

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/53537

IB/81943

INSTITUTO DE BIOLOGIA

UNICAMP

FEEL

FEEL

FEEL

*Análise molecular dos genes SRY e DMRT1 em pacientes com diagnóstico de
disgenesia gonadal XY ou de hermafroditismo verdadeiro XY*

JULIANA GODOY ASSUMPÇÃO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Juliana Godoy Assumpção
Maricilda Palandi de Mello
e aprovada pela Comissão Julgadora.

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutor em
Genética e Biologia Molecular – Área de
Concentração Genética Humana e Médica**

Orientadora: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

CAMPINAS

2002

UNIDADE	I.B.894
Nº CHAMADA	7/UNICAMP
	As79e
V	EX
TOMBO BCI	53537
PRCC.	124103
C	☐ D ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/04/03
Nº CPD.	

Bib. 204002

CPD 011 X 10-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

As79e

Assumpção, Juliana Godoy

Estudo molecular dos genes *SRY* e *DMRT1* em pacientes com diagnóstico de disgenesia gonadal XY ou de hermafroditismo verdadeiro XY / **Juliana Godoy Assumpção**. -- Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Maricilda Palandi de Mello.

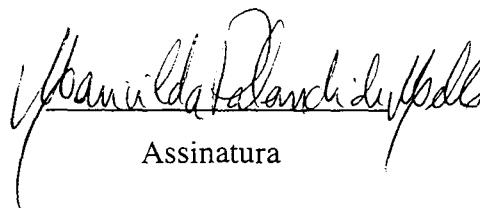
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1.Diferenciação dos sexos - Anomalias. 2. Gônadas.
3. Hermafroditismo. I. Mello, Maricilda Palandi de.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA DA DEFESA PÚBLICA: Campinas, 14 de novembro de 2002.

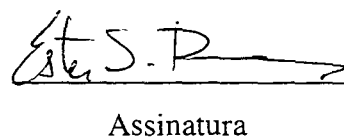
BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello



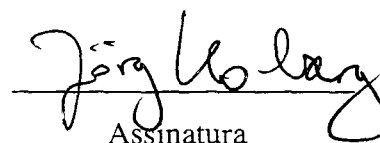
Assinatura

Profa. Dra. Ester Silveira Ramos



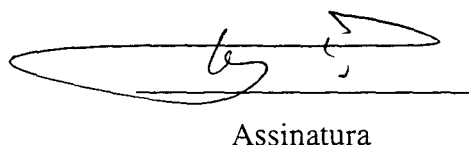
Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg



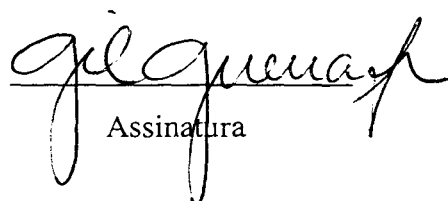
Assinatura

Profa. Dra. Christine Hackel



Assinatura

Prof. Dr. Gil Guerra Jr.



Assinatura

Profa. Dra. Lúcia Regina Martelli

Assinatura

Profa. Dra. Íscia Lopes Cendéz

Assinatura

APRENDIZADO

“AINDA FALTA DESCOBRIR A SERENIDADE
AINDA FALTA DOMINAR A ANSIEDADE
E APRENDER A ESPERAR
AINDA FALTA ME PACIFICAR
DEIXANDO O CORAÇÃO FICAR MUDO
AINDA FALTA APRENDER QUASE
TUDO”

Anna Duarte

Ao Alberto (18),

*por seu amor, amizade e compreensão;
por todas as transformações que motivou em mim;
pelo crescimento pessoal que vivenciamos juntos;
dedico.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Agradeço à minha família, pelo seu amor e apoio incondicionais,
e por formarem um porto seguro a partir do qual me sinto livre para navegar!*

*Agradeço imensamente aos pacientes e suas famílias.
Permanece a esperança de que um dia possamos fornecer-lhes
respostas e soluções que amenizem as dificuldades que enfrentam.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello por ter me permitido escolher os rumos da minha pesquisa e ter me dado liberdade para cometer erros (e também acertos!) ao longo do meu amadurecimento profissional. Agradeço também pela sua dedicação ao trabalho, paciência, perseverança e amizade.

