do receptor de andrógeno e da enzima 5 α -redutase tipo 2.
3. Estimar a frequência de mutações no gene *NR5A1* nos casos de DDS 46,XY, estabelecendo uma correlação genótipo-fenótipo.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

A casuística deste trabalho foi composta por 86 pacientes encaminhados com Distúrbios da Diferenciação do Sexo para a análise molecular. Sendo que deles, 25 apresentavam anomalias do desenvolvimento gonadal (18 DG Parcial 46,XY, 7 DG Pura 46,XY), 41 foram encaminhados originalmente por ambiguidade genital com produção normal de testosterona, para o estudo dos genes do receptor de andrógenos e *SRD5A2*, que se mostraram normal, sendo portanto considerados casos idiopáticos; além de outros 20 casos estudados por outros motivos, como DG Mista, Síndrome de Turner (com mosaicismo), DDS-OT e disfunção hormonal, (FIGURA 9).

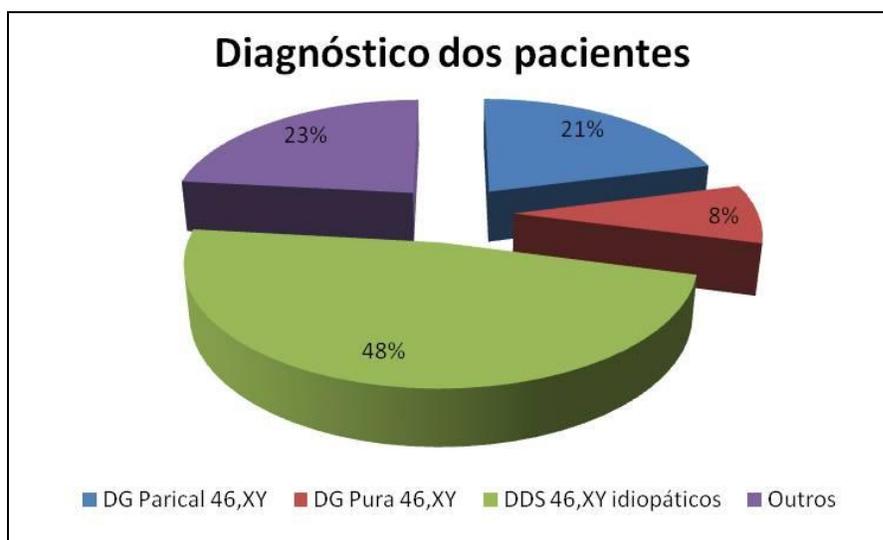


FIGURA 9: Gráfico mostrando a porcentagem de cada diagnóstico apresentado entre os 86 pacientes estudados.

Esses pacientes foram provenientes dos seguintes grupos:

- Grupo Interdisciplinar de Estudos dos Distúrbios da Diferenciação do Sexo (GIEDDS), que funciona no Hospital de Clínicas (HC) – UNICAMP;
- Serviço de Endocrinologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP);
- Serviço de Genética Clínica - Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes - Universidade Federal de Alagoas;

- Além de alguns casos esporádicos encaminhados de Buenos Aires e da Índia.

O estudo foi retrospectivo e prospectivo, com reavaliação de indivíduos que foram atendidos anteriormente ou que ainda estavam em atendimento.

2. MÉTODOS

A FIGURA 10 representa de uma forma geral as etapas utilizadas para a realização deste trabalho.

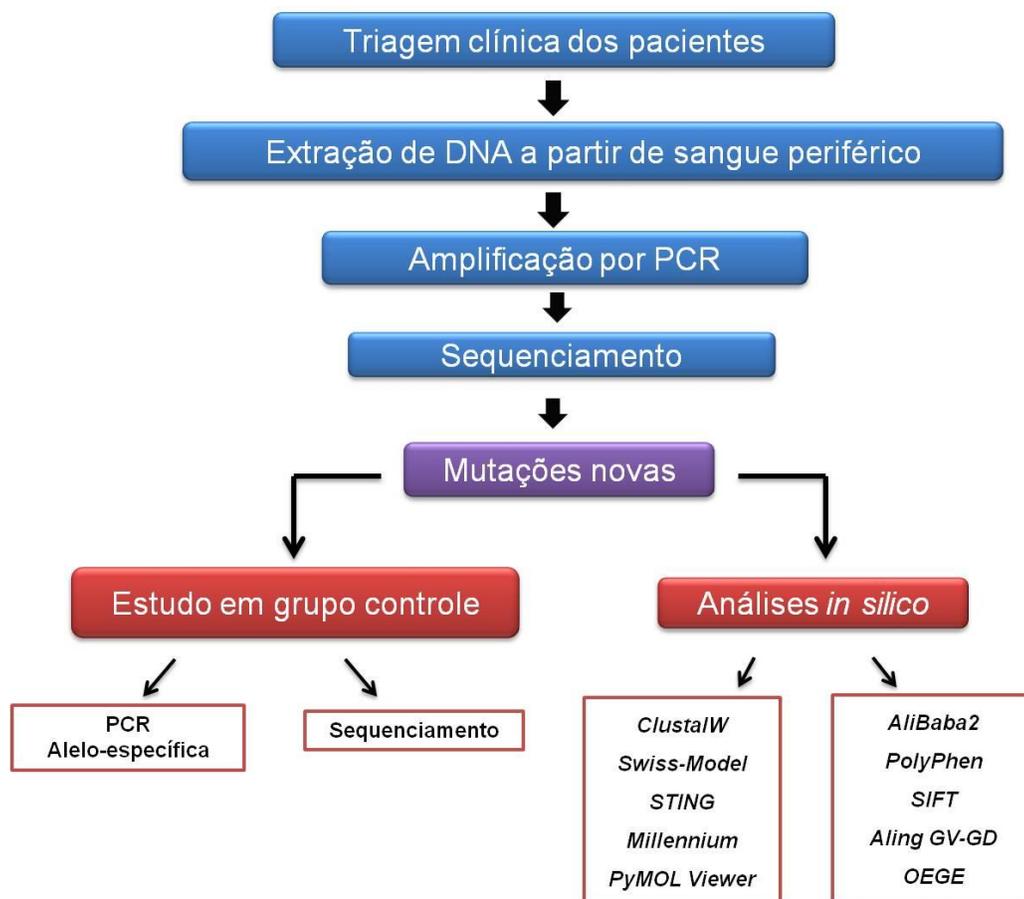


FIGURA 10: Fluxograma ilustrando a metodologia empregada para a realização deste trabalho.

2.1 Obtenção das amostras e extração de DNA genômico

As amostras de DNA genômico dos pacientes foram obtidas a partir de sangue total periférico (aproximadamente 15 mL em adultos e 10 mL em crianças), colhido em tubos com 10% de anti-coagulante ácido etileno diamino tetracético (EDTA).

2.2 Extração de DNA genômico a partir de sangue total periférico

Para extração de DNA foi empregado o método de lise com Proteinase K padronizada no laboratório de Genética Molecular Humana – CBMEG (Araújo, 1996). As etapas e as soluções utilizadas seguem listadas a baixo:

Soluções:

Solução A	[] final	Solução B (estoque 2X)	[] final	Solução C	[] final
<i>MgCl₂</i>	5 mM	<i>EDTA</i>	20 mM	<i>Solução B</i>	0,5 X
<i>Sacarose</i>	0,32 M	<i>NaCl</i>	20 mM	<i>SDS</i>	5%
<i>Tris-HCl pH 8,0</i>	10 mM	<i>Tris-HCl pH 8,0</i>	20 mM	<i>Proteináse K</i>	1 mg/mL
<i>Triton X-100</i>	1%				

Etapas:

- Para lise das hemácias foi adicionada solução A ao sangue coletado até completar o volume de 50 mL, permanecendo no gelo por 30 minutos;
- Centrifugou-se por 10 minutos a 2.000 rpm e 4 °C;
- O sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) ressuscitado em 20 mL da solução A. Esta etapa foi repetida até o *pellet* ficar livre de hemácias lisadas;
- O *pellet* foi ressuscitado em solução B diluída em 1X;

- Acrescentou-se 250 μ L de solução C;
- A mistura permaneceu *overnight* em incubação a 37 °C;
- No dia seguinte para a extração de DNA dos leucócitos foram adicionados 1,25 mL de TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) e o mesmo volume final de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM pH 8,0;
- Os tubos foram homogeneizados por inversão lenta durante 5 minutos;
- Para separação e recuperação da fase aquosa (superior) o tubo foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente;
- Acrescentou-se à fase aquosa igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM pH 8,0, e após leve agitação por 5 minutos foi centrifugado novamente;
- A etapa foi repetida com a solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), e por último clorofórmio:álcool isoamílico (24:1);
- Para precipitação do DNA, acrescentou-se 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 3,5 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado;
- O DNA precipitado foi recuperado com auxílio de uma haste de plástico esterilizada e lavado com etanol 70% para retirada do excesso de sal, e posteriormente ressuspendido em TE 1X (200 a 500 μ L).

A concentração de DNA foi obtida através de leitura de absorvância óptica a 260 nm em espectrofotômetro e a integridade do DNA foi verificada em eletroforese de gel de agarose a 0,8%.

2.3 Amplificação do gene *NR5A1*

A amplificação dos 7 exons do gene *NR5A1* foi realizada com *primers* específicos. Estes *primers* foram desenhados para amplificação dos exons e parte da região intrônica (nos limites dos exons), para verificação da região de *splicing*. Também foram desenhados

primers para as regiões não traduzidas 5' (cerca de 900 pb anteriores ao exon 1) e 3' (cerca de 1.800 pb posteriores ao códon de parada de síntese protéica) (TABELA 1).

De uma forma geral, para a reação de PCR, com um volume final de 50 µl, foram utilizadas as seguintes condições:

Volume dos reagentes:	Ciclo:
H ₂ O miliq ----- 33,4 µL	95 °C ----- 5 minutos
Tampão 10X concentrado ----- 5,0 µL	95 °C ----- 1 minuto
MgCl ₂ (50 mM) ----- 1,5 µL	T _m * ----- 1 minuto**
dNTP (2 mM) ----- 5,0 µL	72 °C ----- 1 minuto**
<i>Primer sense</i> (20 pmoles) ----- 1,0 µL	72 °C ----- 10 minutos
<i>Primer antisense</i> (20 pmoles) ----- 1,0 µL	15 °C ----- ∞
Taq DNA Polimerase ----- 0,3 µL	
DNA genômico ----- 2,0 µL	
	* T _m representa a temperatura média entre os <i>primers sense</i> e <i>antisense</i> .
Quando necessário é usado 2,5 µL de DMSO ou 0,3 µL de BSA.	
	** De acordo com o tamanho do fragmento este tempo pode se estender.

No entanto, houve casos em que a reação básica foi modificada para se obter melhor especificidade e eficiência de amplificação.

TABELA 1: *Primers* para amplificação e sequenciamento do gene *NR5A1*.

<i>Fragmento</i>	<i>Primer sense (5' – 3')</i>	<i>Primer antisense (5' – 3')</i>	<i>T_m (°C)</i>	<i>Frag. (pb)</i>
5'UTR	ACACAAAAGATCCAGTCACCG	CATTGGAGTAGAGTCAGGACAGG	56	494
Exon 1	GGAGCAGCCCATAAATCAAG	AACTCAGGTGGGGGACAGAG	56	853
Exon 2-3*	GAGAGGGGATTACGCGACGG	GCGAAGGCCAATGGTAACTATCC	58	834
Exon 4	GTTTGCATGAATCCAGGAGTG	AATGCTCCTTAATGTCCCCAG	54,5	1.173
Exon 4 int**	GGCTTCAAGCTGGAGACAG	GCAGCACGTAGTCCGGTG		
Exon 5	GGCACAGAGAGGTTAGCTTG	ACTCCAGTGTGTTATTTCCAGACC	57	563
Exon 6	CTCCTGACGCCAGCCCAT	GCTCCTTCGTGGCCACTCTG	55	691
Exon 7	GTGACAGCAATGGTGATGGCG	CCCGGCCAGGCTCAAGTC	57	508
3'UTR1	TCTGATGCCACCGAGGAG	TAGGATGTCGATTGTACCAAACG	56,9	622
3'UTR2	GGCATTGATACATCAG	AAGCGGGACGGACAGCAG	55,7	669
3'UTR3	GGTCATGAAGGACACTCTGCAG	CAACAGGCAGAGAGGCTACAG	57,5	557

* Os fragmentos dos exons marcados são curtos e ficam próximos, sendo possível realizar a amplificação em uma só reação.

** O par de *primers* marcado corresponde a *primers* internos que foram utilizados somente para o sequenciamento devido ao longo tamanho do fragmento amplificado com o par de *primers* do exon 4.

2.4 Purificação dos produtos da PCR

Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados com o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Após a purificação, as amostras foram quantificadas no equipamento *Nanodrop 8000 - Multi-Sample Micro-Volume UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific, USA).

2.5 Reação de Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado com os próprios *primers* desenhados para a amplificação dos fragmentos do gene *NR5A1*.

As reações de sequenciamento foram separadas por eletroforese capilar no sequenciador automático ABI 3500 utilizando o *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1 Ready Reaction* (ABI PRISM/PE Biosystems) conforme descrito abaixo:

Volume dos reagentes:	Ciclo:
H ₂ O miliq ----- 5,4 µL	95 °C ----- 1 minuto
Sequencing Buffer (5X) ----- 2,0 µL	95 °C ----- 20 segundos
<i>Primer</i> (5 pmol) ----- 1,0 µL	50 °C ----- 20 segundos
<i>BigDye</i> ----- 0,6 µL	60 °C ----- 4 minutos
Produto da PCR purificado ----- 1,0 µL	4 °C ----- ∞

Dependendo do tamanho do fragmento amplificado, utilizou-se de 3 ng a 100 ng na reação de sequenciamento.

2.6 Purificação da reação de sequenciamento

Após a retirada da placa de sequenciamento do termociclador os seguintes passos foram realizados:

- Adicionou-se 2,5 μ L de EDTA (125 mM) em cada poço, seguidos de 25 μ L de isopropanol 100% (Merck);
- A mistura foi deixada à temperatura ambiente e na ausência de luz por 15 minutos para precipitação do DNA;
- Centrifugou-se à 13.000 rpm e 4 °C por 35 minutos;
- A placa foi invertida e o sobrenadante foi descartado, a fim de remover todo o isopropanol;
- Adicionou-se 30 μ L de isopropanol 70% (Merck), e realizou-se uma nova centrifugação por 10 minutos a 13.000 rpm e 4 °C;
- A placa foi invertida e o sobrenadante foi descartado;
- A placa foi deixada à temperatura ambiente por cerca de 40 minutos e depois colocada no termociclador por 3 minutos a 80 °C para completar a secagem, em seguida, foi estocada a -20 °C.

O produto da reação de sequenciamento purificado foi ressuscitado em 10 μ L de Formamida *Hi-Di* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Estados Unidos), para posterior desnaturação a 94 °C por 5 minutos.

As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com as sequências normais do gene *NR5A1* (obtidas através do site www.esembl.org) com o auxílio dos programas *Chromas Lite* e *CLC Sequence Viewer 6.3* que são de distribuição gratuita.

2.7 PCR Alelo-específica

Para alguns casos de mutações novas, a técnica de PCR alelo-específica foi utilizada para triagem em controles normais. Foram desenhados *primers* específicos para a troca nucleotídica, e a partir daí, uma reação com o *primer* normal e outra com o *primer* mutante foram realizadas. Através da visualização no gel de agarose 1% foi possível verificar a amplificação positiva ou negativa, com isso 100 controles foram analisados.

A condição utilizada, para 30 µL de reação, foi:

Volume dos reagentes:	Ciclo:
H ₂ O miliq ----- 20,4 µL	95 °C ----- 5 minutos
Tampão 10X concentrado ----- 3,0 µL	95 °C ----- 1 minuto
MgCl ₂ (50mM) ----- 0,8 µL	Tm* ----- 1 minuto
dNTP (2 mM) ----- 2,5 µL	72 °C ----- 1 minuto
<i>Primer</i> (20 pmoles) ----- 1,0 µL	72 °C ----- 5 minutos
<i>Primer</i> âncora (20 pmoles) ----- 1,0 µL	15 °C ----- ∞
BSA ----- 0,3 µL	
Taq DNA Polimerase (5U/ µL) --- 0,3 µL	
DNA genômico ----- 1,0 µL	

} 30X

* Tm representa a temperatura média entre os *primers* sense e antisense.

Os *primers* específicos desenhados para as mutações foram:

c.-133G>A normal (antisense) – 5' GTGCGCAGAAACCCCCTC 3'

c.-133G>A mutante (antisense) - 5' GTGCGCAGAAACCCCCTT 3'

c.-133G>A âncora (sense) – 5' GGAGCAGCCCATAAATCAAG 3'

c.-208C>A normal (antisense) - 5' CTCCTCCCCGCCCTGGTG 3'

c.-208C>A mutante (antisense) – 5' CTCCTCCCCGCCCTGGTT 3'

c.-208C>A âncora (sense) – 5' GGAGCAGCCCATAAATCAAG 3'

Para outras mutações, as padronizações por PCR alelo-específica não tiveram sucesso; assim, os controles saudáveis nesses casos foram investigados através do sequenciamento direto do fragmento onde se observou a nova troca nucleotídica.

2.8 Estudo *in silico*

Para as alterações encontradas na região não traduzida do gene, foram realizadas análises *in silico* utilizando o programa *AliBaba2 Gene Regulation* (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>), que avalia a existência de motivos reguladores. Incluindo a sequência normal e a mutante no programa, é possível avaliar se a região da alteração está localizada em um sítio de reconhecimento para fatores de transcrição, e se, com a troca nucleotídica, estes sítios são alterados ou não.

Três métodos computacionais foram utilizados para avaliar o impacto da troca de aminoácido na proteína para as mutações *missense* encontradas, indicando se esta alteração seria prejudicial para sua função, e se contribuiria ou não para o fenótipo do indivíduo afetado. Os programas usados foram: PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) (<http://sift.jcvi.org/>) e Align-GVGD (<http://agvgd.iarc.fr/>). O PolyPhen é utilizado para predição do impacto funcional e estrutural de substituições de resíduos de aminoácidos em proteínas; os valores calculados vão de 0 à 1,0, sendo que quanto mais alto este valor, mais a substituição estudada é raramente (ou nunca) observada na família proteica, sendo considerada mais deletéria (Sunyaev *et al.*, 2000). A precisão é de aproximadamente 81%, com uma taxa de “falsos-negativos” e “falsos-positivos” de 31% e 9%, respectivamente (Ramensky *et al.*, 2002; Ng & Henikoff, 2006). A ferramenta SIFT tem como função determinar o efeito funcional causado por substituições de resíduos de aminoácidos nas proteínas, baseando-se no pressuposto que a evolução proteica está correlacionada com a função proteica, mostrando a conservação de resíduos de aminoácidos localizados em posições importantes para a função proteica; as substituições que apresentam um valor de tolerância menor do que 0,05 são consideradas intolerantes ou deletérias, enquanto que as

que apresentam um valor maior do que 0,05 são consideradas tolerantes. A precisão da ferramenta é de 60%, sendo que as taxas de “falso-negativos” e “falso-positivos” registrada foram iguais a 31% e 20%, respectivamente (Ng & Henikoff, 2001; Ng & Henikoff, 2006). Já o programa Align-GVGD é baseado nas diferenças químicas, de polaridade e de volume molecular entre os aminoácidos trocados; dois valores são gerados, GD (*Grantham Difference*) e GV (*Grantham Variant*), que predizem se a mutação de interesse está dentro de um espectro deletério ou neutro (Kabuto *et al.*, 2012). O critério de avaliação dos valores, são os seguintes (Mathe *et al.*, 2006 & Tavtigian *et al.*, 2006):

- Se $GD = 0$: a composição, polaridade e volume do aminoácido mutante estão dentro da variação observada entre os alinhamentos, sendo considerada uma mutação neutra;
- Se $(GV > 61.3)$ e $(0 < GD < 61.3)$: ainda é considerada como uma alteração conservativa, indicando ser uma alteração neutra;
- Se $(GV = 0)$ e $(GV > 0)$: a posição onde está a mutação é 100% conservada, sendo assim qualquer alteração neste local é considerada deletéria;
- Se $(0 < GV < 61.3)$ e $(GD > 0)$: há uma pequena variação na conservação do aminoácido na posição indicada, mas mesmo assim, está troca é considerada como deletéria.

A partir dos cálculos desses valores (GV e GD), a troca é classificada também dentro de classes (C0 – C65), sendo que quanto mais próximo de C65, mais deletéria é considerada a mutação (FIGURA 11).