Aos Profs. Drs. Edi Lúcia Sartorato, Gil Guerra Jr. e Celso Eduardo Benedetti pela participação na banca prévia e pelas valiosas sugestões que fizeram.

Aos Profs. Drs. Éster Silveira Ramos, Jörg Kobarg, Cristine Hackel, e Gil Guerra Jr. pela criteriosa revisão do trabalho e participação na banca examinadora da tese.

Ao Prof. Dr. Gil Guerra Jr. e à Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel-Guerra por colaborarem em todas as etapas desse trabalho, desde o diagnóstico dos pacientes até a elaboração das publicações, e pela forma amável com a qual me recebem.

À Profa. Dra. Cristine Hackel por partilhar comigo a alegria das novas descobertas, por sua orientação no estágio docente e pela exemplar profissional que é.

Ao Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti, cuja participação na análise de proteínas SRY foi essencial para o sucesso deste trabalho. Sua simplicidade e competência foram para mim um grande exemplo profissional.

Ao Prof. Dr. Peter Warburton e seus alunos Windy Berkofsky-Fessler e Shulan Li pela colaboração eficiente e construtiva que estabelecemos no estudo de neocentrômeros.

À Prof. Dra. Isabel Melaragno pela ajuda nos experimentos de FISH e revisão do manuscrito.

À Dra. Alba Chiesse de Souza pelo auxílio nos experimentos de fosforilação de proteínas.

Aos membros do GIEDDS: Dr. Gil Guerra Jr., Dra. Andréa Trevas Maciel-Guerra, Dra. Antônio Paula Marques-de-Faria, Dra. Maria Tereza Matias Baptista, Roberto Silva, Mariângela Ceschini, Dra. Izilda Cardinalli, Dra. Marica Scolfaro pelo atendimento aos pacientes e fornecimento de dados para este trabalho.

Aos professores e funcionários do CBMEG e, em especial, às secretárias Tânia, Sandra, Fabiana, Patrícia e Andrezza.

À Zaira, secretária da pós-graduação do departamento de Genética e Biologia Molecular.

À Nilma e ao Henri, do laboratório de Citogenética da FCM (UNICAMP), pelo auxílio nas técnicas de citogenética.

À Madalena pelo inestimável auxílio técnico; pela alegria com a qual ilumina os nossos dias; pelo exemplo de pessoa corajosa, trabalhadora e dedicada que é. É sua, Madá, a lembrança mais marcante que guardo dos sete anos que passei neste laboratório!

Aos amigos “originais” do laboratório de Genética Humana do CBMEG: Lee, Marcela, Ivy, Mara, Luzinha, com os quais aprendi técnicas de biologia molecular e estabeleci sólida amizade.

Aos colegas que vieram a juntar-se a nós nos últimos anos: Daniela, Fernanda I, Lúcio, Marcelo, Carlos, Sandra, Welbe, Manuela, Adelmo, Lucy, Eliana, Junia, Hamilton, Fernanda II, Ericka, Camila, Fabiana, Osmar, Andrey, Eduardo, Sandra e Alexandre, Karla, Mitsue, Tiago, Marta, Raquel, Fernanda III, Mariana, Renata, Juliana II, Patrícia, Tércio e João. Obrigada por tornarem o ambiente de trabalho mais divertido, suportarem os meus ataques de estresse e pelo estímulo nas horas de desânimo.

Aos amigos do CBMEG e, em especial, aos alunos da Profa. Yoko: Ed, Sandrinha, Ângela, Pat, TE, Cene e Francine que sempre compartilharam conosco as alegrias e dificuldades do trabalho no laboratório. À Ana Cláudia pelo seu entusiasmo e incentivo nas conquistas profissionais.

Aos colegas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pela convivência harmoniosa e ensinamentos técnicos. Em especial, agradeço ao Celso, à Rosi, à Katucha e à Heloísa por sua hospitalidade.

Às amigas Dani, Ericka e San por terem se tornado companheiras de todas as horas.

Aos queridos amigos da república I com os quais formei uma nova família em Campinas: Ed, Paulinho, Caê, Eneida, Lee, Lu e Stela.

Aos queridos amigos da república II que vieram a aumentar a família: Ed, Stela, 18, Lucy, Lúcio, Ivan, Dani, Juliano, Maria e Jr, e aos adotivos Claudinha e Élcio.

Aos queridos amigos de BH: Cris e Átila, Mônica, Juliana e Pedro, Humberto e Lia, Evandro e Ana, Paulinha, Roberto, Danilo, Renato, Gisele, Drica, Ricardo, Virgínia e Afonso, Mariana e tantos outros...

Aos amigos da meditação, em especial ao Manolo e à Elaine.

Aos professores do bacharelado em Genética da UFMG que colaboraram para a minha formação profissional e pessoal e, em especial, à professora Dolores por sua amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e à FAEP pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	2
Resumo.....	4
Summary.....	6
I. Introdução.....	8
II. Revisão Bibliográfica.....	10
II.1. Determinação e diferenciação do sexo.....	10
II.2. Distúrbios da diferenciação gonadal.....	12
II.2.1. Disgenesia Gonadal XY.....	13
II.2.2. Hermafroditismo verdadeiro.....	15
II.3. Genes envolvidos na determinação e diferenciação do sexo.....	17
II.3.1. Gene <i>SRY</i>	17
II.3.2. Genes ligados ao X.....	25
II.3.3. Genes autossômicos.....	27
II.3.3.1. Gene <i>DMRT1</i>	30
III. Objetivos.....	35
IV. Casuística.....	36
V. Capítulo 1: Amplificação do gene <i>SRY</i>	39
VI. Capítulo 2: Estudo do quadro de leitura aberta do gene <i>SRY</i>	47
VII. Capítulo 3: Estudo da região promotora do <i>SRY</i>	70
VIII. Capítulo 4: Análise molecular de 9p24.3 e do gene <i>DMRT1</i>	83
VIII.1 Estudo da perda de heterozigosidade na região cromossômica 9p24....	84
VIII.2 Investigação de deleções de <i>DMRT1</i>	90
IX. Considerações finais.....	97
X. Referências Bibliográficas.....	101
XI. Anexos.....	122

ABREVIATURAS

ASO - do inglês, “Allele Specific Oligonucleotide”

ATP - trifosfato de adenosina

°C - graus Celsius

cen - centrômero

DAX-1 - do inglês, “DSS-Adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome”

DNA - ácido desoxirribonucleico

DMRT - do inglês, “Doublesex and Mab-3 related Transcription factor”

DMSO - dimetilsulfóxido

DSS - do inglês, “Dosage Sensitive Sex reversal”

DTT - ditioneitol

dNTP - desoxirribonucleotídeos

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EMSA - do inglês, “Electrophoretic Mobility Shift Assay”

FISH - do inglês, “Fluorescent *in situ* Hybridization”

GIEDDS - Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e da Diferenciação do Sexo

HAM - hormônio anti-mülleriano

HMG - do inglês, “High Mobility Group”