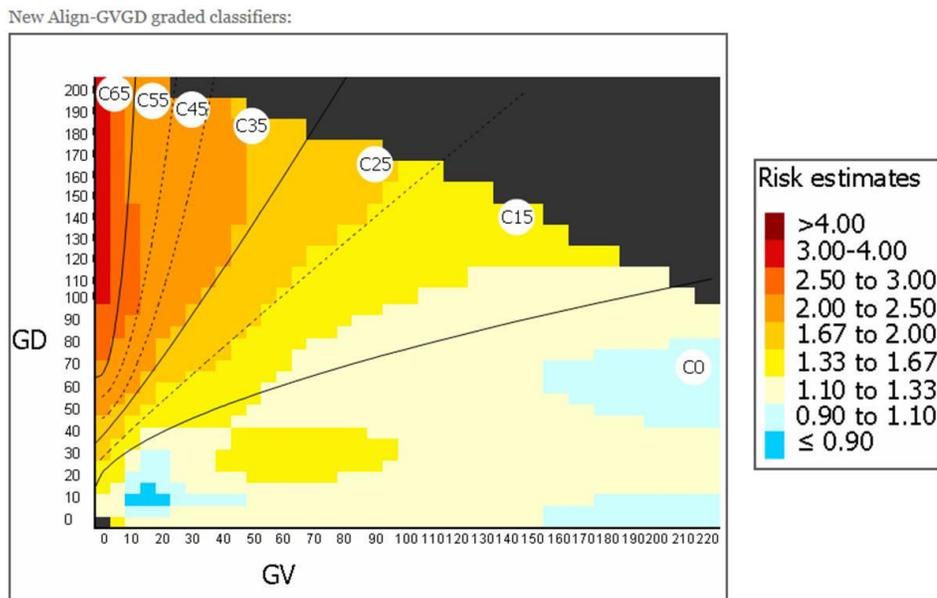


FIGURA 11: Gráfico gerado no programa Aling-GVG obtido pelo site <http://agvgd.iarc.fr/classifiers.php>. Cada mutação estudada é classificada dentro de classes, sendo que quanto mais próximo de C65, mais deletéria é considerada a alteração.

Para verificar a conservação da posição proteica onde houve a troca de aminoácido, as sequências do gene *NR5A1* humano normal e mutante foram comparadas às sequências de outros mamíferos. As sequências foram obtidas através do *Uniprot* (<http://www.uniprot.org/>) e os alinhamentos comparativos foram realizados através do programa *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

As análises estruturais para algumas das mutações encontradas também foram realizadas para melhor compreensão dos efeitos da troca de aminoácido na proteína SF-1. O modelo resolvido utilizado foi de camundongo (PDB ID: 2FF0A) com 100% de similaridade com a proteína SF-1. Foi solicitada a modelagem da estrutura da proteína normal e mutante no software Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) para fins comparativos de estrutura. A visualização e manipulação das estruturas foram realizadas através da interface gráfica gerada pelo programa de acesso *STING Millennium* (www.cnptia.embrapa.br) e pelo programa *PyMOL Viewer*.

Para os polimorfismos encontrados, o do programa OEGE (*Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies*) acessado pelo site <http://www.oege.org/software/hwe-mr->

[calc.shtml](#), foi utilizado para calcular se as frequências encontradas neste trabalho estavam de acordo com as esperadas, e dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os 86 pacientes analisados neste trabalho, foram identificadas seis mutações na região codificante (p.Cis65Tir, p.Arg39Cis, p.Lis38*, p.L80Wfs*8, p.Ser32Asn, p.Cis247*, p.Asp364Trefs*18 e), uma em sítio de *splicing* (c.1138+1G>T), duas no exon 1 não-codificante (c.-133G>A e c.-156_-136ins18pb), três alterações na região 5'UTR (c.-413G>A, c.-208C>A e c.-762C>T) e uma alteração na região 3'UTR (c.*1286C>T) (TABELA 2). Não há registro de outros trabalhos nos quais as mutações e alterações aqui descritas tivessem sido identificadas. As características clínicas de cada paciente se encontram no quadro 1 (anexo I).

Além disso, em 31 dos 86 pacientes estudados, foi identificado o polimorfismo p.Gli146Ala, descrito previamente por WuQiang *et al.* (2003). Dentre eles, os pacientes 4, 5, 8 e 11 que apresentaram mutação, também apresentaram este polimorfismo.

TABELA 2: Alterações encontradas no gene *NR5A1*.

PACIENTE	DIAGNÓSTICO	LOCAL	TROCA NUCLEOTÍDICA	ALTERAÇÃO PROTÉICA
1, 2 e 3	DDS 46,XY idiopático	Exon 3	c.195G>A	p.Cis65Tir
4	DDS 46,XY idiopático	Exon 3	c.115C>T	p.Arg39Cis
5	DG Parcial XY	Exon 3	c.112A>T	p.Lis38*
6	DDS 46,XY idiopático	Exon 3	c.238delC	p.L80Wfs*8
7	DG Parcial XY	Exon 2	c.94G>A	p.Ser32Asn
8	DDS 46,XY idiopático	Exon 5	c.741C>A	p.Cis247*
9	DDS 46,XY idiopático	Exon 6	c.1296delG	p.Asp364Trefs*18
		Exon 1	c.-133G>A	-
10	DG Parcial XY	Intron 6	c.1138+1G>T	-
11	DG Pura XY	Exon 1	c.-156_-136ins18pb	-
12	DG Parcial XY	5'UTR	c.-208C>A	-
			c.-413G>A	-
13	DDS 46,XY idiopático	5'UTR	c.-762C>T	-
14	DDS 46,XY idiopático	3'UTR	c.*1286C>T	-

A FIGURA 12 representa um esquema dos exons do gene *NR5A1* e da proteína SF-1, desenhada para facilitar a visualização da posição de cada uma das mutações encontradas neste trabalho, em relação aos domínios da proteína.

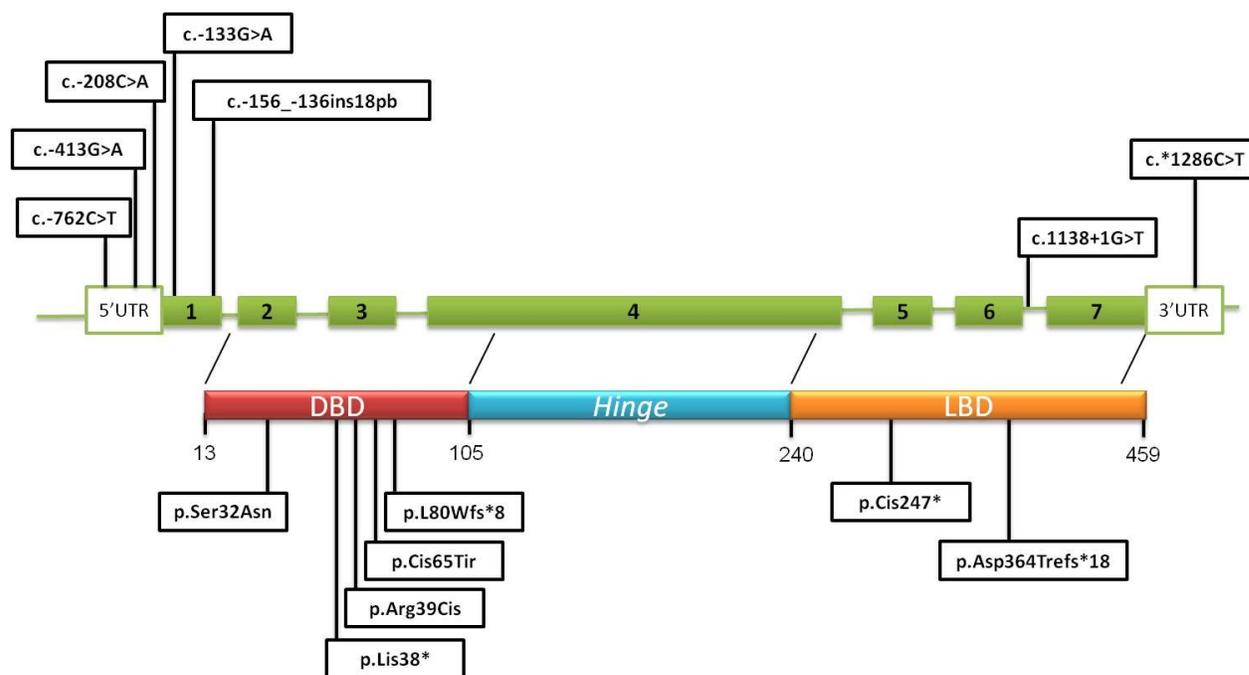


FIGURA 12: Ilustração mostrando a posição de cada um dos exons do gene *NR5A1*, em relação aos domínios da proteína SF-1, ressaltando a posição de cada uma das mutações encontradas neste trabalho.

1. Mutação *p.Cis65Tir*

A mutação *p.Cis65Tir* foi identificada em heterozigose em três irmãos (pacientes 1, 2 e 3). O primeiro filho (caso índice) foi encaminhado aos médicos por nascer com genitália ambígua e chegou para avaliação com registro no sexo feminino; o segundo apresentava hipospádia e gônadas palpáveis, enquanto que o terceiro nasceu com uma abertura urogenital e gônadas palpáveis na região inguinal. Os pais não são consanguíneos e também

foram estudados, verificando-se que a mutação foi herdada da mãe (FIGURA 13). A troca de uma guanina por uma adenina foi observada no exon 3 na posição c.194 (FIGURA 14).

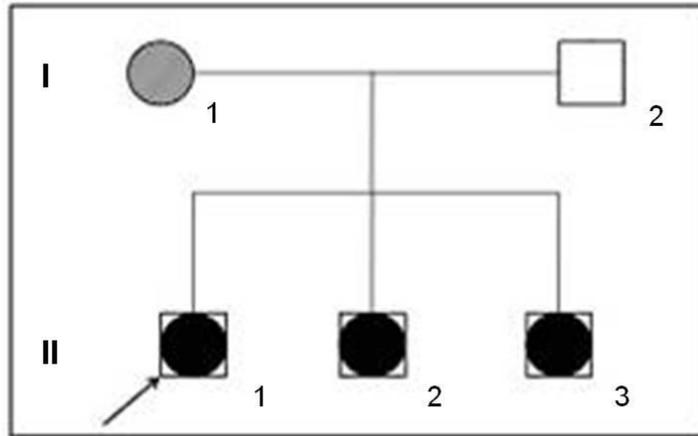


FIGURA 13: Heredograma da família estudada. Os três irmãos carregam a mutação p.Cis65Tir que foi herdada da mãe. Os filhos afetados apresentam quadros de DDS 46,XY.

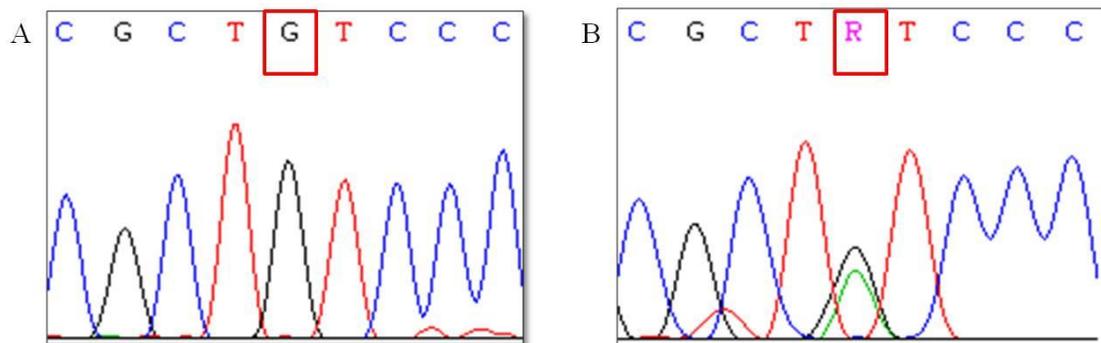


FIGURA 14: Parte dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento do exon 3, mostrando a substituição em heterozigose c.194G>A, levando à mutação p.Cis65Tir identificada em três irmãos portadores de DDS 46,XY. A) Sequência normal do exon 3, a caixa vermelha ressalta a guanina (G) na qual ocorreu a troca. B) Sequência mutante do exon 3, mostrando a troca em heterozigose de G para A (R).

Esta mutação levou a uma troca de uma cisteína por uma tirosina no resíduo 65 da proteína, que se encontra no segundo dedo de zinco da região de domínio de ligação ao DNA (DBD). Apesar de ambos os aminoácidos serem neutros e polares, eles possuem estruturas e interações intramoleculares bem diferentes (FIGURA 15A). A cisteína é um aminoácido que tem um grupamento tiol na sua composição química, o que lhe dá a característica hidrofílica; além disso, ela é susceptível a oxidação para formar pontes dissulfetos com outras cisteínas, o que constitui um fator importante para as estruturas protéicas. Por outro lado, sua cadeia lateral lhe dá as características hidrofóbicas observadas em proteínas. A tirosina, por sua vez, apesar de possuir um grupamento substituinte aromático e neutro, é polar e susceptível à fosforilação. Dentro de uma estrutura protéica, sua característica aromática confere a capacidade de interagir com outros resíduos aromáticos formando “*stackings*”. Além disso, ela pode interagir com átomos não carbônicos através do grupamento hidroxila (Betts & Russel, 2003).

Através de alinhamento no *Clustal* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), pode-se verificar que a cisteína da posição 65 é altamente conservada entre os mamíferos (FIGURA 15B).

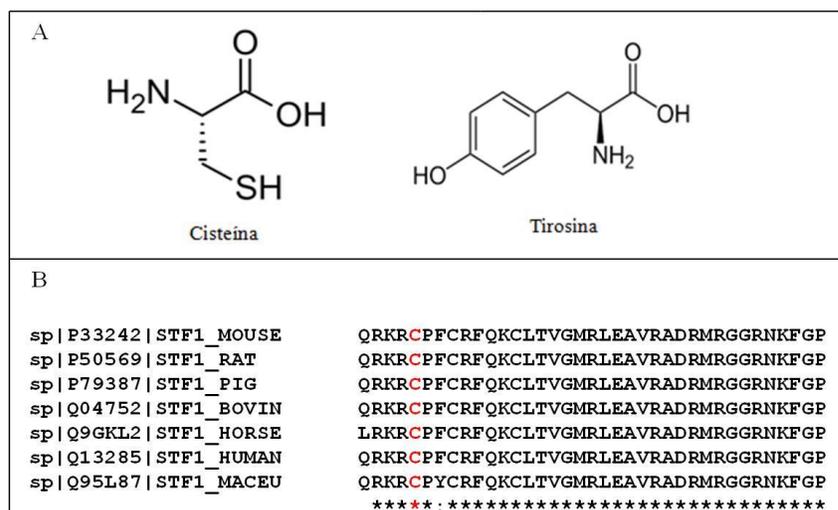


FIGURA 15: A) Estruturas dos aminoácidos cisteína e tirosina, os quais foram trocados levando a mutação p.Cis65Tir. B) Alinhamento da cisteína da posição 65, mostrando sua conservação entre as espécies de mamíferos.

Usando o PDB: 2FF0 – cadeia A como molde, iniciou-se a análise estrutural para esta mutação. Os modelos da proteína normal e mutante foram construídos através do programa SWISS MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>). Os contatos internos foram avaliados através do programa STING Millenium (<http://www.cbi.cnptia.embrapa.br>) e visualizados pelo *PyMOL Viewer*. Assim, como observação preliminar, foi possível verificar que a cisteína do resíduo 65 (C65) na proteína normal estabelecia uma ponte de hidrogênio com a arginina do resíduo 69 (R69) e uma interação hidrofóbica com a cisteína do resíduo 68 (C68) (FIGURA 16A). Já na proteína mutante, a tirosina, agora do resíduo 65 (Y65) manteve ambas as interações com a mesma distância, mas um novo contato interno com a cisteína do resíduo 55 (C55) foi estabelecido, indicando provavelmente uma mudança conformacional (FIGURA 16B).

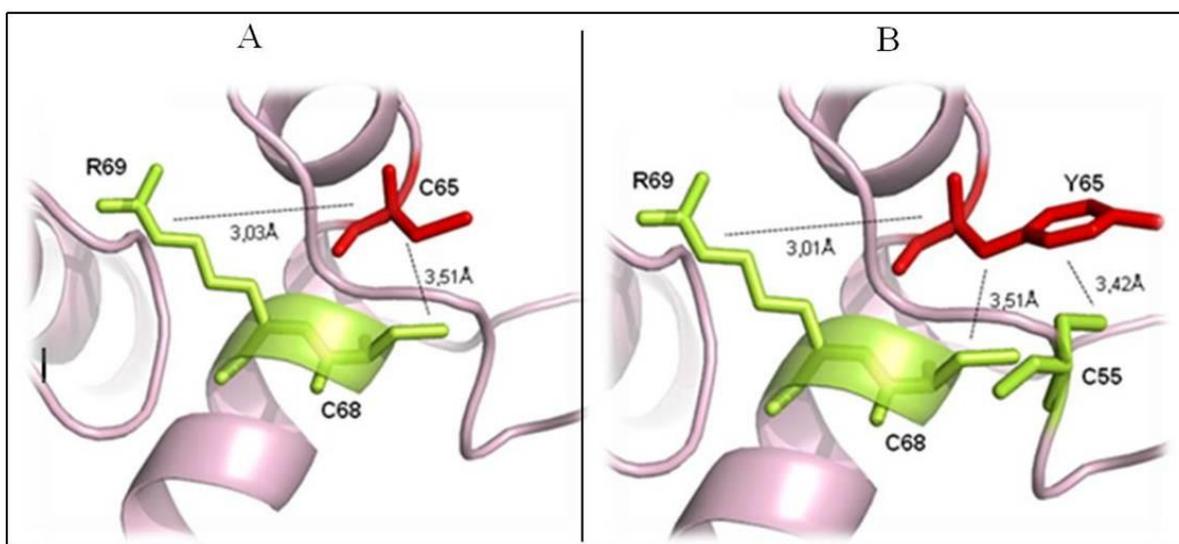


FIGURA 16: Análise estrutural da mutação p.Cis65Tir. A) Contatos internos da proteína normal; C65 estabelece ponte de hidrogênio com R69 e interação hidrofóbica com C68. B) Contatos internos da proteína mutante; Y65 mantém contatos internos com R69 e C68 com a mesma distância, porém estabelece um novo contato hidrofóbico com C55 em uma distância de 3,42 angstroms.

Usando as ferramentas computacionais PolyPhen, SIFT e Align-GVGD como análises de predição para avaliar se a troca do aminoácido é prejudicial ou não, foram obtidos os seguintes resultados:

PolyPhen = 1,0 – Considerada deletéria

SIFT = 0 - Considerada deletéria

Aling-GVGD = GV = 0, GD = 193,72 e Classe C65 – Considerada deletéria

Os três programas confirmaram que se trata de uma mutação deletéria e que provavelmente é causadora do fenótipo do indivíduo.

Para descartar a possibilidade de polimorfismo, 86 controles saudáveis (172 alelos) foram sequenciados, sendo que nenhum apresentou o alelo mutante (FIGURA 17).

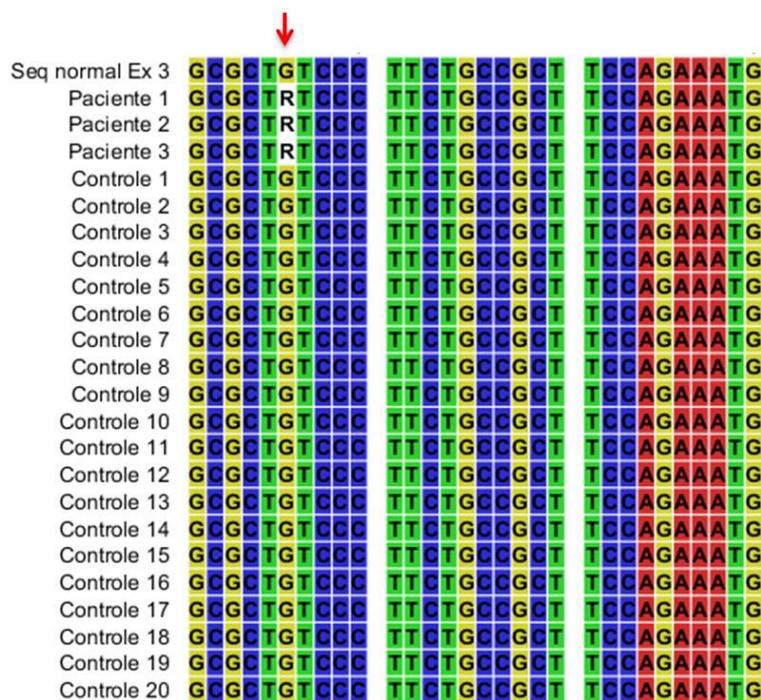


FIGURA 17: Alinhamento no programa CLC sequence viewer 6.0 das seqüências obtidas no sequenciamento do exon 3 de 20 controles saudáveis ressaltando a posição da troca c.194G>A, levando à mutação p.Cis65Tir. Os três pacientes foram os únicos que apresentaram o alelo mutante. Este teste foi realizado para outros 66 controles, sendo todos homocigotos do alelo G normal.

Apesar de nenhuma mutação ter sido previamente descrita no aminoácido C65, algumas já foram encontradas na região DBD da proteína, porém a mais próxima deste aminoácido mutado foi a p.Glu51Argfs*23, descrita por Philbert *et al.* em 2010, no caso de adolescentes com amenorréia primária; esta deleção resultava em uma proteína com atividade nula.

Além disso, a cisteína da posição 65 se localiza no sítio de ligação ao zinco. O DBD da proteína SF-1 é formado por dois dedos de zinco do tipo C4, cada um deles contém um grupo de quatro resíduos de cisteína que se liga a um átomo de zinco; esses domínios interagem com sequências específicas do DNA e modulam o início da transcrição (FIGURA 18). Os dedos de zinco são diversamente funcionais, podendo estar envolvidos na ligação com ácidos nucleicos (DNA e RNA), nas interações entre proteínas, na ligação com pequenos ligantes como lipídeos, e em alguns casos, pode também apresentar propriedades enzimáticas. Realizando essas funções, os dedos de zinco são fundamentais em diversos processos celulares, como replicação e reparo, tradução e morte celular programada (Krishna *et al.*, 2003). Dessa maneira, a troca de uma cisteína nesta posição, pode ter afetado a formação do dedo de zinco e conseqüentemente a atividade transcricional da proteína SF-1.