H-Y - antígeno de histocompatibilidade do Y

Kb - quilobase

L - litro

M - molar

mA - miliamperes

mar - cromossomo marcador

Mb - megabase

Mc - proteína requerida para fissão em leveduras

ml - mililitro

mUI - miliunidades internacionais

μg - micrograma
μl - microlitro
ng - nanograma
ORF - do inglês, “Open Reading Frame”
PAGE - do inglês, “Polyacrylamide Gel Electrophoresis”
PAR - região pseudoautossômica do cromossomo Y
pb - pares de base
PCR - do inglês, “Polymerase Chain Reaction”
PDZ – domínio de 100 amino ácidos encontrados na família de proteínas “**P**ostsynaptic density protein, **D**isc-large tumor suppressor, **Z**onula occludens protein”
pg - picograma
PHA - fitohemaglutinina
PKA - do inglês, “Protein Kinase”
rpm - rotações por minuto
SDS - dodecil sulfato de sódio
SIP1 - do inglês, “SR Y Interacting Protein 1”
SF1 - do inglês, “Steroidogenic Factor 1”
SOX - do inglês, “SR Y box homologous gene”
SRY - do inglês, “Sex determining Region on the Y chromosome”
STS - do inglês, “Sequence Tagged Sites”
TDF - do inglês, “Testis Determining Factor”
Tris - tris (hidroximetil) - aminometano
V - voltagem
W - Watts
WNT4 - do inglês, “Wingless-type MMTV integration site family, member 4”
WT1 - do inglês, “Wilms Tumor supressor 1”
XH2 - do inglês, “Helicase II gene located on the X chromosome”
YAC - do inglês, “Yeast Artificial Chromosome”
Yp - braço curto do cromossomo Y
Yq - braço longo do cromossomo Y
ZFY - do inglês, “Zinc-Finger gene on the Y chromosome”

RESUMO

Em seres humanos a gônada inicia sua diferenciação em testículo em torno da sétima semana de gestação. O principal gene responsável por ativar este processo é denominado *SRY* e localiza-se no braço curto do cromossomo Y (Yp). A proteína produzida por este gene contém um domínio conservado (“HMG box”) que permite sua ligação ao DNA. Mutações no *SRY* resultam em uma condição conhecida como disgenesia gonadal pura XY, caracterizada por fenótipo feminino e gônadas formadas por tecido fibroso. Mais raramente, estas mutações podem ser encontradas em pacientes com diagnóstico de disgenesia gonadal parcial XY, caracterizado pelo desenvolvimento anormal do testículo, ou ainda em hermafroditas verdadeiros, nos quais ocorre presença simultânea de tecido ovariano e testicular nas gônadas.

A disgenesia gonadal XY também pode ocorrer devido à perda da porção distal do braço curto do cromossomo 9, o que sugere que esta região contenha um ou mais genes necessários para o desenvolvimento testicular. Há vários genes situados nesse intervalo, mas até o momento considera-se que *DMRT1*, que tem homologia com genes que participam da determinação do sexo em outros filos, seja o provável responsável por este tipo de reversão sexual.

No presente trabalho foram estudados os genes *SRY* e *DMRT1* em vinte e dois pacientes com distúrbios da diferenciação gonadal. Dentre esses, uma paciente tinha gônadas disgenéticas e cariótipo 46,X,i(Y)(q11); três apresentavam disgenesia gonadal pura 46,XY; quatorze apresentavam disgenesia gonadal parcial 46,XY e quatro eram hermafroditas verdadeiros [um com cariótipo 46,X,del(Y)(q11.2) e três com cariótipo 46,XY].

Apenas um paciente da amostra tinha deleção do gene *SRY* devido a um rearranjo cromossômico que resultou na formação de um isocromossomo de Y [46,X,i(Y)(q11)]. Tal cromossomo não apresentava seqüências de braço curto e de centrômero. Análises de imunofluorescência com proteínas centroméricas revelaram a presença de um centrômero funcional próximo ao ponto de quebra.

Nos demais casos, houve amplificação do gene *SRY*. O sequenciamento da porção codificadora do gene revelou a ocorrência de duas mutações. A primeira, N65H, afeta um códon localizado no domínio conservado HMG e ocorre em uma paciente com disgenesia gonadal pura XY. A segunda, R30I, afeta um códon fora do “HMG box” mas situado numa sequência que determina a fosforilação da proteína SRY. Esta mutação está presente em vários membros de uma mesma família, incluindo uma paciente com disgenesia gonadal pura XY, dois irmãos com a forma parcial XY e homens normais. As proteínas geradas pelos alelos alterados foram expressas em *E. coli*. Demonstrou-se que a proteína SRY^{N65H} não é capaz de ligar-se ao DNA alvo; enquanto a proteína SRY^{R30I} não é fosforilada por PKA e conseqüentemente liga-se ao DNA com menor afinidade que a proteína selvagem.