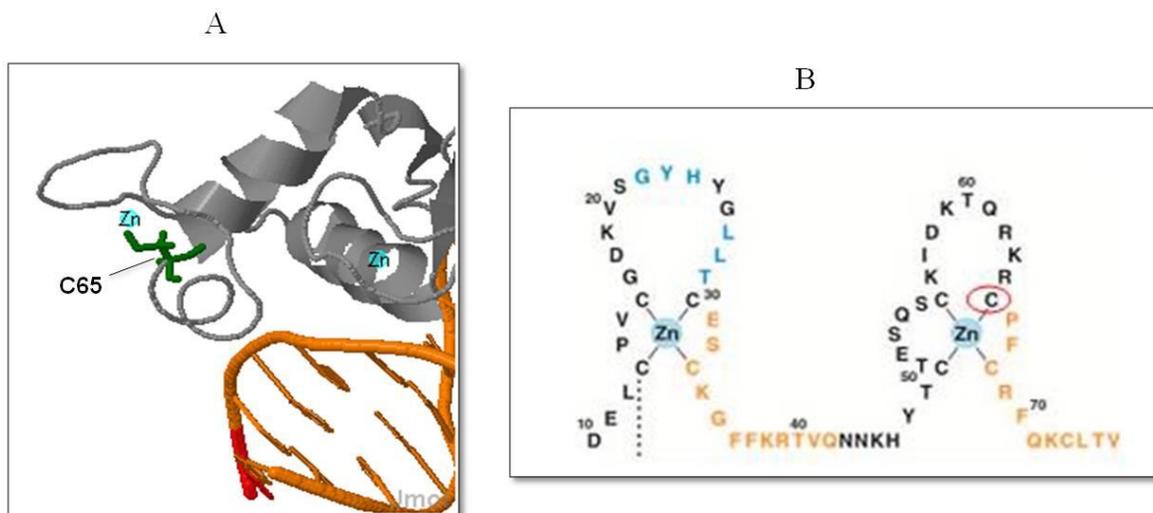


FIGURA 18: A) Análise estrutural mostrando a interação da proteína SF-1 com o DNA. A cisteína da posição 65 que sofreu mutação se encontra na região de ligação direta com o DNA no segundo dedo de zinco. B) Esquema dos dois dedos de zinco localizados no domínio de ligação ao DNA. A cisteína 65, destacada em vermelho, se encontra ligada diretamente ao zinco (Adaptado de Litte *et al.*, 2006).

Por todas essas razões, e também pelo fato de que os três filhos foram diagnosticados com DDS 46,XY, a mutação p.Cis65Tir pode ser considerada como causadora do fenótipo desses indivíduos. Além disso, há um primeiro relato de níveis elevados de gonadotrofinas na mãe, que atualmente está com 32 anos e é portadora da mutação, sugerindo que venha a manifestar falência ovariana precoce.

2. Mutação p.Arg39Cis

Identificou-se a alteração c.115C>T no exon em heterozigose no paciente 4 com DDS 46,XY (FIGURA 19). O paciente foi encaminhado ao serviço de pediatria com 37 dias de vida, apresentando genitália ambígua, sem gônadas palpáveis, falo com 1,5 cm de

comprimento e 0,8 cm de diâmetro com meato uretral na base, ausência de útero e gônadas inguinais bilaterais com aspecto de testículos.

A mutação resulta na troca p.Arg39Cis dentro do DBD da proteína SF-1. A análise da mãe foi realizada, mostrando que ela também é portadora da mutação.

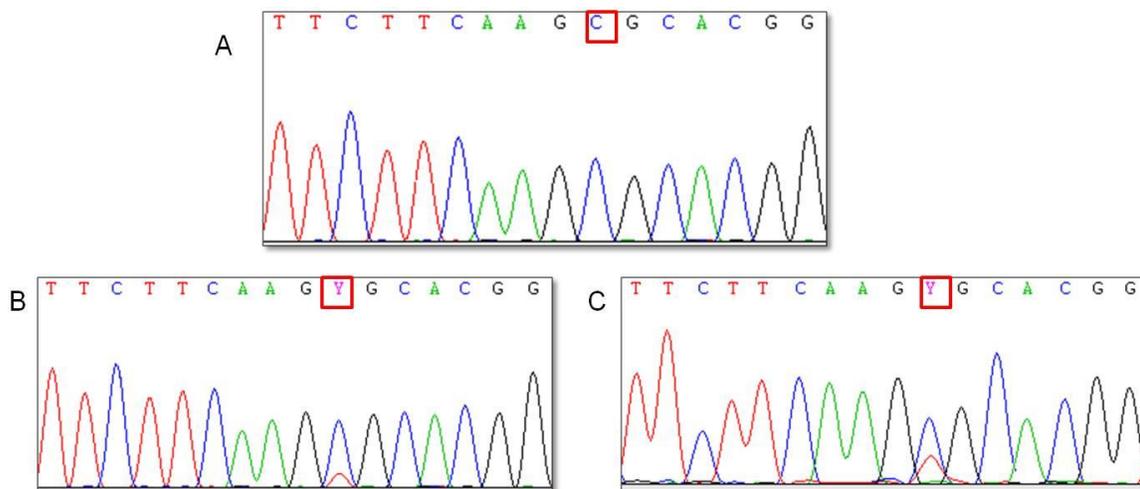


FIGURA 19: Parte dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento do exon 3, mostrando a substituição em heterozigose de uma citosina por uma timina, levando à mutação p.Arg39Cis identificada no paciente 4 com DDS 46,XY idiopático. A) Sequência normal do exon 3, a caixa vermelha ressalta a citosina (C) na qual ocorreu a troca. B) Sequência mutante do exon 3 do paciente, mostrando a troca em heterozigose de C para T (Y). C) Sequência da mãe do paciente, mostrando que ela também é portadora a mesma mutação encontrada no filho.

Na proteína, a mutação levou a uma substituição de uma arginina no resíduo 39 por uma cisteína no último aminoácido do primeiro dedo de zinco da região de DBD. Os aminoácidos trocados são bem diferentes em suas estruturas (FIGURA 20A), ambos são polares, porém a arginina é carregada positivamente, enquanto a cisteína tem carga neutra. A arginina está frequentemente envolvida em pontes salinas, pareando com as cargas negativas do aspartato ou glutamina para criar pontes de hidrogênio estáveis que são importantes para a estabilidade da proteína. Além disso, as argininas estão envolvidas na

atividade da proteína ou nos sítios de ligação. Enquanto isso, como já discutido anteriormente, a cisteína apresenta um papel fundamental na estrutura terciária da proteína, formando pontes dissulfetos com outras cisteínas; ela possui um grupamento tiol na sua composição química que lhe dá a característica hidrofílica, enquanto sua cadeia lateral lhe dá as características hidrofóbicas (Betts & Russel, 2003).

Através de alinhamento no *Clustal* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), pode-se verificar que a arginina da posição 39 é altamente conservada entre os mamíferos (FIGURA 20B).

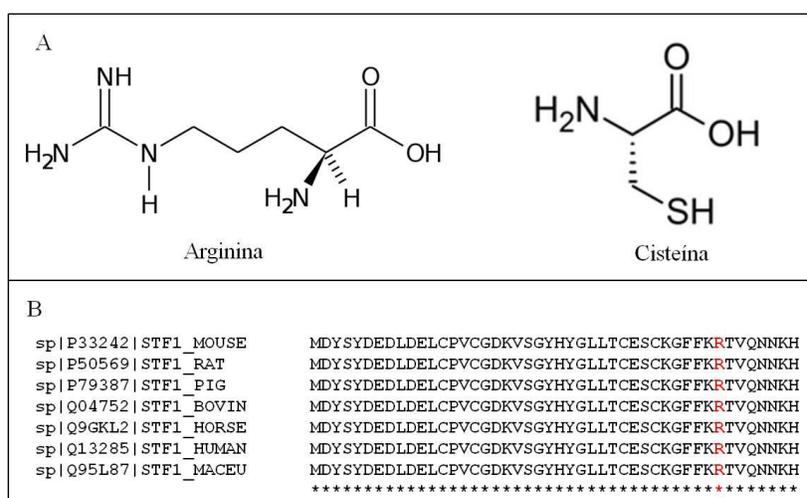


FIGURA 20: A) Estruturas dos aminoácidos arginina e cisteína, os quais foram trocados levando a mutação p.Arg39Cis. B) Alinhamento da arginina da posição 39, mostrando sua conservação entre as espécies de mamíferos.

Usando o PDB: 2FF0 – cadeia A como molde, foi realizada a análise estrutural para esta mutação. Apesar das diferenças estruturais e funcionais que os aminoácidos arginina e cisteína possuem, quando mutados nenhuma alteração nos contatos internos da proteína ocorreu. Na proteína normal a arginina do resíduo 39 (R39) estabelecia uma ponte de hidrogênio com uma glicina (G35) a uma distância de 2,91Å, e outra ponte de hidrogênio

com uma asparagina (N43) a uma distância de 2,73Å (FIGURA 21A). Na proteína mutante os mesmos contatos com as mesmas distâncias foram mantidos (FIGURA 21B), ficando difícil afirmar que ocorreu alguma mudança conformacional na proteína.

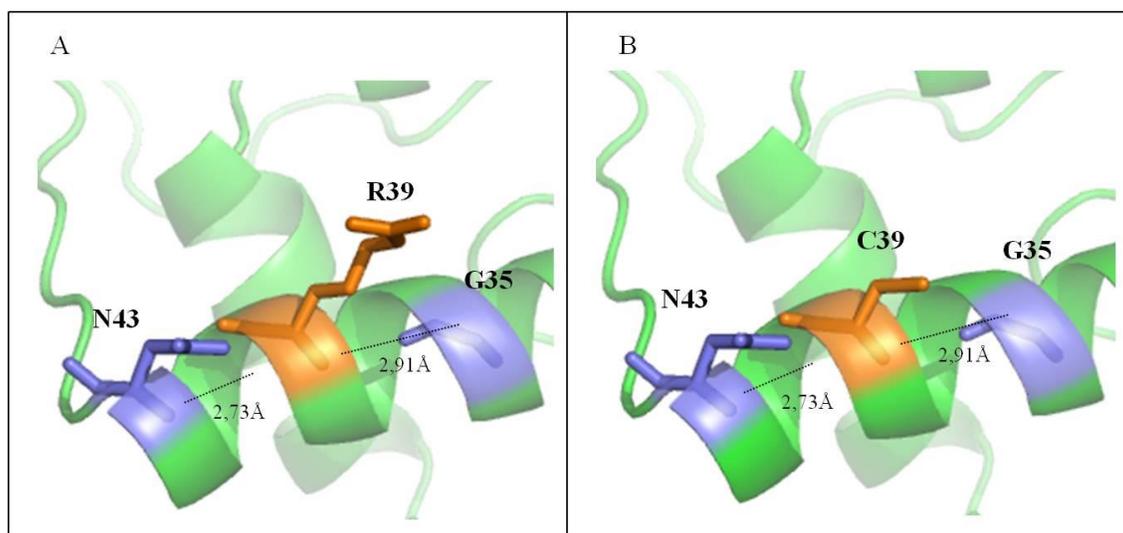


FIGURA 21: Análise estrutural da mutação p.Arg39Cis. Os contatos internos permaneceram os mesmos tanto na proteína normal como na proteína mutante. A) Proteína normal, R(39) estabelece contato com N(43) e G(35). B) Proteína mutante, C(39) mantém contatos com N(43) e G(35).

Como resultados dos programas PolyPhen, SIFT e Aling-GVGD obtivemos:

PolyPhen = 1,0 – Considerada deletéria

SIFT = 0 - Considerada deletéria

Aling-GVGD = GV = 0, GD = 179,56 e Classe C65 – Considerada deletéria

Os três programas confirmaram que se trata de uma mutação deletéria e que provavelmente é causadora do fenótipo do indivíduo.

Philibert *et al.*, em 2010 também descreveram uma mutação no resíduo R39, a p.Arg39Pro no caso de uma menina 46,XY com amenorréia primária e baixa concentração de testosterona; a mutação foi descrita como potencialmente causadora do fenótipo.

Através da análise estrutural gerada pelo programa PolyPhen, é possível perceber que o aminoácido R39 se encontra em região direta de ligação ao DNA (FIGURA 22). De acordo com os pressupostos de Sunyaev *et al.* (2001), esta mutação se enquadra em dois dos itens dos quais deve ser considerada como deletéria: o item I, na qual a variação afeta diretamente um sítio de ligação, no caso, para o DNA; e o IV, na qual a variação gera uma troca na carga elétrica, pois a arginina é carregada positivamente, enquanto que a cisteína tem carga neutra.

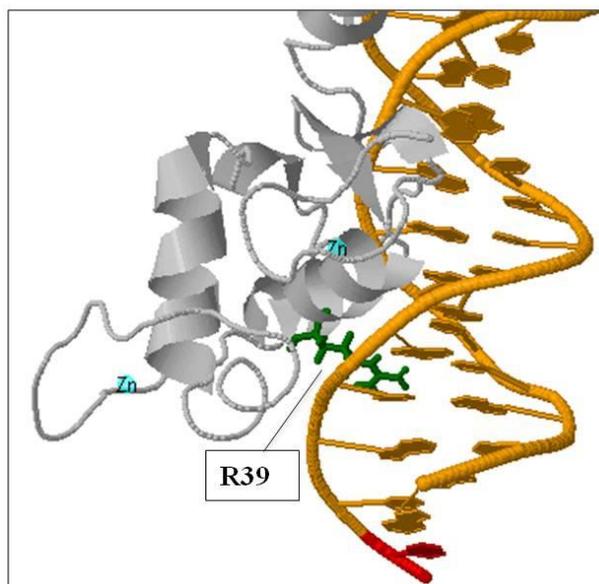


FIGURA 22: A) Análise estrutural mostrando a interação da proteína com o DNA. A arginina da posição 39 que sofreu mutação se encontra ligada diretamente ao DNA. Esta alteração provavelmente resulta em danos na formação do complexo proteína-DNA.

Para descartar a possibilidade de polimorfismo, 86 controles saudáveis (172 alelos) foram sequenciados, sendo que o alelo mutante não foi identificado em nenhum indivíduo (FIGURA 23).

3. Mutação p.Lis38*

Identificou-se a mutação c.112A>T em heterozigose no exon 3 do paciente 5 com DG parcial 46,XY (FIGURA 24). Este paciente foi diagnosticado com 44 meses, apresentando genitália ambígua com grau de Prader III, um testículo do lado direito e uma gônada disgenética com derivados de Müller do lado esquerdo.

A substituição nucleotídica resultou em uma troca de uma lisina por um códon de parada na posição 38, levando a mutação *nonsense* p.Lis38*. Não foi possível verificar se a mutação foi herdada, pois os pais não foram analisados.

Para a mutação p.Lis38* as análises *in silico* da proteína mutante e de frequência em indivíduos saudáveis foram dispensadas, pois se trata de uma mutação *nonsense* no domínio de ligação ao DNA. Pressupõe-se que esta proteína não será traduzida, pois a mutação se encontra no início da região codificante.

Além desta mutação, o paciente 5 é um dos que apresentou o polimorfismo p.Gli146Ala, o que pode ter contribuído para a formação de seu fenótipo de disgenesia gonadal parcial.

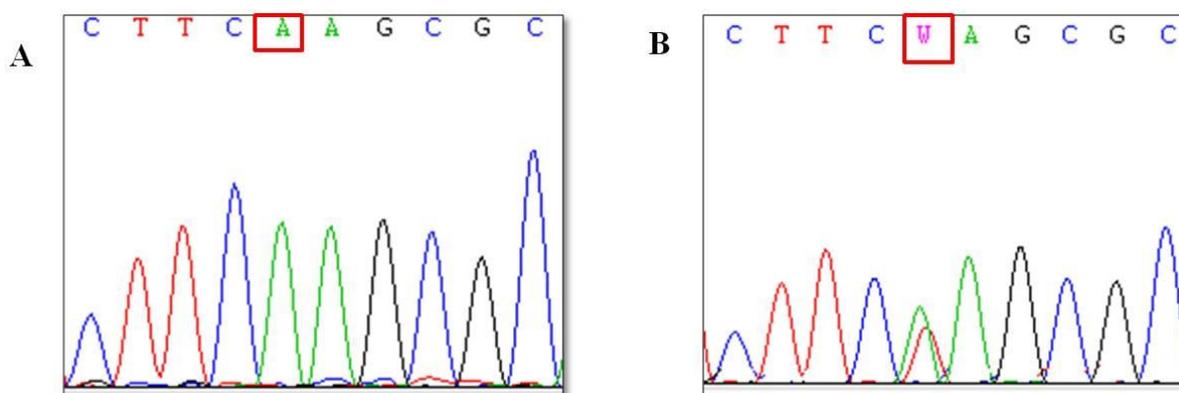


FIGURA 24: Parte dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento do exon 3, mostrando a substituição em heterozigose c.112A>T, levando à mutação p.Lis38* identificada no paciente 5 com DG Parcial 46,XY. A) Sequência normal do exon 3, a caixa vermelha ressalta a adenina (A) na qual ocorreu a troca. B) Sequência mutante do exon 3, mostrando a troca em heterozigose de A para T (W).

4. Mutação p.L80Wfs*8

Foi identificada a mutação p.L80Wfs*8 decorrente da deleção da citosina c.238 no exon 3, do paciente 6 (FIGURA 25). Este paciente foi encaminhado aos médicos aos 10 meses de idade por ambiguidade genital; apresentava genitália com falo de 2,3 cm sem hipospádia, com gônadas palpáveis no canal inguinal bilateral médio (Prader V). Nasceu de pais saudáveis e não consanguíneos, e recentemente mudou seu registro para o sexo masculino.

A citosina que sofreu deleção corresponde à primeira posição do códon 238, levando a substituição de uma leucina por um triptofano. Esta troca altera o quadro de leitura e forma um códon de parada prematura da síntese protéica no códon 246, isto é, 8 resíduos à frente. Neste caso não se pode verificar se a mutação foi herdada ou não, pois não foi realizada a análise dos pais.

Para a mutação p.L80Wfs*8 as análises *in silico* e de frequência em indivíduos saudáveis foram dispensadas, pois se trata de uma mutação em *frameshift* que leva a um códon de parada no início da proteína, dentro do domínio de ligação ao DNA. Este fato leva a crer que, muito provavelmente, esta proteína não será produzida porque seu mRNA será degradado pelo processo de *nonsense mRNA decay* antes mesmo da tradução, o que explica o fenótipo de DDS 46,XY apresentado pelo paciente.

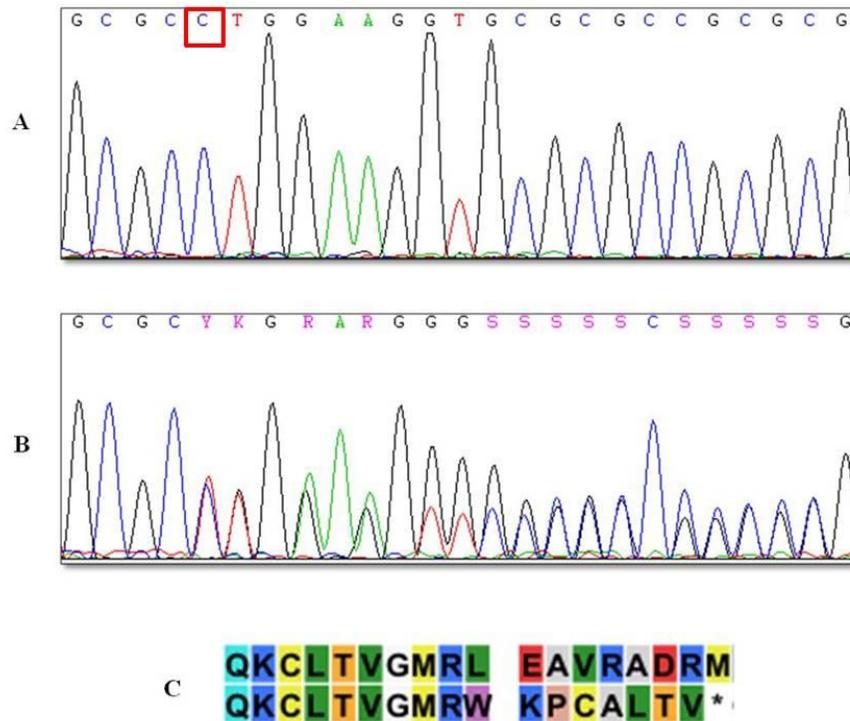


FIGURA 25: Parte dos eletroferogramas e alinhamentos obtidos no sequenciamento do exon 3, mostrando a deleção de uma citosina, levando a mutação p.L80Wfs*8 identificada no paciente 6 com DDS 46,XY. A) Sequência normal do exon 3, a caixa vermelha ressalta a guanina (G) que sofreu deleção. B) Sequência mutante do exon 3, mostrando a alteração no código de leitura decorrente da deleção de C. C) Alinhamento mostrando a formação de códon de parada prematura na proteína.

5. Mutação p.Ser32Asn

Identificou-se a troca c.95G>A em heterozigose no paciente 7 (FIGURA 26). Esta substituição nucleotídica se localiza no exon 2 e leva à mutação p.Ser32Asn. O paciente 5 foi encaminhado aos médicos com 30 meses de idade com genitália ambígua, apresentava grau de Prader II e dois testículos disgenéticos com derivados de Muller, localizados na região inguinal; foi diagnosticado com disgenesia gonadal parcial 46,XY. Como seus pais já são falecidos não foi possível verificar se a mutação foi herdada ou não.

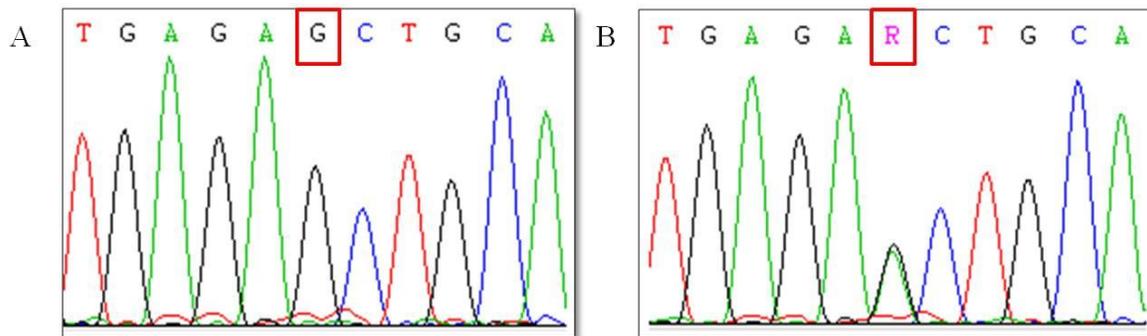


FIGURA 26: Parte dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento do exon 2, mostrando a substituição em heterozigose de uma guanina por uma adenina, levando a mutação p.Ser32Asn identificada no paciente 7 com DG Parcial 46,XY. A) Sequência normal do exon 2, a caixa vermelha ressalta a guanina (G) na qual ocorreu a troca. B) Sequência mutante do exon 2, mostrando a troca em heterozigose de G para A (R).

Em relação à proteína, a substituição de uma serina no resíduo 32 por uma asparagina está localizada no primeiro dedo de zinco da região de DBD. Neste caso, ambos os aminoácidos envolvidos são neutros e polares (FIGURA 27A), indicando que a troca não muda significativamente as propriedades físicoquímicas do resíduo. A serina, no entanto, é um dos três resíduos, assim como a tirosina, a ser fosforilado por quinases para a sinalização celular, enquanto a asparagina tem como característica de sua cadeia lateral, a capacidade de formar pontes de hidrogênio com peptídeos vizinhos e está frequentemente presente nas proximidades do início e do final de regiões de alfa-hélices (Betts & Russel, 2003).

Através de alinhamento de SF-1 de várias espécies de mamíferos no *Clustal* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), pode-se verificar que a serina da posição 32 é altamente conservada (FIGURA 27B).

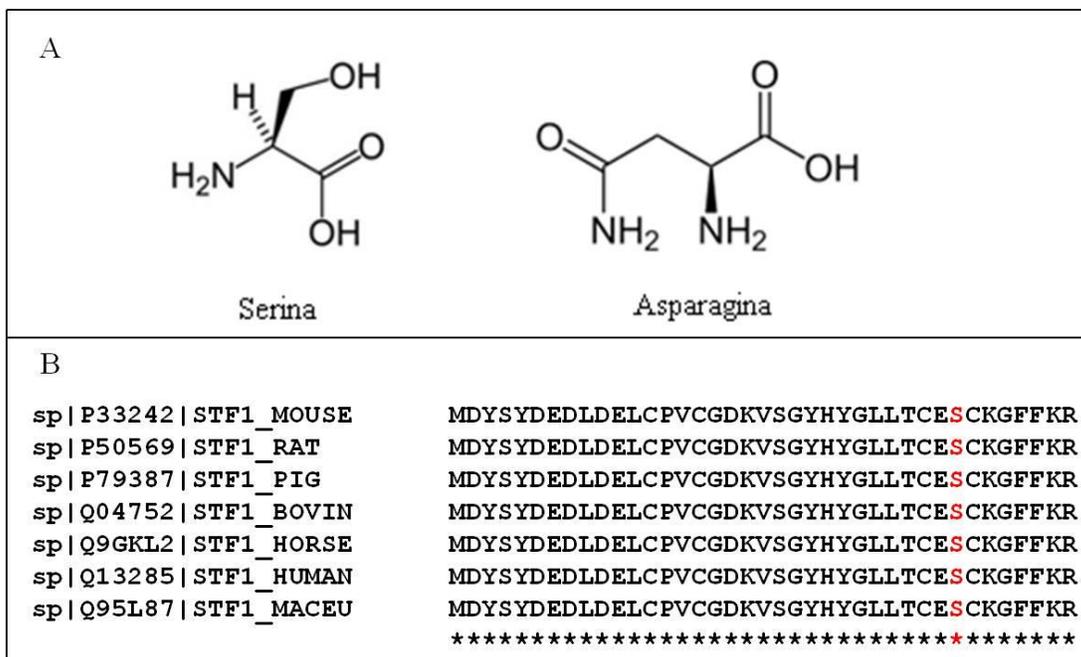


FIGURA 27: A) Estruturas dos aminoácidos serina e asparagina, os quais foram trocados levando a mutação p.Ser32Asn. B) Alinhamento da serina da posição 32, mostrando sua conservação entre as espécies de mamíferos.

Usando o PDB: 2FF0 – cadeia A como molde, foi realizada a análise estrutural para esta mutação. Foi possível verificar que a serina do resíduo 32 (S32) na proteína normal estabelecia uma ponte de hidrogênio com a fenilalanina do resíduo 36 (F36) e outra ponte de hidrogênio com a arginina do resíduo 69 (R69) (FIGURA 28A). Já na proteína mutante, a asparagina do resíduo 32 (N32) manteve as interações com F36 na mesma distância, perdeu o contato com R69, e estabeleceu uma nova ponte de hidrogênio com o aspartato da posição 19 (D19), indicando provavelmente uma mudança conformacional (FIGURA 28B).

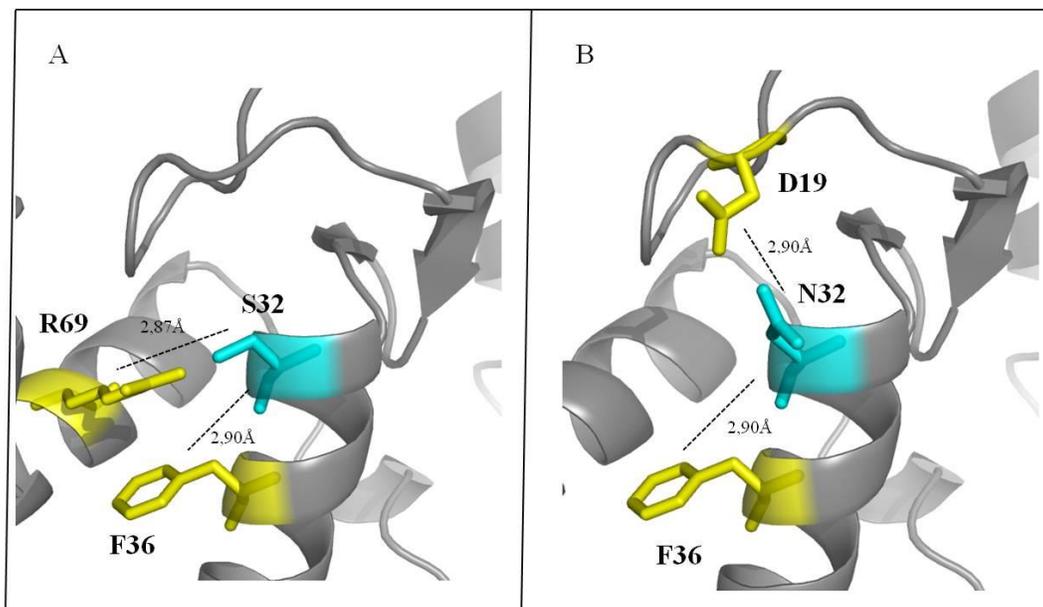


FIGURA 28: Análise estrutural da mutação p.Ser32Asn. A) Contatos internos da proteína normal; S32 estabelece ponte de hidrogênio com R69 e com F36. B) Contatos internos da proteína mutante; N32 mantém contato interno com F36 com a mesma distância, perde contato interno com R69, porém estabelece uma nova ponte de hidrogênio com D19.

Usando as ferramentas computacionais PolyPhen, SIFT e Aling-GVGD as análises de predição para avaliar se a troca do aminoácido é prejudicial ou não, foram realizadas. Como resultados, obtivemos:

PolyPhen = 0,067 – Considerada tolerável

SIFT = 0,02 - Considerada deletéria

Aling-GVGD = GV = 0, GD = 46,42 e Classe C45 – Considerada deletéria

Estes valores se contradizem, pois segundo o PolyPhen a mutação pode ser considerada tolerável (valor próximo a 0), enquanto que para o SIFT e Aling-GVGD, é considerada prejudicial e causadora de fenótipo. Ambas as ferramentas são de predição e não oferecem 100% de precisão, o que poderia explicar esta diferença entre os valores. Ng & Henikoff, (2006) relataram um caso semelhante, em que considerou como correto o valor obtido pelo SIFT, justificando que a análise estrutural que o PolyPhen gera pode ter

atrapalhado a predição, considerando-a tolerável. Além disso, Sunyaev *et al.* (2001), estudaram alguns casos SNPs de resultados falsos positivos e falsos negativos gerados pelo PolyPhen, observando a análise estrutural que o programa oferecia; para este grupo, independente do resultado gerado pela ferramenta, uma troca de aminoácido afeta a função ou a estrutura da proteína quando: (I) afeta um sítio de ligação, de ativação, ou envolvido em pontes dissulfetos; (II) a variação na determinada posição não é encontrada em nenhuma proteína homóloga; (III) a variação provavelmente quebra o núcleo hidrofóbico da proteína; (IV) a variação gera uma troca na carga elétrica; (V) a variação aparenta afetar a solubilidade da proteína; (VI) a variação envolve um resíduo de prolina na α hélice; (VII) a variação prevê afetar a interação proteína-ligante (Sunyaev *et al.*, 2001).

Através da modelo estrutural gerado pelo programa PolyPhen (FIGURA 29), é possível perceber, que mesmo esta alteração sendo considerada neutra, ela provavelmente é um resultado falso negativo, pois se enquadra no item I proposto por Sunyaev *et al.* (2001); a mutação afeta diretamente um sítio de ligação ao DNA, podendo estar atrapalhando esta interação DNA-proteína.

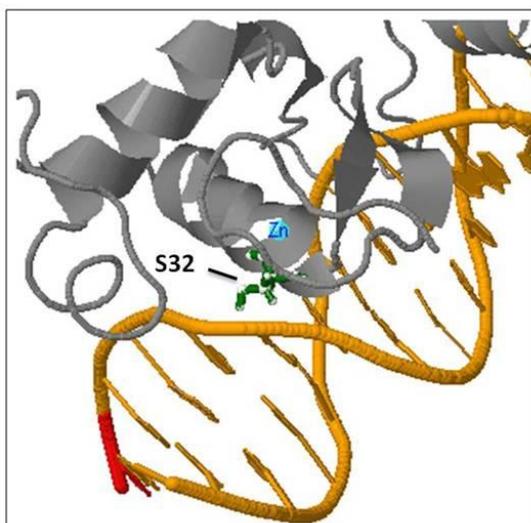


FIGURA 29: A) Análise estrutural mostrando a interação da proteína com o DNA. A serina mutada da posição 32 se encontra diretamente no domínio de ligação ao DNA, próximo a o átomo de zinco. Esta alteração provavelmente resulta em danos na formação do complexo DNA-proteína.

Para descartar a possibilidade de polimorfismo, 96 controles saudáveis (192 alelos) foram sequenciados, ficando demonstrado que nenhum apresenta o alelo mutante (FIGURA 30).

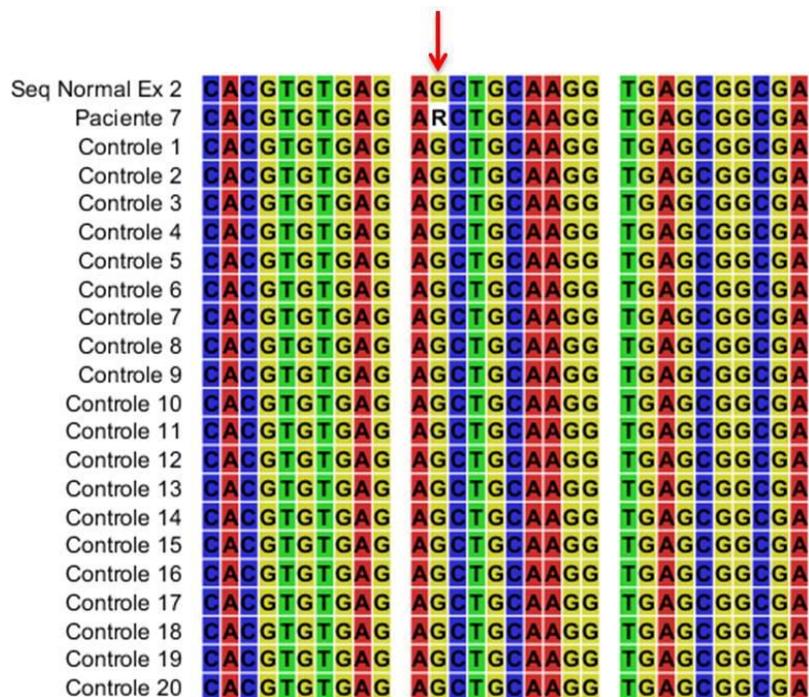


FIGURA 30: Alinhamento no programa CLC sequence viewer 6.0 das seqüências obtidas no sequenciamento do exon 2 de 20 controles saudáveis ressaltando a posição da troca c.95G>A p.Ser32Asn. O paciente foi o único que apresentou o alelo mutante. Este teste foi realizado para outros 76 controles, sendo todos homozigotos do alelo G normal.

Não há relatos de mutação no aminoácido S32, mas assim como a p.Ser32Asn, Camats *et al.* (2012) descreveram recentemente 4 novas mutações (p.Val20Leu, p.His24Tir, p.His24Trefs*51 e p.Cis30Trp) localizadas no primeiro dedo de zinco da região do domínio de ligação ao DNA, em casos de falência ovariana precoce e DDS. Para estas mutações o grupo realizou análises funcionais, demonstrando que todas elas estão na região de interação direta com o DNA, alterando assim, o reconhecimento DNA-proteína.

Também vale a pena ressaltar que a primeira mutação descrita no gene *NR5A1* (p.Gli35Glu) foi descrita no aminoácido 35, que assim como a serina 32 se encontra na

região *P-box* (FIGURA 31), que se liga ao zinco, formando o primeiro dedo de zinco do domínio de ligação ao DNA. A mutação p.Gli35Glu afetou a função da proteína SF-1 acarretando em um fenótipo bastante grave, com insuficiência adrenal, disgenesia gonadal e persistência dos dutos Müllermanos no indivíduo; este fato leva a crer que uma mutação nesta mesma região, em um aminoácido próximo (S32) deverá prejudicar as funções proteicas normais. A região *P-box*, juntamente com a *A-box*, são responsáveis por estabilizar a interação do DNA a proteína, além de definirem a especificidade de se ligar ao DNA como um monômero (Hoivik *et al.*, 2010).

Mais um fato pode contribuir para a hipótese de que a mutação p.Ser32Asn causa danos a proteína formada: perto da região onde houve a troca, a lisina 34 sofre acetilação (FIGURA 31), e uma mutação próxima a este sitio pode resultar em falhas no processo de transativação, na estabilidade da proteína, nas interações com outras proteínas e no reconhecimento do DNA (Jacob *et al.*, 2001).

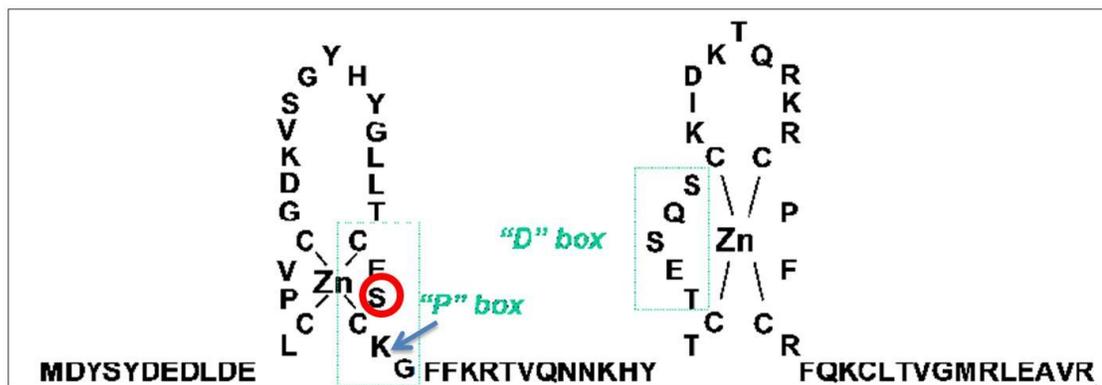


FIGURA 31: Esquema dos dois dedos de zinco localizados no domínio de ligação ao DNA. A serina 32, destacada em vermelho, se encontra dentro do domínio *P-box* que interage com o zinco. Além disso, a lisina na posição 34 (seta azul), que também se encontra na mesma região, sofre acetilação (Adaptado Wu *et al.*, 2012).

Considerando os relatos existentes na literatura de outras mutações na mesma região, a posição no dedo de zinco que a serina se encontra, o fato de que nenhum outro controle

apresentou o alelo mutante, e o quadro clínico que o paciente 7 apresenta, é possível inferir que a mutação p.Ser32Asn seja realmente responsável por causar o fenótipo de DDS no indivíduo.

6. Mutação p.Cis247*

Foi identificada a troca c.741C>A em heterozigose no exon 4 do gene *NR5A1* do paciente 8 com DDS 46,XY (FIGURA 32). O resultado putativo desta alteração é a formação de um códon de parada de síntese protéica no resíduo 247 da proteína, configurando a mutação *nonsense* p.Cis247*. Neste caso novamente não se pode verificar se foi herdada ou não, pois não foi possível realizar a análise dos pais.

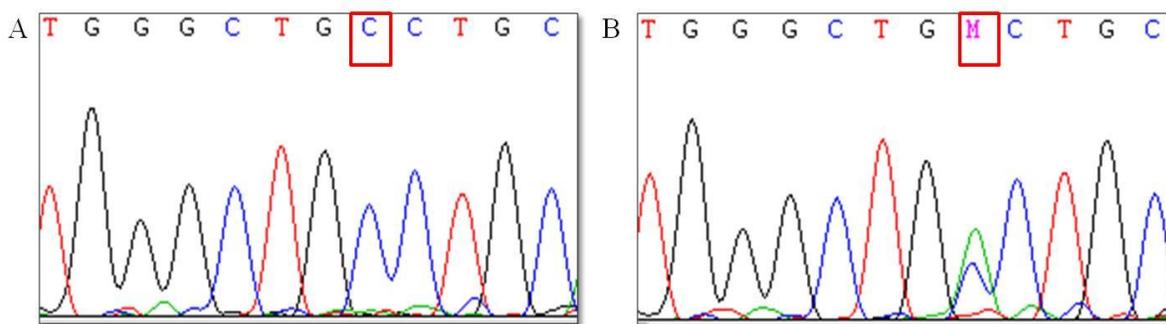


FIGURA 32: Parte dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento do exon 4, mostrando a substituição em heterozigose de uma citosina por uma adenina (c.741C>A), levando à mutação p.Cis247* identificada no paciente 8 com DDS 46,XY. A) Sequência normal do exon 4, a caixa vermelha ressalta a citosina (C) na qual ocorreu a troca. B) Sequência mutante do exon 4, mostrando a troca em heterozigose de C para A (M).

O códon de parada prematuro de síntese protéica no resíduo 247 no início do domínio de ligação ao ligante (LBD) fica nas proximidades de um sítio de fosforilação, e apesar de

nenhuma alteração ter sido descrita neste aminoácido, mutações neste sítio reduzem a capacidade de interação com cofatores, atrapalhando a atividade pós-transcricional do gene (Hammer *et al.*, 1999).

Para a mutação p.Cis247* as análises *in silico* da proteína truncada mutante e de frequência em indivíduos saudáveis foram dispensadas, pois se trata de uma mutação *nonsense*, localizada aproximadamente no meio da proteína que, muito provavelmente, não será produzida porque seu mRNA poderá ser degradado pelo processo de *nonsense mRNA decay* antes mesmo da tradução.

Além desta mutação, o paciente 8 é um dos que apresentou o polimorfismo p.Gli146Ala, o que pode ter contribuído para a formação de seu fenótipo, como já citado anteriormente.

7. Mutações p.Asp364Trefs*18 e c.-133G>A

Foram identificadas duas mutações no paciente 9 com DDS 46,XY. A primeira, p.Asp364Trefs*18, é decorrente da deleção da guanina c.1089 no exon 6 (FIGURA 33A e 33B). Este nucleotídeo corresponde à primeira posição do códon 364 e sua deleção substitui o ácido aspártico natural deste resíduo por uma treonina levando à alteração no quadro de leitura, com formação de um códon de parada prematura da síntese protéica no códon 381, isto é, 17 resíduos à frente (FIGURA 33C e 33D).