O sequenciamento da região promotora do *SRY* mostrou a presença de uma deleção de 3 pb que remove parte de um sítio de ligação a um fator de transcrição (Sp1). Esta mutação ocorre em um caso de disgenesia gonadal pura XY e também está presente no pai da paciente. Os demais indivíduos não apresentaram alterações no *SRY*.

O estudo da região cromossômica 9p24 e do gene *DMRT1* não sugeriu a ocorrência de perda de heterozigossidade nesses casos. Estes dados deverão ser confirmados por experimentos de hibridização *in situ* (FISH), entretanto os resultados indicam que deleções do gene *DMRT1* não são uma causa freqüente de reversão sexual.

Verificou-se que mutações no gene *SRY* ocorrem na maior parte dos casos de disgenesia gonadal pura XY, visto que alterações nesse gene foram encontradas nas três pacientes com esse diagnóstico e cariótipo 46,XY. O estudo funcional das alterações encontradas revelou que as mutações que afetam drasticamente a função da proteína SRY estão associadas à forma pura de disgenesia gonadal, enquanto mutações que permitem alguma atividade da proteína podem ocorrer em vários fenótipos, inclusive no masculino normal. Contudo, tais mutações são raras em casos de disgenesia gonadal parcial XY, tendo sido verificadas em apenas dois irmãos com esse diagnóstico. Além disso, mutações no gene *SRY* são pouco freqüentes em hermafroditas verdadeiros.

SUMMARY

In humans, activation of genes in the testis-determining pathway at seven weeks of gestation causes the gonad to differentiate into testis. The gene that induces the testis development is called *SRY* (sex determining region on the Y chromosome). *SRY* was mapped to the short arm of the Y chromosome. It encodes a protein containing a DNA binding domain known as HMG box. *SRY* mutations are found in XY females harboring pure gonadal dysgenesis. More rarely, *SRY* mutations are detected in patients with XY partial gonadal dysgenesis or even in true hermaphrodites.

Deletions of the distal part of the short arm of chromosome 9 (9p) has also been reported to be associated with XY gonadal dysgenesis, suggesting that this region contains a gene (or genes) required for normal testis development. Recent studies have described a gene in this region with sequence similarity to genes that regulate sexual development of nematodes and insects. This gene, called *DMRT1*, is so far the best candidate for sex reversal caused by the 9p deletions.

In this study, we studied the *SRY* and *DMRT1* genes in twenty-two patients with gonadal differentiation anomalies. One patient presented gonadal dysgenesis and a 46,X,i(Y)(q11) karyotype; four patients presented 46,XY pure gonadal dysgenesis; fourteen had 46,XY partial gonadal dysgenesis and four were true hermaphrodites [one had a 46,X,del(Y)(q11.2) karyotype and three had a 46,XY karyotype].

One patient had a *SRY* deletion due to a chromosomal rearrangement [46,X,i(Y)(q11)]. The rearranged chromosome lacked sequences from Y short arm and centromere. Immunofluorescence studies with specific antibodies showed a neocentromere located close to the breakpoint.

The *SRY* gene was amplified from all the remaining cases. However, sequencing analysis revealed the presence of two mutations. One of them, N65H, changes a codon within the HMG box and was found in a patient with XY pure gonadal dysgenesis. The other, R30I, is located outside the HMG domain but alters a phosphorylation site. This mutation is familial and was found in three affected siblings (a XY pure gonadal dysgenesis and two partial gonadal dysgenesis patients) and in non-affected male relatives. Mutant and wild-type proteins were expressed in *E. coli*. EMSA assays showed that the *SRY*^{N65H}

protein is not able to bind the target DNA. The SRY^{R30I} protein is not phosphorylated by the PKA enzyme and therefore has a reduced DNA-binding capacity.