Embora esta mutação cause um truncamento da proteína, este truncamento se dá no terço final dentro do domínio de ligação ao ligante. Este fato faz com que se suponha sua tradução, escapando da degradação por *nonsense mRNA decay*. Assim, seu efeito funcional deverá ser investigado com maior profundidade.

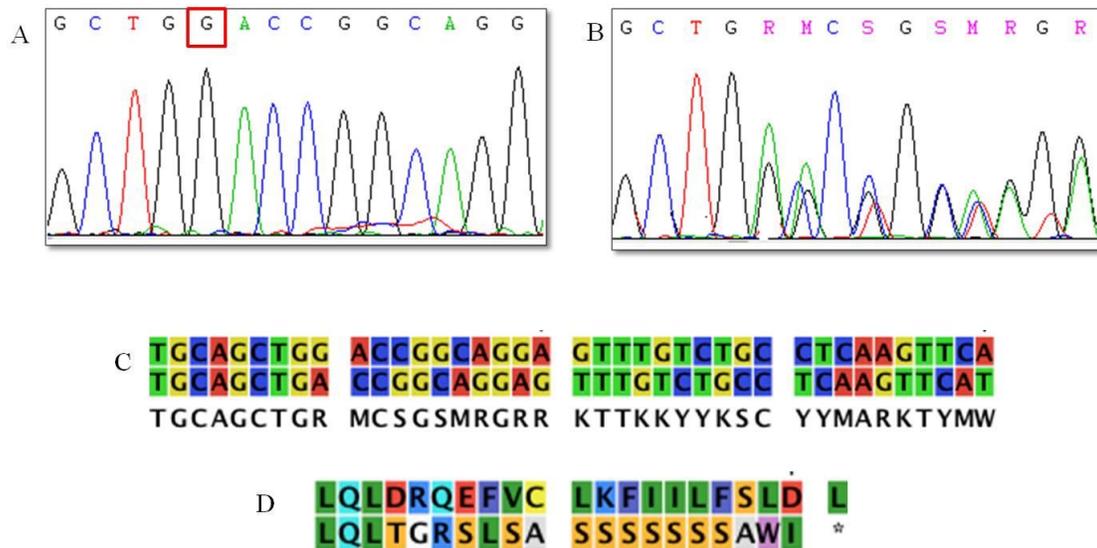


FIGURA 33: Parte dos eletroferogramas e alinhamentos obtidos no sequenciamento do exon 6, mostrando a deleção de uma guanina, levando a mutação p.Asp364Trefs*18 identificada no paciente 9 com DDS 46,XY. A) Sequência normal do exon 6, a caixa vermelha ressalta a guanina (G) que sofreu deleção. B) Sequência mutante do exon 6, mostrando a alteração no código de leitura decorrente da deleção de G. C) Alinhamento mostrando a deleção de uma guanina na posição 364. D) Alinhamento mostrando a formação de códon de parada prematura na proteína.

A segunda alteração identificada no mesmo paciente foi a substituição em heterozigose de uma guanina por uma adenina c.-133G>A no exon 1 (FIGURA 34). Apesar do exon 1 não ser traduzido, ele é transcrito, e esta alteração pode afetar o processo de tradução de tal forma que haja uma correlação com o fenótipo do indivíduo.

No gene *NR5A1*, já foram identificados entre humanos, ratos e camundongos, cinco diferentes exons 1 (Ia, Io, Ig, Ix e II), que variam de acordo com cada transcrito, em espécies e tecidos específicos. A alteração c.-133G>A se localiza no primeiro exon 1 (Ia), que segundo Kimura *et al.* (2000), é expresso em ratos e camundongos nos tecidos esteroideogênicos e no fígado no período fetal e adulto, e no hipotálamo e pituitária apenas no período adulto. É provável que nem todos esses exons sejam expressos em humanos, mas neste caso, considerando os tecidos que o SF-1 é expresso, o exon 1-Ia de humanos deve ser homólogo ao encontrado em ratos e camundongos.

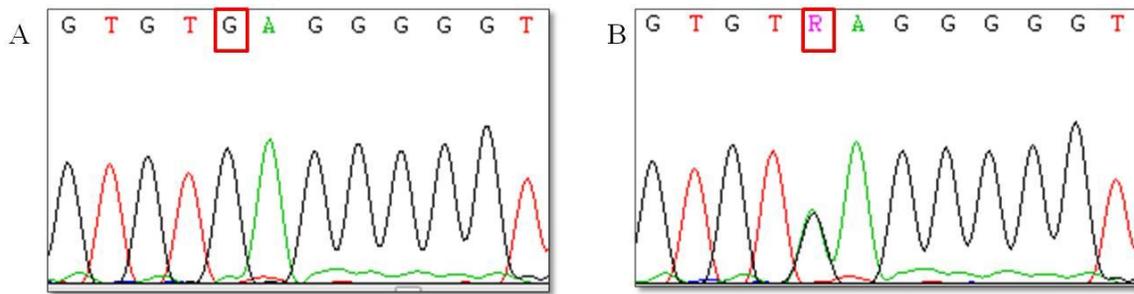


FIGURA 34: Parte dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento do exon 1, mostrando a substituição em heterozigose de uma guanina por uma adenina, levando a segunda alteração c.-133G>A identificada no paciente 9 com DDS 46,XY. A) Sequência normal do exon 1, a caixa vermelha ressalta a guanina (G) na qual ocorreu a troca. B) Sequência mutante do exon 1, mostrando a troca em heterozigose de G para A (R).

Como a alteração está localizada em região não traduzida, foram realizadas análises *in silico* utilizando-se o programa *AliBaba2 Gene Regulation* (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>) que avalia a existência de motivos reguladores, isto é locais onde podem se ligar os fatores de transcrição mais comuns. Através desta análise, foi possível averiguar que a região onde ocorreu a troca se localiza em sítio de reconhecimento para o fator de transcrição Sp1, e quando ocorre a alteração, este sítio é abolido (FIGURA 35).



FIGURA 35: Análise *in silico* para alteração c.133G>A no paciente 9. A) Guanina (G) da sequência normal está localizada em um sítio de reconhecimento para o fator de transcrição Sp1 (triângulo verde). B) Sequência do paciente mutante, mostrando que a substituição de uma guanina por uma adenina, fez abolir o sítio para Sp1.

Através da técnica de PCR alelo-específica, para descartar a possibilidade de polimorfismo, um grupo controle de 97 indivíduos saudáveis (194 alelos) foram testados para esta alteração, mostrando que nenhum outro indivíduo apresentou o alelo mutante (FIGURA 36).

O material dos pais não foi obtido, não sendo possível verificar a segregação alélica nesta família.

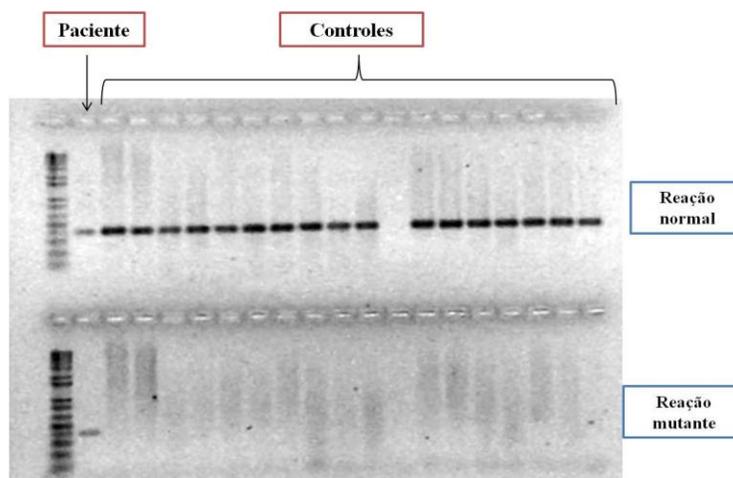


FIGURA 36: Teste de PCR alelo-específica para a alteração c.-133G>A em gel de agarose 1%. No primeiro poço foi colocado o marcador molecular (*Ladder 1kb Plus*), no segundo está o produto da reação de PCR para o paciente, e nos outros 18 estão os controles saudáveis; como a alteração é em heterozigose, para a reação normal todos amplificaram, já para a reação mutante apenas o paciente portador do alelo mutante amplificou. Esse teste foi repetido para mais 79 controles.

Tantaway *et al.* (2012) descreveu recentemente duas mutações também no domínio de ligação ao ligante do gene *NR5A1* (p.Gli328Val e p.Leu376Phe) em dois indivíduos com DDS 46,XY; ambas as mutações diminuíram a atividade da proteína, porém mantiveram os níveis de testosterona normais durante a puberdade. Em relação à mutação aqui identificada, a primeira substituição se localiza antes do início da modificação da proteína mutante e a segunda está em 6 resíduos anteriores ao truncamento, e na proteína mutante o resíduo L376 foi trocado para S376. Embora pouco se possa afirmar quanto ao efeito

funcional da mutação p.Asp364Trefs*18 sem se realizar os estudos funcionais de transativação, pode-se inferir que a mutação trará sérios prejuízos ao papel normal do receptor nuclear.

Nenhuma alteração havia sido identificada no paciente 9 em estudos anteriores para os genes do receptor de andrógeno e da enzima 5 alfa-redutase tipo 2. Com o estudo do gene *NR5A1*, 2 mutações importantes foram identificadas; a primeira levando a um códon de parada prematuro, e a segunda apesar de não estar na região traduzida, pode ter afetado a tradução da proteína, e obviamente se trata de uma alteração rara, pois não foi identificada em nenhum outro controle. Na ausência da análise dos pais não se pode afirmar a heterozigose composta para o genótipo, no entanto, a heterozigose composta ou mesmo a associação dessas alterações em um único alelo, deve ser causadora do fenótipo de DDS no indivíduo.

8. Mutação c.1138+1G>T

Identificou-se a mutação c.1138+1G>T (anteriormente designada IVS6+1G>T) em heterozigose no paciente 10 com disgenesia gonadal parcial 46,XY. A mutação ocorre na região de *splicing*, na primeira guanina do intron, no final do exon 6. A mutação não foi encontrada nos pais, se caracterizando como uma mutação *de novo* (FIGURA 37).

Esta mutação altera de GT para GG no intron 6 o sítio doador de *splicing* que é quase invariável nos genes humanos. Deve provavelmente suprimir o *splicing* normal, de modo que possa ativar um sítio de *splicing* crítico em outra região do exon ou intron próximos à troca nucleotídica, ou conduzir ao *skipping* do exon 6. De qualquer forma, supõe-se que irá alterar drasticamente as funções protéicas normais.

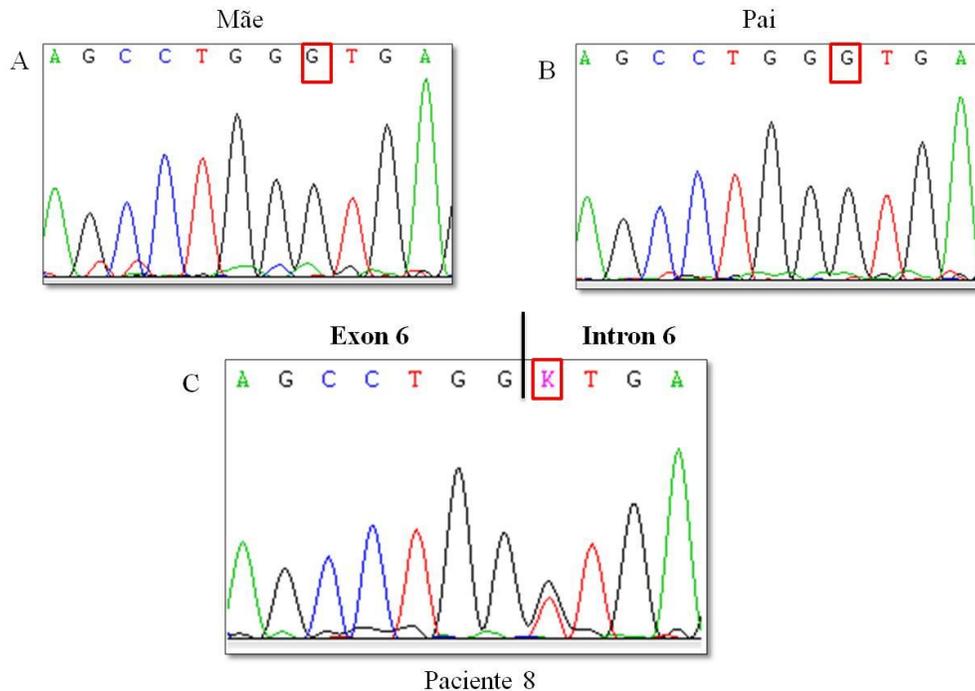


FIGURA 37: Parte dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento do exon 6 - intron 6, mostrando a substituição em heterozigose de uma guanina por uma timina, levando a mutação *de novo* c.1138+1G>T identificada no paciente 10 com DG Parcial 46,XY; a caixa vermelha ressalta a guanina (G) na qual ocorreu a substituição. A) Sequência normal do exon 6 - intron 6 da mãe do paciente 8. B) Sequência normal do exon 6 - intron 6 da pai do paciente 10. C) Sequência mutante do exon 6 - intron 6, mostrando a troca em heterozigose de G para T (K) na primeira guanina do intron 6.

Apesar de ser uma região bastante conservada, foi realizado o sequenciamento de 70 indivíduos saudáveis (140 alelos) usados como controle, dentre eles, nenhum apresentou o alelo mutante, o que reforça ainda mais a hipótese de que a mutação está relacionada ao fenótipo de disgenesia gonadal parcial do paciente 10 (FIGURA 38).

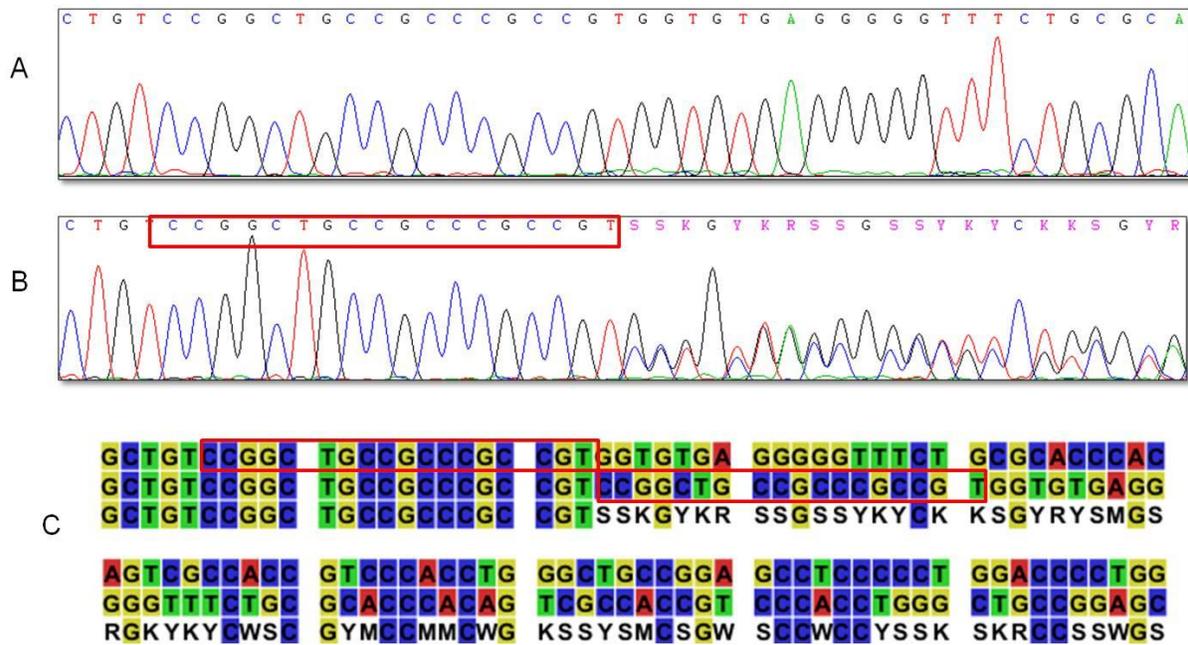


FIGURA 39: Parte dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento do exon 1, mostrando a duplicação de 18 pb levando alteração c.-156_-136ins18pb identificada no paciente 11 DG Pura 46,XY. A) Sequência normal do exon 1. B) Sequência mutante do exon 1, mostrando os 18 nucleotídeos que foram duplicados (caixa vermelha). C) Alinhamento da sequência do exon 1, na qual a primeira linha corresponde a sequência normal e a segunda a sequência do paciente 11, as 18 bases destacadas duplicaram, alterando o código de leitura e empurrando a sequência toda para a frente.

Foram realizadas análises *in silico* utilizando-se o programa *AliBaba2 Gene Regulation*. Através desta análise, foi possível averiguar que a região onde ocorreu a duplicação de 18 pb se localiza em um sítio de reconhecimento para o fator de transcrição Sp1, e uma vez que ocorre a duplicação, mais dois sítios de reconhecimento para este fator são incluídos (FIGURA 40).

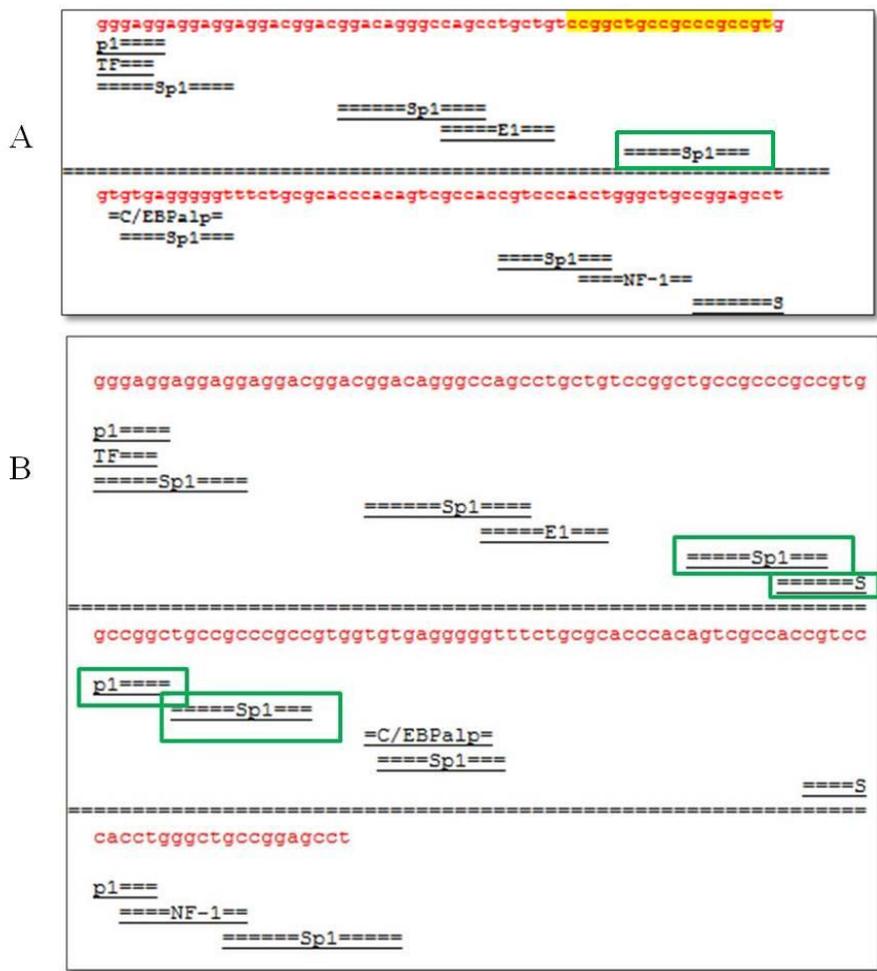


FIGURA 40: Análise in silico para alteração c.-156_-136ins18pb no paciente 11. A) Os 18 nucleotídeos duplicados da sequência normal estão localizados em um sítio de reconhecimento para o fator de transcrição Sp1 (triângulo verde). B) Sequência do paciente mutante, mostrando que a duplicação criou outros 2 sítios para Sp1, empurrando toda a sequência para a frente.

Apesar de ser difícil afirmar que esta inserção está relacionada com o fenótipo do paciente 11 sem estudos funcionais, como discutido anteriormente, mutações no exon 1 podem afetar o processo de tradução diminuindo ou anulando a produção protéica nos tecidos adequados. Além disso, este paciente é um dos que apresentou o polimorfismo p.Gli146Ala, o que pode ter contribuído para a formação de seu fenótipo.

10. Alterações c.-208C>A e alteração c.-413G>A

Duas alterações foram encontradas no paciente 12 com disgenesia gonadal parcial 46,XY. A primeira identificada, c.-413G>A, levou à troca de uma guanina por uma adenina na região 5'UTR do gene *NR5A1* (FIGURA 41).