The *SRY* core promoter was also sequenced and a three base pair deletion was detected within a Sp1 transcription factor binding site. This deletion was found in a XY pure gonadal dysgenesis patient and in her father.

Studies on the loss of heterozygosity to detect deletions on chromosome 9 short arm indicated that *DMRT1* deletions are not frequently found in association with sex reversal. These studies will be confirmed by FISH analysis.

The data presented here showed that 100% of XY females had *SRY* mutations. However, *SRY* mutations are rare in XY partial gonadal dysgenesis patients and in true hermaphrodites. Functional analysis of the mutations showed that the protein had lost its DNA binding capability in a pure gonadal dysgenesis patient but was still able to bind DNA, although less efficiently due to the lack of protein phosphorylation, in a familial mutation associated with different phenotypes.

The molecular etiology of most cases of partial gonadal dysgenesis and true hermaphroditism remained unexplained. Patients who partially develop testis are likely to have mutations in genes other than *SRY*.

I. INTRODUÇÃO

Nos mamíferos a determinação do sexo é estabelecida no momento da fertilização através da herança de um cromossomo X ou Y paterno. O cariótipo 46,XY corresponde ao sexo masculino, enquanto o cariótipo 46,XX corresponde ao sexo feminino. Apesar do sexo cromossômico já estar definido no zigoto, o dimorfismo sexual não é observado em embriões humanos com menos de sete semanas. A partir daí, as gônadas diferenciam-se em testículos nos embriões portadores de cromossomo Y ou em ovários na ausência deste cromossomo.

O evento pivô na determinação sexual é a especialização das gônadas, as demais diferenças entre os sexos são efeitos secundários devidos a hormônios produzidos por elas (Jost *et al.*, 1973). Portanto pode-se definir determinação sexual como sendo o evento que desencadeia a formação do testículo ou do ovário. O processo que se segue à formação das gônadas é chamado diferenciação sexual (Goodfellow e Darling, 1988).

Nos últimos anos houve um grande avanço no entendimento dos mecanismos envolvidos na determinação e diferenciação do sexo; vários genes que participam desses processos foram descobertos e a forma como eles interagem tem sido intensamente investigada. Contudo, o conhecimento que se tem a esse respeito está longe de ser completo.

Apesar do uso de modelos animais e do aprimoramento das técnicas que viabilizam o estudo da expressão de genes *in vitro* e *in vivo*, a maior parte dos dados obtidos até o momento tiveram origem na análise de indivíduos com desenvolvimento gonadal anormal.

Em um indivíduo com cariótipo 46,XY a determinação gonadal anormal pode ser causada por alterações no gene *SRY* ("sex-determining region on the Y chromosome"), resultando em uma condição conhecida como disgenesia gonadal XY ou, mais raramente, em hermafroditismo verdadeiro XY. Nem todos os pacientes com esses tipos de anomalias, no entanto, têm mutações no *SRY*. A análise molecular pode auxiliar na confirmação do diagnóstico, na compreensão do distúrbio e na escolha dos procedimentos a serem adotados

no tratamento dos pacientes. Além disso, o estudo do *SRY* e de outros genes pode vir a resolver questões importantes sobre o fenômeno da determinação sexual.

O presente trabalho foi realizado com o intuito de colaborar para o esclarecimento da etiologia de casos de distúrbios da diferenciação gonadal, em específico, casos de disgenesia gonadal ou hermafroditismo verdadeiro na presença de cromossomo Y.

Este trabalho é resultado de um projeto multidisciplinar realizado com a colaboração de técnicos e professores dos seguintes núcleos de pesquisa: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG-UNICAMP); Departamento de Genética Médica (FCM-UNICAMP); Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo (GIEDDS) (FCM-UNICAMP); Departamento de Genética Humana - Mount Sinai Scholl of Medicine NY; Departamento de Morfologia - UNIFESP/EPM; e Centro de Biologia Molecular Estrutural - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 Determinação e diferenciação do sexo

O desenvolvimento das gônadas, glândulas adrenais e sistema renal são intimamente relacionados devido à sua origem comum no mesoderma intermediário (Harrison, 1978).