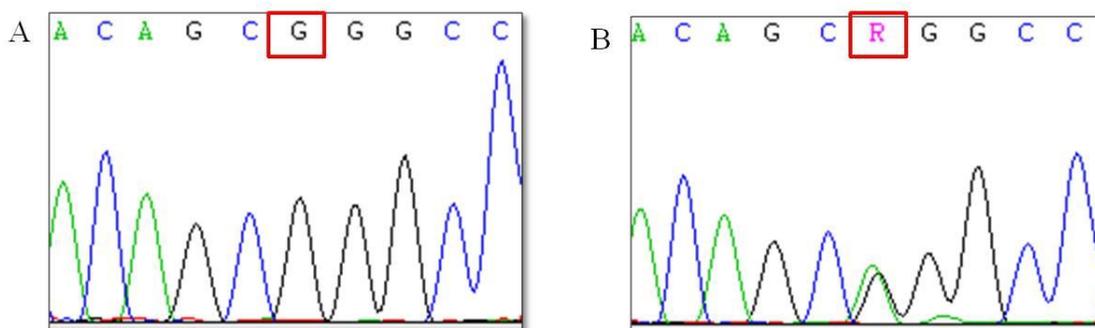


FIGURA 41: Parte dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento da região 5'UTR, mostrando a substituição em heterozigose de uma guanina por uma adenina, levando a alteração c.-413G>A identificada no paciente 12 com DG Parcial 46,XY. A) Sequência normal da região 5'UTR, a caixa vermelha ressalta a guanina (G) na qual ocorreu a troca. B) Sequência mutante da região 5'UTR, mostrando a troca em heterozigose de G para A (R).

Foram realizadas análises *in silico* utilizando-se o programa *AliBaba2 Gene Regulation*, verificando que a alteração c.-413G>A se encontra em um sítio de reconhecimento para o fator de transcrição Sp1, e quando ocorreu à troca de nucleotídeo, este sítio foi abolido (FIGURA 42).

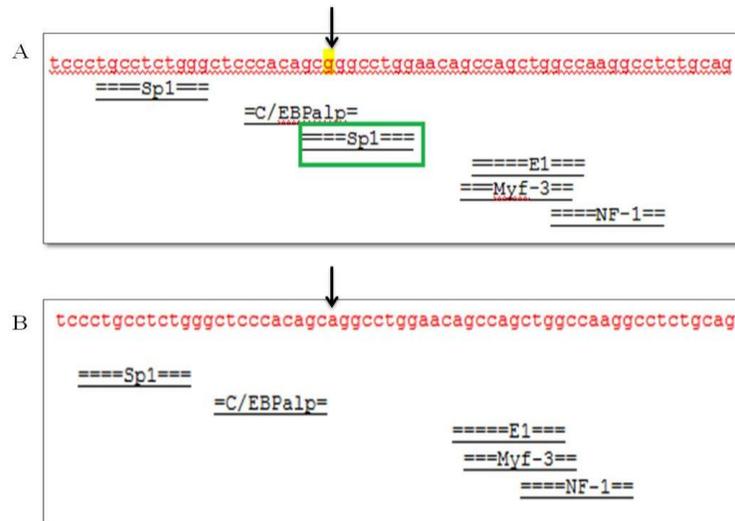


FIGURA 42: Análise *in silico* para alteração c.-413G>A no paciente 12. A) Guanina (G) da sequência normal está localizada em um sítio de reconhecimento para o fator de transcrição Sp1 (triângulo verde). B) Sequência do paciente mutante, mostrando que a substituição de uma guanina por uma adenina, fez abolir o sítio para Sp1.

Para descartar a hipótese de polimorfismo 96 controles saudáveis (192 alelos) foram testados, e nenhum deles apresentou o alelo mutante (FIGURA 43).

Seq Normal 5'UTR	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Paciente 12	GGG	CTCCCAC	AG	RGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 1	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 2	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 3	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 4	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 5	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 6	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 7	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 8	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 9	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 10	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 11	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 12	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 13	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 14	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 15	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 16	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 17	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 18	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 19	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG
Controle 20	GGG	CTCCCAC	AG	CGGG	CTG	GAA	CAGCCAG

FIGURA 43: Alinhamento no programa CLC sequence viewer 6.0 das sequências obtidas no sequenciamento do fragmento 5'UTR de 20 controles saudáveis ressaltando a posição da troca c.-413G>A. O paciente foi o único que apresentou o alelo mutante. Este teste foi realizado para outros 76 controles, sendo todos homozigotos do alelo G normal.

A segunda alteração encontrada no paciente 12 foi a c.-208C>A que levou a uma troca de uma citosina por uma adenina também na região 5'UTR do gene (FIGURA 44).

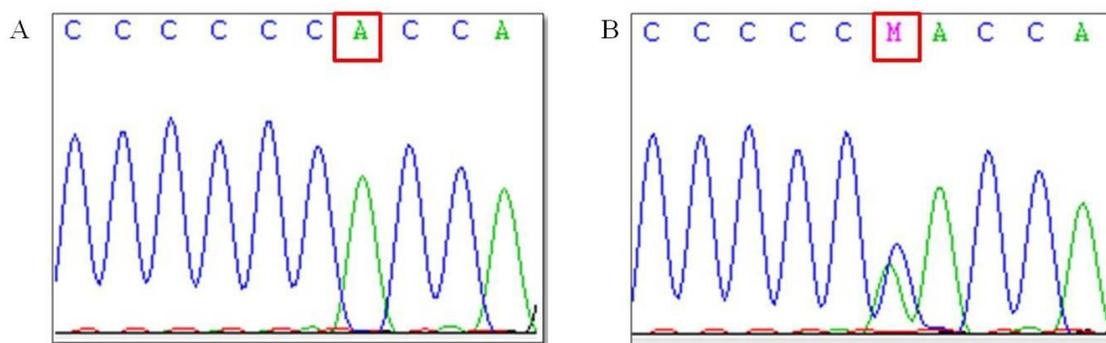


FIGURA 44: Parte dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento da região 5'UTR, mostrando a substituição em heterozigose de uma citosina por uma adenina, levando a segunda alteração c.-208C>A identificada no paciente 12 com DG Parcial 46,XY. A) Sequência normal da região 5'UTR, a caixa vermelha ressalta a citosina (C) na qual ocorreu a troca. B) Sequência mutante da região 5'UTR, mostrando a troca em heterozigose de C para A (M).

Para esta alteração as análises *in silico* também foram realizadas, mostrando que a região onde ocorreu a troca nucleotídica, assim como na primeira, se localiza em um sítio de reconhecimento para o fator de transcrição Sp1. Neste caso, com a substituição, o sítio para Sp1 foi mantido, porém sítios para outros fatores de reconhecimento foram perdidos (FIGURA 45).

Apesar do sítio de reconhecimento para Sp1 ter sido mantido, a alteração pode ser considerada rara, pois através de PCR alelo-específica, um grupo controle de 98 indivíduos saudáveis (196 alelos) foi testado, e nenhum outro apresentou este alelo mutante (FIGURA 46).

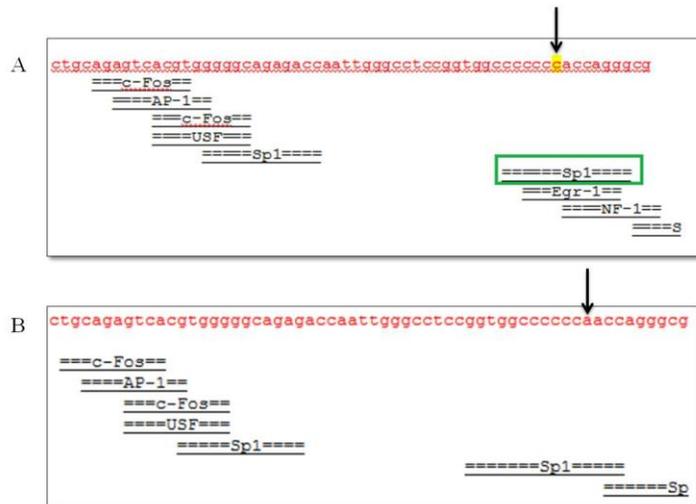


FIGURA 45: Análise *in silico* para alteração c.-208C>A no paciente 12. A) Citosina (C) da sequência normal está localizada em um sítio de reconhecimento para o fator de transcrição Sp1 (triângulo verde). B) Sequência do paciente mutante, a substituição de uma citosina por uma adenina, mantém o sítio para Sp1, porém perde sítios para outros fatores de reconhecimento (Egr-1 e NR-1).

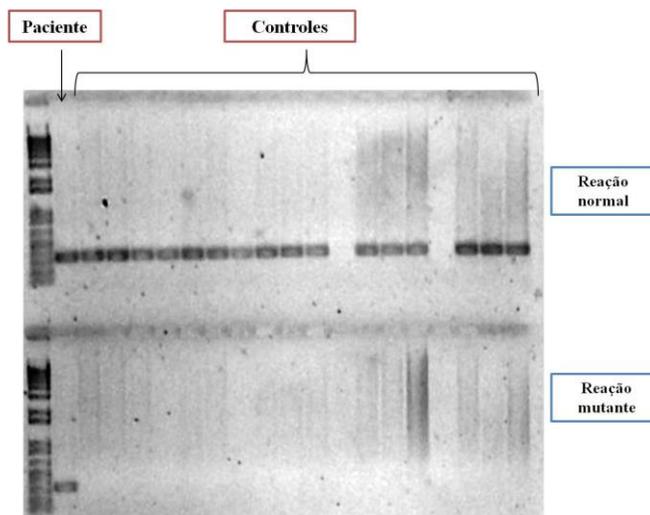


FIGURA 46: Teste de PCR alelo-específica para a alteração c.-208C>A em gel de agarose 1%. No primeiro poço foi colocado o marcador molecular (*Ladder 1kb Plus*), no segundo está o produto da reação de PCR para o paciente, e nos outros 18 estão os controles saudáveis; como a alteração é em heterozigose, para a reação normal todos amplificaram, já para a reação mutante apenas o paciente portador do alelo mutante amplificou. Esse teste foi repetido para mais 80 controles.

O fator de transcrição Sp1 é uma proteína de ligação ao DNA que interage com sítios ricos em GC, é um dos fatores mais abundantes que ativam a transcrição formando um complexo com a enzima RNA polimerase II (Bucher, 1990). Sp1 regula a atividade de um grande número de promotores e possui dois domínios de transativação que são importantes para a atividade de transcrição, superativação e ação sinérgica de outras moléculas de Sp1 ou outros fatores de transcrição (Pascal & Tjian, 1991). Por esta razão, uma mutação neste sítio de transcrição pode afetar a tradução da proteína normal.

O paciente 12 apresentou 2 alterações na região 5'UTR, e apesar de apenas uma delas abolir o sítio para Sp1, ambas se encontram na região promotora do gene, podendo assim, estar diretamente relacionada ao fenótipo de disgenesia gonadal parcial do indivíduo.

11. Alteração c.-762C>T

Identificou-se a alteração c.-762C>T em heterozigose no paciente 13 com DDS 46,XY, levando a uma substituição de uma citosina por uma timina na região 5'UTR do gene (FIGURA 47).

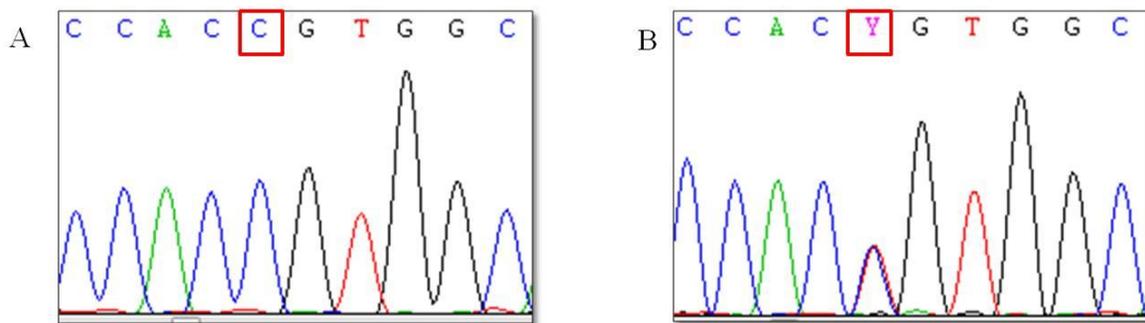


FIGURA 47: Parte dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento da região 5'UTR, mostrando a substituição em heterozigose de uma citosina por uma timina, levando a alteração c.-762C>T identificada no paciente 13 com DDS 46,XY. A) Sequência normal da região 5'UTR, a caixa vermelha ressalta a citosina (C) na qual ocorreu a troca. B) Sequência mutante da região 5'UTR, mostrando a troca em heterozigose de C para T (Y).

As análises *in silico* foram realizadas para a mutação c.-762C>T, mostrando que a citosina que sofreu alteração, assim como nos outros casos, também se localiza em um sítio de reconhecimento para o fator de transcrição Sp1. Com a substituição por uma timina, o sítio para Sp1 foi mantido, porém outro sítio para fator de reconhecimento foi perdido (FIGURA 48).

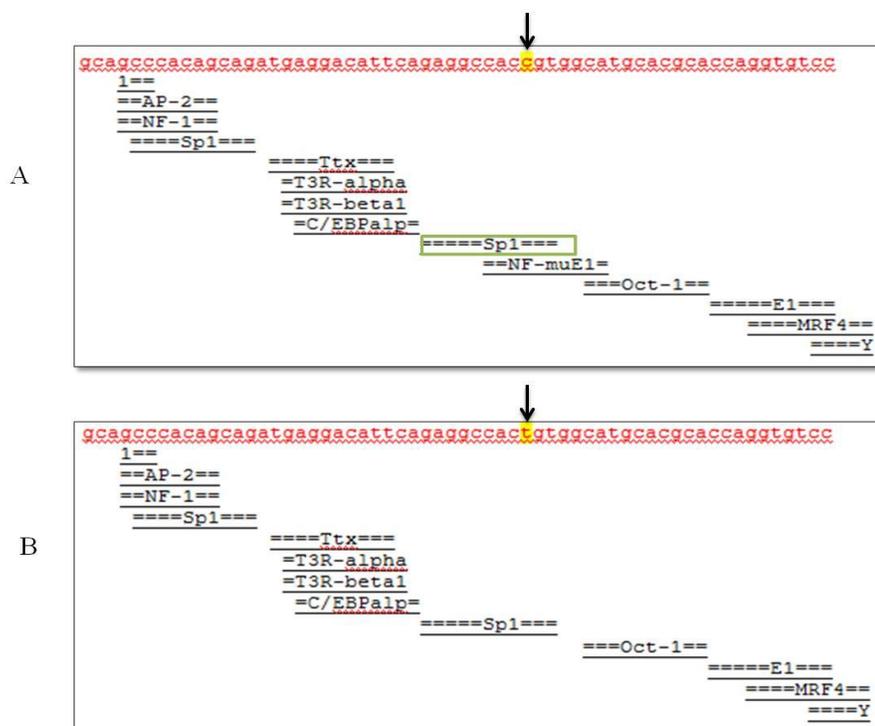


FIGURA 48: Análise *in silico* para alteração c.-762C>T no paciente 13. A) Citosina (C) da sequência normal está localizada em um sítio de reconhecimento para o fator de transcrição Sp1 (triângulo verde). B) Sequência do paciente mutante, a substituição de uma citosina por uma timina, mantém o sítio para Sp1, porém perde para fator de reconhecimento NF-muE1.

Para descartar a possibilidade de polimorfismo, foram sequenciados 96 controles saudáveis (192 alelos), mostrando que nenhum outro apresentou o alelo mutante (FIGURA 49), demonstrando que o paciente possui alelo raro. Por se tratar de uma alteração na região promotora do gene, uma proteína truncada pode ter se formado, explicando o fenótipo de DDS no paciente 13.

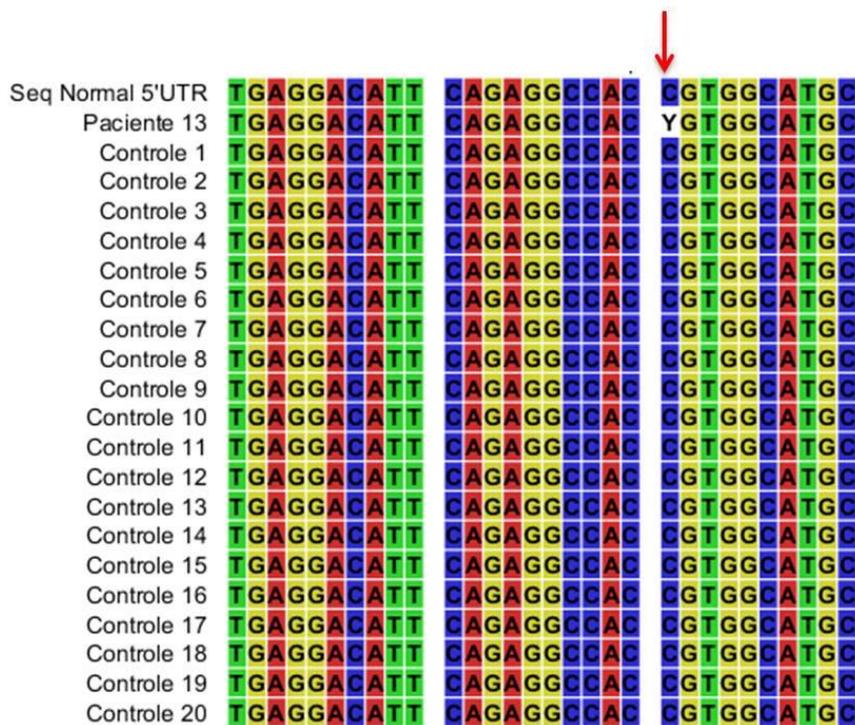


FIGURA 49: Alinhamento no programa CLC sequence viewer 6.0 das sequências obtidas no sequenciamento do fragmento 5'UTR de 20 controles saudáveis ressaltando a posição da troca c.-762C>T. O paciente foi o único que apresentou o alelo mutante. Este teste foi realizado para outros 76 controles, sendo todos homocigotos do alelo C normal.

12. Alteração c.*1286C>T

Identificou-se a alteração c.*1286C>T em heterozigose no paciente 14 com DDS 46,XY na região 3'UTR do gene *NR5A1*. Trata-se da troca de uma citosina por uma timina na posição 2870 (1286 nucleotídeos a partir do *stop códon*). A família do paciente também foi estudada, (irmão, mãe e pai) e apenas o pai apresentou a mesma alteração (FIGURA 50).

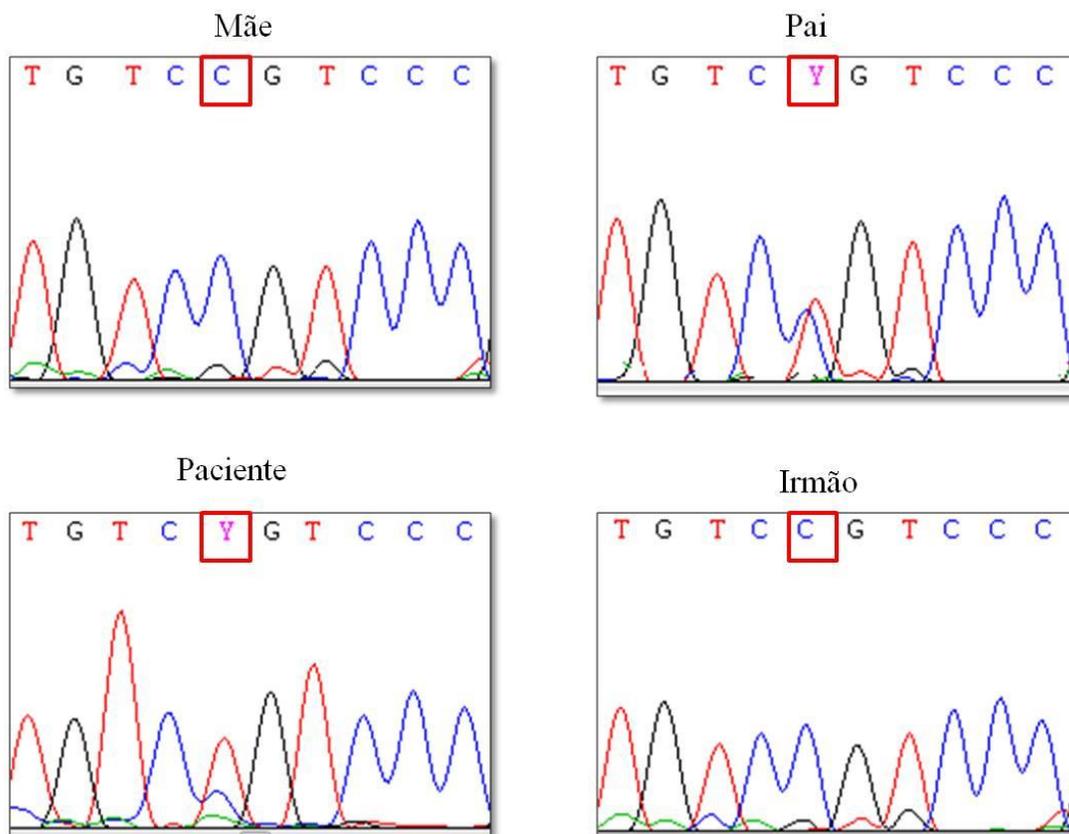


FIGURA 50: Parte dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento da região 3'UTR, mostrando a substituição em heterozigose de uma citosina por uma timina, levando a alteração c.*1286C>T identificada no paciente 14 com DDS 46,XY. A caixa vermelha ressalta a citosina (C) que sofreu a troca pela timina (Y). A alteração foi herdada do pai e o irmão não apresentou o alelo mutante.

Para descartar a possibilidade de polimorfismo, foram sequenciados 90 controles saudáveis (180 alelos), mostrando que nenhum outro apresentou o alelo mutante (FIGURA 51).

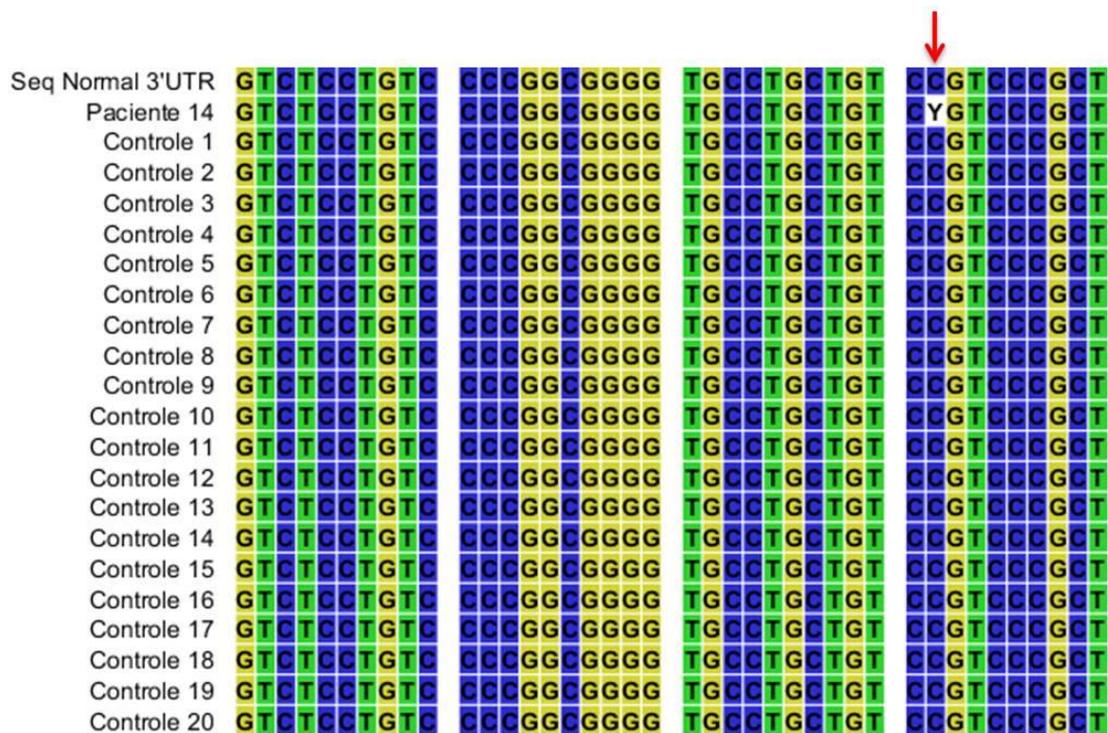


FIGURA 51: Alinhamento no programa CLC sequence viewer 6.0 das sequências obtidas no sequenciamento do fragmento 3'UTR de 20 controles saudáveis ressaltando a posição da troca c.*1286C>T. O paciente foi o único que apresentou o alelo mutante. Este teste foi realizado para outros 70 controles, sendo todos homocigotos do alelo C normal.

Como o pai do paciente 14 também carrega a mutação e não apresenta um quadro clínico de DDS, fica difícil afirmar que apenas esta alteração esteja acarretando o fenótipo do indivíduo. Maiores estudos em busca da identificação de possíveis motivos reguladores na região, ou se esta alteração leva a algum prejuízo na estabilização do mRNA, poderiam esclarecer melhor a causa deste fenótipo.

13. Polimorfismo p.Gli146Ala

A substituição de uma glicina por uma alanina no resíduo 146 (p.Gli146Ala) foi identificada em 31 dos 86 pacientes analisados. Ela se origina na troca nucleotídica de uma guanina por uma citosina no exon 4 (FIGURA 52). Por ser bastante comum, principalmente em Africanos e Asiáticos, tem sido considerado um polimorfismo (rs1110061), porém, com base no trabalho de WuQiang *et al.* (2003), verifica-se que esta alteração prejudica a capacidade de transativação da proteína, podendo também estar relacionado com uma maior susceptibilidade a doenças adrenais. Desta forma não pode ser considerada completamente neutra, e pode inclusive de alguma forma contribuir para o fenótipo nos pacientes aqui estudados.

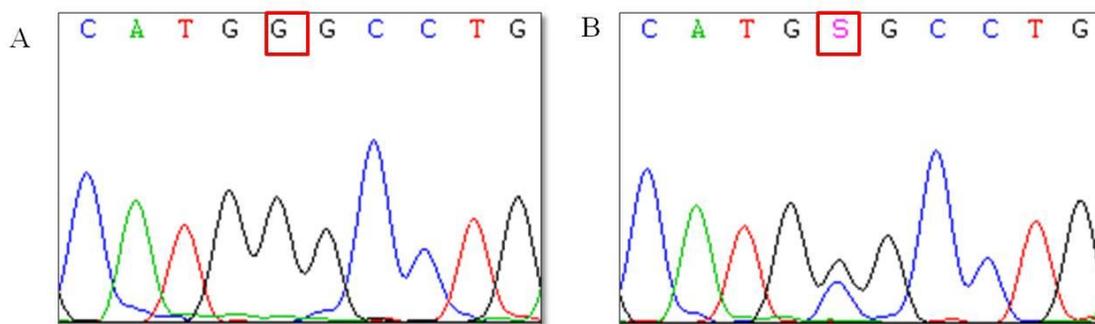


FIGURA 52: Parte dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento do exon 4, mostrando a substituição em heterozigose de uma guanina por uma citosina, levando a alteração p.Gli146Ala identificada em 31 dos 86 pacientes estudados. A) Sequência normal do exon 4, a caixa vermelha ressalta a guanina (G) na qual ocorreu a troca. B) Sequência mutante do exon 4, mostrando a troca em heterozigose de G para C (S).

14. Polimorfismos encontrados neste trabalho

No sequenciamento do gene *NR5A1*, alguns polimorfismos já descritos na literatura foram identificados nos pacientes estudados. A definição de polimorfismo difere de mutação, apenas na frequência alélica em que aparece (acima de 1% na população é considerado polimorfismo), e apesar de nem sempre estar claro quais são os efeitos que os SNPs têm sobre a proteína formada, eles não devem ser descartados, uma vez que podem ser marcadores de suscetibilidade, contribuindo para o fenótipo apresentado no indivíduo.

Neste estudo a maioria dos polimorfismos se encontram na região intrônica ou não traduzida 3'UTR (TABELA 3), e o que tem maior relato na literatura é o p.Gli146Ala (descrito anteriormente).

TABELA 3: SNPs encontrados no estudo do gene *NR5A1* em um total de 86 pacientes.

Polimorfismos (SNPs)	Localização no gene	Frequência do alelo na população*	Genótipo dos pacientes (total = 86)	Frequência do alelo nos pacientes
rs113048364 (G/A)	5'UTR	1% A, 99% G	84 (G/G), 2 (A/G), 0 (A/A)	1% A, 99% G
rs76437757 (C/T)	Intron 1	1% T, 99% C	85 (C/C), 1 (T/C), 0 (T/T)	1% T, 99% C
rs115601896 (G/T)	Intron 3	6% T, 94% G	80 (G/G), 6 (T/T), 0 (G/T)	7% T, 93% G
rs116775530 (G/A)	Intron 3	1% A, 99% G	85 (G/G), 1 (A/A), 0 (G/A)	1% A, 99% G
rs1889311 (C/T)	Intron 3	6% T, 94% C	81 (C/C), 4 (C/T), 1 (T/T)	3% T, 97% C
rs1110062 (G/A)	Exon 4	8% A, 92% G	74 (G/G), 12 (G/A), 0 (A/A)	7% A, 93% G
rs113506523 (C/T)	Exon 4	1% T, 99% C	84 (C/C), 2 (C/T), 0 (T/T)	1% T, 99% C
rs2297605 (C/T)	Intron 4	42% T, 58% C	18 (C/C), 46 (C/T), 22 (T/T)	47% C, 52% T
rs7037254 (G/A)	Intron 6	37% A, 63% G	36 (G/G), 32 (G/A), 18 (A/A)	40% A, 60% G
rs5900617 (G/-)	3'UTR	38% G, 62% -	35 (-/-), 36 (G/-), 15 (G/G)	38% G, 62% -
rs7875999 (A/G)	3'UTR	2% G, 98% A	75 (A/A), 10 (G/A), 1 (G/G)	7% G, 93% A
rs189362221 (C/A)	3'UTR	0% A, 100% C	85 (C/C), 1 (C/A), 0 (A/A)	1% A, 99% C
rs10120967 (C/T)	3'UTR	36% C, 64% T	13 (C/C), 38 (C/T), 35 (T/T)	37% C, 63% T
rs10283445 (T/C)	3'UTR	38% T, 62% C	36 (C/C), 28 (C/T), 22 (T/T)	42% T, 58% C
rs200238202 (-/A)	3'UTR	6% A, 94% -	82 (-/-), 4 (A/-), 0 (A/A)	3% A, 97% -
rs201696716 (-/C)	3'UTR	8% C, 92% -	83 (-/-), 3 (C/-), 0 (C/C)	2% C, 98% -
rs10986354 (G/A)	3'UTR	2% A, 98% G	84 (G/G), 2 (G/A), 0 (A/A)	1% A, 99% G

*Dados obtidos através do site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>

Observando a tabela, é possível perceber que as frequências alélicas deste trabalho estão de acordo com as encontradas na população em geral, algumas variam um pouco na porcentagem, porém no banco de dados este valor também varia dentre as populações.

Para os SNPs encontrados, foi utilizado a da lei do equilíbrio de Hardy e Weinberg, para verificar se as frequências alélicas estão dentro ou não da normalidade.

A lei do equilíbrio de Hardy e Weinberg, parte do pressuposto que nenhuma força evolutiva (mutação, seleção natural, migração, deriva genética) está agindo na população estudada, e por esta razão as frequências alélicas e genotípicas permanecem constantes, como se a população estivesse em estado de inércia evolutiva. Obviamente, nenhuma população humana obedece todas essas premissas necessárias para estar em equilíbrio, porém esta lei permite estabelecer um modelo de comportamento para os genes, comparando as frequências observadas ao longo das gerações com as esperadas. A partir deste cálculo, se a população estiver em equilíbrio de Hardy e Weinberg espera-se que as frequências alélicas e genotípicas permaneçam constantes ao longo das gerações; porém, se o valor observado for diferente do esperado, pode-se prever que casamentos consanguíneos ou algum outro fator evolutivo está agindo nesta população (Beiguelman, 2008).

Através do programa OEGE (*Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies*) acessado no site <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>, os cálculos necessários foram realizados.

Com exceção dos SNPs rs1889311, rs7037254, rs7875999 e rs10283445 (TABELA 4), todos os outros se encontram em equilíbrio de Hardy e Weinberg. Para os que não se enquadraram nesta lei, considera-se:

- Para os SNPs rs1889311 e rs7875999, o que pode estar levando ao desequilíbrio de Hardy e Weinberg é a presença elevada do alelo raro na população quando comparado ao número esperado;
- Nos SNPs rs7037254 e rs10283445, além do alelo raro também estar abundante, na população observada tem menos números de heterozigotos do que o esperado, e esta diferença faz com que o valor do qui-quadrado fique muito alto, levando ao desequilíbrio;

- Na população poderia estar ocorrendo um alto nível de casamentos consanguíneos, o que não parece ser o caso, pois não há registro de casamentos consanguíneos na casuística aqui considerada;
- A amostra de pacientes é muito pequena, e um grupo maior de alelos deveria ser analisado para confirmar estes valores.

Para os outros SNPs, as frequências encontradas estão dentro da normalidade.

TABELA 4: Números dos genótipos observados e esperados para os polimorfismos que se apresentaram em desequilíbrio para lei de Hardy e Weinberg.

<i>POLIMORFISMOS</i>	<i>GENÓTIPOS</i>	<i>OBSERVADO</i>	<i>ESPERADO</i>
rs1889311	C/C	81	80,1
	C/T	4	5,79
	T/T	1	0,1
rs7037254	G/G	36	31,44
	G/A	32	41,12
	A/A	18	13,44
rs7875999	A/A	75	74,42
	G/A	10	11,16
	G/G	1	0,42
rs10283445	C/C	36	29,07
	C/T	28	41,86
	T/T	22	15,07

15. Correlação fenótipo-genótipo

A correlação dos fenótipos com as mutações aqui encontradas se encontram na tabela abaixo (TABELA 5):

TABELA 5: Números de mutações encontradas entre 86 pacientes estudados. A frequência calculada mostra a porcentagem de pacientes com um determinado diagnóstico que apresentaram mutação.

Diagnóstico	Número de indivíduos (n)	Número de mutações	Frequência
DG Parcial 46,XY	18	4	22%
DG Pura 46,XY	7	1	14%
DDS 46,XY Idiopáticos	41	9	22%
Outros	20	0	0%

Dessa maneira foi possível identificar que 14% dos pacientes com DG Pura 46,XY, 22% com DG Parcial 46,XY e 22% com DDS 46,XY idiopáticos, apresentaram mutação (FIGURA 53).



FIGURA 53: Gráficos mostrando a porcentagem de pacientes que apresentaram mutação dentro de cada um dos diagnósticos.

Nos relatos sobre triagem de mutações no gene *NR5A1* nas diversas formas de DDS existentes na literatura é também possível se verificar uma variação significativa de frequência de mutações nas diferentes condições clínicas. Camats *et al.* (2012), por exemplo, encontraram 12 mutações numa triagem que incluía 102 pacientes com DDS 46,XY, DDS 47,XYY, anorquia e POF; dos 96 pacientes com DDS 46,XY, 8 deles apresentaram mutação, resultando numa frequência de mutações de 8,4%. Allali *et al.* (2011), estudaram 77 pacientes, sendo 11 de disgenesia gonadal e 66 de DDS 46,XY; nos pacientes de disgenesia gonadal, nenhuma mutação no gene *NR5A1* foi encontrada, enquanto que nos 66 de DDS 46,XY, 5 mutações foram identificadas, representando 7,6% dos casos. Philibert *et al.* (2010), relataram 5 novas mutações em 15 pacientes com DDS 46,XY, indicando uma frequência de 33% de pacientes com mutação. Köhler *et al.* (2008), estudaram 27 pacientes com DDS 46,XY, incluindo casos de disgenesia gonadal leve e severa; 5 mutações entre os 27 pacientes foram identificadas, representando 18,5% dos casos.

Como é possível observar através desses relatos, na maioria dos casos a frequência maior de mutações é observada em casos de pacientes com DDS 46,XY; no presente estudo os grupos que apresentou uma frequência de mutação mais alta também foi o de DDS 46,XY com 22%, porém com uma variação muito pequena entre o grupo dos distúrbios da diferenciação gonadal (DG Parcial 46,XY e DG Pura 46,XY) representando 20% dos casos. Dessa forma, pode-se concluir que a busca de mutações no gene *NR5A1* dentro de ambos os quadros clínicos está indicada, uma vez que coincidem com os resultados de outros estudos. A análise molecular de um número maior de pacientes com DDS 46,XY e DG Parcial 46,XY, provavelmente indicará a frequência mais alta em casos de DDS 46,XY idiopáticos, confirmando a importância do estudo do gene *NR5A1* nesses casos.

CONCLUSÕES

Através da análise molecular do gene *NR5A1* em 106 pacientes com distúrbios da diferenciação do sexo, algumas considerações podem ser feitas:

- Doze alterações foram identificadas pela primeira vez neste trabalho, sendo sete na região codificante (p.Ser32Asn, p.Arg39Cis, p.Lis38*, p.Cis65Tir, p.L80Wfs*8, p.Cis247*, and p.Asp364Trefs*18), uma em sítio de *splicing* (c.1138+1G>T), duas no exon 1 não-codificante (c.-133G>A e c.-156_-136ins18pb), três alterações na região 5'UTR (c.-413G>A, c.-208C>A, e c.-762C>T) e uma alteração na região 3'UTR (c.*1286C>T);
- O polimorfismo p.Gli146Ala, descrito por WuQiang *et al.* em 2003, foi identificado em 31 dos 106 pacientes analisados. Esta alteração prejudica a capacidade de transativação da proteína, podendo estar relacionado com uma maior susceptibilidade a doenças adrenais. Quatro pacientes que apresentaram mutação (4, 5, 8 e 11) também eram heterozigotos para esse polimorfismo;
- Outros 19 SNPs já descritos foram identificados nos pacientes; com exceção de cinco deles (rs1889311, rs7037254, rs7875999 e rs10283445), todos os outros de encontram em equilíbrio de Hardy e Weinberg;
- Mutações foram identificadas em 20% dos casos dos distúrbios da diferenciação gonadal e 22% dos casos de DDS 46,XY Idiopáticos;
- Análise do gene *NR5A1* está indicada em casos de distúrbios da diferenciação gonadal 46,XY e DDS 46,XY idiopáticos.

REFERÊNCIAS

- ACHERMANN, J.C.; ITO, M.; ITO, M.; HINDMARSH, P.C.; JAMESON, J.L. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nature Genetics*, 22(2):125-126, 1999.
- ACHERMANN, J.C.; OZISIK, G.; ITO, M.; ORUN, U.A.; HARMANCI, K.; GURAKAN, B.; JAMESON, J.L. Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(4):1829–1833, 2002.
- ALLALI, S.; MULLER, J.B.; BRAUNER, R.; LOURENÇO, D.; BOUDJENAH, R.; KARAGEORGOU, V.; TRIVIN, C.; LOTTMANN, H.; LORTAT-JACOB, S.; NIHOUL-FÉKÉTÉ, C.; DE DREUZY, O.; MCELREAVEY, K.; BASHAMBOO, A. Mutation analysis of NR5A1 encoding steroidogenic factor 1 in 77 patients with 46, XY disorders of sex development (DSD) including hypospadias. *PloS One*, 6(10):e24117, 2011.
- ALVAREZ-NAVA, F.; GONZALEZ, S.; SOTO, S.; PINEDA, L.; MORALES-MACHIN, A. Mixed gonadal dysgenesis: a syndrome of broad clinical, cytogenetic and histopathologic spectrum. *Genetic Counseling*, 10(3):233-43, 1999.
- BASHAMBOO, A.; FERRAZ-DE-SOUZA, B.; LOURENÇO, D.; LIN, L.; SEBIRE, N.J.; MONTJEAN, D.; BIGNON-TOPALOVIC, J.; MANDELBAUM, J.; SIFFROI, J.; CHRISTIN-MAITRE, S.; RADHAKRISHNA, U.; ROUBA, H.; RAVEL, C.; SEELER, J.; ACHERMANN, J.C.; MCELREAVEY, K. Human Male Infertility Associated with Mutations in NR5A1 Encoding Steroidogenic Factor 1. *American Journal of Human Genetics*, 87(4):505-12, 2010.
- BEIGUELMAN, B. Genética de populações humanas. Riberão Preto. Editora: SBG, 2008.
- BERTA, P.; HAWKINS, J.R.; SINCLAIR, A.H.; TAYLOR, A.; GRIFFITHS, B.L.; GOODFELLOW, P.N.; FELLOUS, M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, 29;348(6300):448-50, 1990.

- BETTS, M.J.; RUSSELL, R.B. Bioinformatics for Geneticists. Chapter 14: Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. Edited by Michael R. Barnes and Ian C. Gray Copyright John Wiley & Sons, Ltd. 2003.
- BUAAS, F.W.; GARDINER, J.R.; CLAYTON, S.; VAL, P.; SWAIN, A. In vivo evidence for the crucial role of SF1 in steroid-producing cells of the testis, ovary and adrenal gland. *Development*, 139(24):4561-70, 2012.
- BUCHER, P. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerases II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *Journal of Molecular Biology*, 212(4):256-78, 1990.
- CALVO, R.M.; ASUNCION, M.; TELLERIA, D.; SANCHO, J.; MILLAN, L.S. ESCOBAR-MORREALE, H. Screening for Mutations in the Steroidogenic Acute Regulatory Protein and Steroidogenic Factor-1 Genes, and in CYP11A and Dosage-Sensitive Sex Reversal-Adrenal Hypoplasia Gene on the X Chromosome, Gene-1 (DAX-1), in Hyperandrogenic Hirsute Women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(4):1746-9, 2001.
- CAMATS, N.; PANDEY, A.V.; FERNANDEZ-CANCIO, M.; ANDALUZ, P.; JANNER, M.; TORAN, N.; MORENO, F.; BEREKET, A.; AKCAY, T.; GARCÍA-GARCÍA, E.; MUNOZ, M.T.; GRACIA, R.; NISTAL, M.; CASTANO, L.; MULLIS, P.E.; CARRASCOSA, A.; AUDÍ, L.; FLUCK, C.E. Ten Novel Mutations in the NR5A1 Gene Cause Disordered Sex Development in 46,XY and Ovarian Insufficiency in 46,XX Individuals. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(7):1294-306, 2012.
- DAMIANI, D.; DICHTCHEKENIAN, V.; SETIAN, N. O Enigma da Determinação Gonadal - O Que Existe Além do Cromossomo Y?. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metababologia*, 44(3):248-56, 2000.

- DAMIANI, D.; SETIAN, N.; KUPERMAN, H.; MANNA, T.D.; DICHTCHEKENIAN, V. Genitália Ambígua: Diagnóstico Diferencial e Conduta. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metababologia*, 45(1):37-48, 2001.
- DANISH, R.K. Intersex problems in the neonate. *Indian Journal of Pediatrics*, 49(399):555-75, 1982.
- DE ARAÚJO, M. Estudo da organização molecular do “cluster” gênico CYP21 e C4 em famílias com a forma clássica de deficiência da 21-hidroxilase no Brasil [tese de mestrado]. Campinas: Instituto de Biologia; Universidade Estadual de Campinas, 1996.
- DE MELLO, M.P.; ASSUMPCÃO, J.G.; HACKEL, C. Genes Envolvidos na Determinação e Diferenciação do Sexo. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metababologia*, 49(1):14-25, 2005.
- DE MELLO, M.P.; FRANÇA, E.S.S.; FABBRI, H.C; MACIEL-GUERRA, A.T.; GUERRA-JÚNIOR, G. Multifunctional role of steroidogenic factor 1 and disorders of sex development. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metababologia*, 55(8):607-12, 2011.
- FERRAZ-DE-SOUZA, B.; LIN, L.; ACHERMANN, J.C. Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 10;336(1-2): 198–205, 2011.
- FIGUEIREDO, B.C.; CAVALLI, L.R.; PIANOVSKI, M.A.D.; , E.; SANDRINI, R.; RIBEIRO, R.C.; ZAMBETTI, G.; DELACERDA, L.; RODRIGUES, G.A.; HADDAD, B.R. Amplification of the Steroidogenic Factor 1 Gene in Childhood Adrenocortical Tumors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(2):615-9, 2005.
- FLÜCK, C.E.; MEYER-BÖNI, M.; PANDEY, A.V.; KEMPNA, P.; MILLER, W.L.; SCHOENLE, E.; BIASON-LAUBER, A. Why Boys Will Be Boys: Two Pathways of Fetal Testicular Androgen Biosynthesis Are Needed for Male Sexual Differentiation. *American Journal of Human Genetics*, 89:201–218, 2011.

- GOODFELLOW, P.N.; DARLING, S.M. Genetics of sex determination. *Development*, 102(2):251-8, 1988.
- GOURLAY, W.A.; JOHNSON, H.W.; PANTZAR, J.T.; MCGILLIVRAY, R.; CRAWFORD, R.; NIELSEN, W. Gonadal tumors in disorders of sexual differentiation. *Urology*, 43(4):537-40, 1994.
- HAMMER, G.D.; KRYLOVA, I.; ZHANG, Y.; DARIMONT, B.D.; SIMPSON, K.; WEIGEL, N.L.; INGRAHAM, H.A. Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Molecular cell*, 3(4):521-6, 1999.
- HAMMER, G.D.; PARKER, K.L.; SCHIMMER, B.P. Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development. *Endocrinology*, 146(3):1018–24, 2005.
- HANLEY, N.A.; BALL, S.G.; CLEMENT-JONES, M.; HAGAN, D.M.; STRACHAN, T.; LINDSAY, S.; ROBSON, S.; OSTRER, H.; PARKER, K.L.; WILSON, D.I. Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mechanism of Development*, 87(1-2):175–180, 1999.
- HOIVIK, E.A.; LEWIS, A.E.; AUMO, L.; BAKKE, M. Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 5:315(1-2):27-39, 2010.
- HOUSMAN, D.; HEYNINGEN, V.V.; HASTIE, N. The Candidate Wilms' Tumour Gene Is Involved In Genitourinary Development. *Nature*, 346(6280):194-7, 1990.
- HUGHES, I.A. Minireview: sex differentiation. *Endocrinology*, 142:3281–3287, 2001.
- HUGHES, I.A.; HOUK, C.; AHMED, S.F.; LEE, P.A.; GROUP, L.C.; GROUP, E.C. Consensus statement on management of intersex disorders. *Journal of Pediatric Urology*, 2(3):148-62, 2006.

- IKEDA, Y.; SHEN, W.H.; INGRAHAM, H.A.; PARKER, K.L. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Molecular Endocrinology*, 8(5):654–662, 1994.
- ITO, M.; ACHERMANN, J.C.; JAMESON, J.L. A naturally occurring steroidogenic factor-1 mutation exhibits differential binding and activation of target genes. *Journal of Biological Chemistry*, 13;275(41):31708–14, 2000.
- JACOB, A.L.; LUND, J.; MARTINEZ, P.; HEDIN, L. Acetylation of steroidogenic factor 1 protein regulates its transcriptional activity and recruits the coactivator GCN5. *Journal of Biological Chemistry*, 5;276(40):37659-64, 2001.
- KABUTO, T.; TAKAHASHI, H.; GOTO-FUKUURA, Y.; IGARASHI, T.; AKAHORI, M.; KAMEYA, S.; IWATA, T.; MIZOTA, A.; YAMAKI, K.; MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, H. A new mutation in the RP1L1 gene in a patient with occult macular dystrophy associated with a depolarizing pattern of focal macular electroretinograms. *Molecular Vision*, 18:1031-9, 2012.
- KIMURA, R.; YOSHII, H.; NOMURA, M.; KOTOMURA, N.; MUKAI, T.; ISHIHARA, S.; OHBA, K.; YANASE, T.; GOTOH, O.; NAWATA, H.; MOROHASHI, K. Identification of novel first exons in Ad4BP/SF-1 (NR5A1) gene and their tissue- and species-specific usage. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 11;278(1):63-71, 2000.
- KÖHLER, B., LIN, L.; FERRAZ-DE-SOUZA, B.; WIEACKER, P.; HEIDEMANN, P.; SCHRÖDER, V.; BIEBERMANN, H.; SCHNABEL, D.; GRÜTERS, A.; ACHERMANN, J.C. Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46,XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency. *Human Mutation*, 29(1):59-64, 2008.
- KRISHNA, S.S.; MAJUMDAR, I.; GRISHIN, N.V. Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Research*, 15;31(2):532-50, 2003.

- LALA, D.S.; RICE, D.A.; PARKER, K.L. Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Molecular Endocrinology*, 6(8):1249–58, 1992.
- LEE, P.A.; HOUK, C.P.; AHMED, S.F.; HUGHES, E.A. Consensus Statement on Management of Intersex Disorders. International Consensus Conference on Intersex. *Pediatrics*, 118(2):488-500, 2006.
- LIN, L.; ACHERMANN, J.C.; Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sexual Development*, 2(4-5):200–09, 2008.
- LIN, L.; PHILIBERT, P.; FERRAZ-DE-SOUZA, B.; KELBERMAN, D.; HOMFRAY, T.; ALBANESE, A.; MOLINI, V.; SEBIRE, N.J.; EINAUDI, S.; CONWAY, G.S.; HUGHES, I.A.; JAMESON, J.L.; SULTAN, C.; DATTANI, M.T.; ACHERMANN, J.C. Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46,XY disorders of sex development with normal adrenal function. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(3):991-9, 2007.
- LIPAY, M.V.; BIANCO, B.; VERRESCHI, I.T. Disgenesias Gonadais e Tumores: Aspectos Genéticos e Clínicos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metababologia*, 49(1):60-70, 2005.
- LITTLE, T.H.; ZHANG, Y.; MATULIS, C.K.; WECK, J.; ZHANG, Z.; RAMACHANDRAN, A.; MAYO, K.E.; RADHAKRISHNAN, I. Sequence-specific deoxyribonucleic acid (DNA) recognition by steroidogenic factor 1: a helix at the carboxy terminus of the DNA binding domain is necessary for complex stability. *Molecular Endocrinology*, 20(4):831–43, 2006.
- LOURENÇO, D.; BRAUNER, R.; LIN, L.; DE PERDIGO, A.; WERYHA, G.; MURESAN, M.; BOUDJENAH, R.; GUERRA-JUNIOR, G.; MACIEL-GUERRA, A.T.; ACHERMANN, J.C.; MCELREAVEY, K.; BASHAMBOO, A. Mutations in *NR5A1* Associated with Ovarian Insufficiency. *New England Journal of Medicine*, 360(12):1200-10, 2009.

- 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.; GUERRA-JÚNIOR, G. Menino ou menina? Os distúrbios da diferenciação do sexo. São Paulo: Editora Rubio Ltda. 2ed, 2010.
- MACLAUGHLIN, D.T.; DONAHOE, P.K. Sex determination and differentiation. *New England Journal of Medicine*, 350(4):367-78, 2004.
- MATHE, E.; OLIVIER, M.; KATO, S.; ISHIOKA, C.; HAINAUT, P.; TAVTIGIAN, S.V. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic Acids Research*, 6;34(5):1317-25, 2006.
- MENDONCA, B.B.; DOMENICE, S.; ARNHOLD, I.J.; COSTA, E.M. 46,XY disorders of sex development (DSD). *Clinical endocrinology*, 70(2):173-87, 2009.
- MOROHASHI, K.; HONDA, S.; INOMATA, Y.; HANDA, H.; OMURA, T. A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. *Journal of Biological Chemistry*, 5;267(25):17913-9, 1992.
- NABHAN, Z.M.; LEE, P.A. Disorders of sex development. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 19(5):440–5, 2007.
- NG, P.C.; HENIKOFF, S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Genome Research*, 11(5):863-874, 2001.
- NG, P.C.; HENIKOFF, S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7:61–80, 2006.
- NISHI, Y.; HAMAMOTO, K.; KAJIYAMA, J.; KAWAMURA, I. The Perrault syndrome: clinical report and review. *American Journal of Human Genetics*, 31(3):623-9, 1988.

- OBA, K.; YANASE, T.; NOMURA, M.; MOROHASHI, K.; TAKAYANAGI, R.; NAWATA, H. Structural characterization of human Ad4bp (SF-1) gene. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 4;226(1):261–7, 1996.
- OHNO, C.K.; PETKOVICH, M. FTZ-F1 beta, a novel member of the Drosophila nuclear receptor family. *Mechanism of Development*, 40(1-2):13–24, 1993.
- OZISIK, G.; ACHERMANN, J.C.; MEEKS, J.J.; JAMESON, J.L. SF1 in the development of the adrenal gland and gonads. *Hormone Research*, 59(1):94-8, 2003.
- PALIWAL, P.; SHARMA, A.; BIRLA, S.; KRIPLANI, A.; KHADGAWAT, R.; SHARMA, A. Identification of novel SRY mutations and SF1 (NR5A1) changes in patients with pure gonadal dysgenesis and 46,XY karyotype. *Molecular Human Reproduction*, 17(6):372-8, 2011.
- PARKER, K.L., SCHIMMER, B.P., Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocrine Reviews*, 18(3):361–377, 1997.
- PARKER, K.L.; RICE, D.A.; LALA, D.S.; IKEDA, Y.; LUO, X.; WONG, M.; BAKKE, M.; ZHAO, L.; FRIGERI, C.; HANLEY, N.A.; STALLINGS, N.; SCHIMMER, B.P. Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Progress in Hormone Research*, 57:19–36, 2002.
- PASCAL, E.; TJIAN, R. Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Gene & Development*, 5(9):1646-56, 1991.
- PAXTON, M.J.W. *Endocrinology: biological and medical perspectives*. Dubuque, Iowa: Wm. C. Brown Publishers, 1986.
- PHILIBERT, P.; LEPRIEUR, E.; ZENATY, D.; THIBAUD, E.; POLAK, M.; FRANCES, A.M.; LESPINASSE, J.; RAINGEARD, I.; SERVANT, N.; AUDRAN, F.; PARIS, F.; SULTAN, C. Steroidogenic factor-1 (SF-1) gene mutation as a frequent cause of

primary amenorrhea in 46,XY female adolescents with low testosterone concentration. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8:28, 2010.

PHILIBERT, P.; ZENATY, D.; LIN, L.; SOSKIN, S.; AUDRAN, F.; LÉGER, J.; ACHERMANN, J.C.; SULTAN, C. Mutational analysis of steroidogenic factor 1 (NR5a1) in 24 boys with bilateral anorchia: a French collaborative study. *Human Reproduction*, 22(12):3255-61, 2007.

PRITCHARD-JONES, K.; FLEMING, S.; DAVIDSON, D.; BICKMORE, W.; PORTEOUS, D.; GOSDEN, C.; BARD, J.; BUCKLER, A.; PELLETIER, J.; RAMENSKY, V.; BORK, P.; SUNYAEV, S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Research*, 30(17):3894–3900, 2002.

RICE, D.A.; MOUW, A.R.; BOGERD, A.M.; PARKER, K.L. A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. *Molecular Endocrinology*, 5(10):1552–61, 1991.

ROCHA, V.B.; GUERRA-JÚNIOR, G.; MARQUES-DE-FARIA, A.P.; DE MELLO, M.P.; MACIEL-GUERRA, A.T. Complete gonadal dysgenesis in clinical practice: the 46,XY karyotype accounts for more than one third of cases. *Fertility and Sterility*, 96(6):1431-4, 2011.

SADOVSKY, Y.; CRAWFORD, P.A.; WOODSON, K.G.; POLISH, J.A.; CLEMENTS, M.A.; TOURTELLOTTE, L.M.; SIMBURGER, K.; MILBRANDT, J. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92(24):10939–10943, 1995.

SCHIMMER, B.P.; WHITE, P.C. Minireview: Steroidogenic Factor 1: Its Roles in Differentiation, Development, and Disease. *Molecular Endocrinology*, 24(7):1322–1337, 2010.

- SCHLAUBITZ, S.; YATSENKO, S.A.; SMITH, L.D.; KELLER, K.L.; VISSERS, L.E.; SCOTT, D.A.; CAI, W.W.; REARDON, W.; ABDUL-RAHMAN, O.A.; LAMMER, E.J.; LIFCHEZ, C.A.; MAGENIS, E.; VELTMAN, J.A.; STANKIEWICZ, P.; ZABEL, B.U.; LEE, B. Ovotestes and XY sex reversal in a female with an interstitial 9q33.3-q34.1 deletion encompassing NR5A1 and LMX1B causing features of genitopatellar syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 15;143A(10):1071-81, 2007.
- SCOLFARO, M.R.; CARDINALI, I.A.; STUCHI-PEREZ, E.G.; DE MELLO, M.P.; ASSUMPÇÃO, J.G.; BAPTISTA, M.T.M.; SILVA, J.M.B.; MACIEL-GUERRA, A.T.; GUERRA-JÚNIOR, G. Morphometry and histology of gonads from 13 children with dysgenetic male pseudohermaphroditism. *Archives Pathology & Laboratory Medicine*, 125:(5)652-6, 2001.
- SINCLAIR, A.H.; BERTA, P.; PALMER, M.S.; HAWKINS, J.R.; GRIFFITHS, B.L.; SMITH, M.J.; FOSTER, J.W.; FRISCHAUF, A.M.; LOVELL-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*, 19;346(6281):240-4, 1990.
- SOARDI, F.C.; COELI, F.B.; MACIEL-GUERRA, A.T.; GUERRA-JÚNIOR, G.; MELLO, M.P. Complete XY gonadal dysgenesis due to p.D293N homozygous mutation in the NR5A1 gene: a case study. *Journal of Applied Genetics*, 51(2):223-4, 2010.
- SOHVAL, A.R. Mixed gonadal dysgenesis: A variety of hermaphroditism. *American Journal of Human Genetics*, 15:155-8, 1963.
- SUNYAEV, S.; RAMENSKY, V.; KOCH, I.; LATHE, W.; KONDRASHOV, A.S.; BORK, P. Prediction of deleterious human alleles. *Human Molecular Genetics*, 15;10(6):591-7, 2001.

- TAJIMA, T.; FUJIWARA, F.; FUJIEDA, K. A novel heterozygous mutation of steroidogenic factor-1 (SF-1/Ad4BP) gene (NR5A1) in a 46, XY disorders of sex development (DSD) patient without adrenal failure. *Endocrine Journal*, 56(4):619-24, 2009.
- TANTAWY, S.; LIN, L.; AKKURT, I.; BORCK, G.; KLINGMÜLLER, D.; HAUFFA, B.P.; KRUDE, H.; BIEBERMANN, H.; ACHERMANN, J.C.; KÖHLER, B. Testosterone production during puberty in two 46,XY patients with disorders of sex development and novel NR5A1 (SF-1) mutations. *European Journal of Endocrinology*, 167(1):125-30, 2012.
- TAVTIGIAN, S.V.; DEFFENBAUGH, A.M.; YIN, L.; JUDKINS, T.; SCHOLL, T.; SAMOLLOW, P.B.; DE SILVA, D.; ZHARKIKH, A.; THOMAS, A. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *Journal of Medical Genetics*, 43:295-305, 2006.
- TREMBLAY, J.J.; VIGER, R.S. GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology*, 142(3):977–986, 2001.
- UEDA, H.; HIROSE, S. Defining the sequence recognized with BmFTZ-F1, a sequence specific DNA binding factor in the silkworm, *Bombyx mori*, as revealed by direct sequencing of bound oligonucleotides and gel mobility shift competition analysis. *Nucleic Acids Research*, 19(13):3689–93, 1991.
- WILSON, T.E.; FAHRNER, T.J.; MILBRANDT, J. The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 13(9):5794–5804, 1993.
- WU, J.Y.; MCGOWN, I.N.; LIN, L.; ACHERMANN, J.C.; HARRIS, M.; COWLEY, D.M.; AFTIMOS, S.; NEVILLE, K.; CHOONG, C.; COTTERILL, A.M. A novel NR5A1 variant in an infant with elevated testosterone from an Australasian Cohort of

46,XY patients with Disorders of Sex Development. *Clinical Endocrinology*, doi: 10.1111/cen.12012, 2012.

WUQIANG, F.; YANASE, T.; WEI, L.; OBA, K.; NOMURA, M.; OKABE, T.; GOTO, K.; NAWATAA, H. Functional characterization of a new human Ad4BP/SF-1 variation, G146A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(4):987–994, 2003.

XUE, Q.; LIN, Z.; YIN, P.; MILAD, M.P.; CHENG, Y.H.; CONFINO, E.; REIERSTAD, S.; BULUN, S.E. Transcriptional activation of steroidogenic factor-1 by hypomethylation of the 5' CpG island in endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(8):3261-7, 2007.

ZIMMERMANN, S.; SCHWARZLER, A.; BUTH, S.; ENGEL, W.; ADHAM, I.M. Transcription of the Leydig insulin-like gene is mediated by steroidogenic factor-1. *Molecular Endocrinology*, 12(5):706–713, 1998.

ANEXOS

ANEXO I

<i>PACIENTE</i>	<i>QUADRO CLÍNICO SUGESTIVO</i>	<i>GÔNADAS</i>	<i>GRAU DE VIRILIZAÇÃO</i>	<i>OBSERVAÇÕES</i>
1	DDS 46,XY idiopático	Palpáveis em saliências labioescrotais.	Prader III	Investigação molecular para o gene RA e da 5-alfa redutase tipo 2 foram normais. Irmão dos pacientes 2 e 3.
2	DDS 46,XY idiopático	Palpáveis em saliências labioescrotais	Prader III- IV	Investigação molecular para o gene RA e da 5-alfa redutase tipo 2 foram normais. Irmão dos pacientes 1 e 3.
3	DDS 46,XY idiopático	Palpáveis em terço superior do canal inguinal.	Prader II-III	Investigação molecular para o gene RA e da 5-alfa redutase tipo 2 foram normais. Irmão dos pacientes 1 e 2.
4	DG PARCIAL 46,XY	Palpáveis no canal inguinal bilateral médio.	Prader III	-
5	DDS 46,XY idiopático	Testículo direito na região inguinal. GE: Palpável no canal inguinal.	Prader V	Investigação molecular para o gene RA e da 5-alfa redutase tipo 2 foram normais
6	DDS 46,XY idiopático	Não palpáveis.	Dado não obtido	Investigação molecular para o gene RA e da 5-alfa redutase tipo 2 foram normais.

7	DG PARCIAL 46,XY	GD e GE: saliência lábioescrotal (testículos disgenéticos).	Prader II	-
8	DDS 46,XY idiopático	GE: Palpável em saliência labioescrotal. Testículo direito de volume diminuído na região inguinal.	Dado não obtido	Investigação molecular para o gene RA e da 5-alfa redutase tipo 2 foram normais.
9	DDS 46,XY idiopático	Palpáveis nas saliências labioescrotais.	Prader III-IV	Investigação molecular para o gene RA e da 5-alfa redutase tipo 2 foram normais.
10	DG PARCIAL 46,XY	Não palpáveis.	Prader IV	-
11	DG PURA 46,XY	Palpável em região inguinal direita.	Dado não obtido	-
12	DG PARCIAL 46, XY	GD e GE: saliência lábioescrotal (testículos disgenéticos).	Prader III	-
13	DDS 46,XY idiopático	Palpável em saliência lábioescrotal.	Prader II	Investigação molecular para o gene RA e da 5-alfa redutase tipo 2 foram normais.
14	DDS 46,XY idiopático	Testículos na bolsa após orquidopexia.	Dado não obtido	Pais consanguíneos

QUADRO 1: Clínica dos pacientes nos quais foram encontradas mutações no gene *NR5A1*. Sendo DG = disgenesia gonadal, DDS = distúrbio da diferenciação do sexo, GD = gônada direita; GE = gônada esquerda; RA = receptor de andrógeno.

ANEXO II



CEP, 22/01/13.
(PARECER CEP: N° 434/2006)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO INTERDISCIPLINAR DOS DISTÚRBIOS DA DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO SEXO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gil Guerra Junior

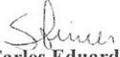
II – PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo que inclui o projeto “ANÁLISE MOLECULAR DO GENE NR5A1 EM PACIENTES 46,XY COM DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO DO SEXO”, com dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Com a finalidade de mestrado da aluna Helena Campos Fabbri, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de janeiro de 2012.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br