Por volta da quarta e quinta semanas após a fertilização, tem início a formação da gônada primordial a partir do mesoderma na região ventral mediana do embrião. O epitélio germinativo prolifera produzindo cordões sexuais que penetram no mesênquima e se distribuem em duas regiões: uma cortical e outra medular. Estes cordões cercam as células germinativas primordiais (Beiguelman, 1982).

Até a sexta semana de gestação, não é possível distinguir embriões com predestinação masculina ou feminina; as gônadas são apenas duas saliências e são chamadas bipotentes ou bissexuais. Estão presentes também os primórdios dos condutos genitais internos masculinos e femininos e genitais externos rudimentares (Beiguelman, 1982; ¹Toublanc, 1988).

Uma vez constituída a gônada em seu estado bipotente, a diferenciação desta em testículo ou ovário depende do sexo cromossômico do embrião. Em torno da sexta semana de desenvolvimento fetal, na presença da proteína SRY, a gônada bissexual começa a se diferenciar em testículo.

Acredita-se que a função principal da proteína SRY seja acionar, direta ou indiretamente, a diferenciação das células de Sertoli. O aparecimento destas células é um dos primeiros indícios morfológicos da diferenciação sexual masculina. Elas alinham-se em cordões que posteriormente englobam as células sexuais primitivas (espermatogônias). Estes cordões formarão os túbulos seminíferos, túbulos retos e rede testis. Em torno da oitava semana as

¹ Toublanc, 1988 apud Guerra Jr. e Maciel-Guerra, 1997.

células somáticas mesenquimais diferenciam-se em células de Leydig (Beiguelman, 1982; Moore, 1978; Voutilainen, 1992; ²Toublanc, 1988; Larsen, 1993).

Associados ao mesonefro estão dois pares de estruturas bilaterais conhecidas como dutos mesonéfricos (ou dutos de Wolff) e dutos paramesonéfricos (ou dutos de Müller). Na diferenciação gonadal masculina, as células de Sertoli produzem o chamado hormônio anti-mülleriano (HAM), que induz a regressão dos dutos de Müller (dutos femininos). As células de Leydig, por sua vez, produzem a testosterona que induz a estabilização dos dutos de Wolff (dutos masculinos) que dão origem à maior parte da genitália interna masculina (epidídimo, canal deferente, vesícula seminal e duto ejaculatório). A testosterona é convertida em di-hidrotestosterona que viriliza os genitais externos (Moore, 1978; ³Grumbach, 1960; Josso, 1992; Larsen, 1993).

A diferenciação sexual masculina propriamente dita (isto é, a masculinização dos primórdios dos genitais internos e externos) tem início a partir da produção de hormônios androgênicos pelas células de Leydig entre a oitava e nona semana de gestação. Na ausência dos hormônios testiculares desenvolve-se o fenótipo feminino.

Em 1973, experimentos realizados por Jost e colaboradores demonstraram que a formação dos dutos de Müller, bem como a feminização dos genitais externos, não são provocados pelos ovários, mas sim pela ausência de hormônios androgênicos produzidos pelos testículos. Os resultados de tais pesquisas mostraram que em mamíferos, independentemente da predestinação cariotípica sexual dos embriões, a destruição de suas gônadas provoca a diferenciação dos dutos de Müller e o desenvolvimento de genitália externa feminina. Portanto, os ovários não são requeridos para a diferenciação dos condutos sexuais e dos genitais externos femininos (Beiguelman, 1982).

Uma vez que o estágio crítico da diferenciação sexual foi ultrapassado, o que ocorre em torno da nona semana de gestação, o primórdio genital fica irreversivelmente

² Toublanc, 1988; Larsen, 1993 apud Guerra Jr e Maciel-Guerra, 1997

³ Grumbach, 1960; Josso, 1992; Larsen, 1993 apud Guerra Jr e Maciel-Guerra, 1997

comprometido com o desenvolvimento feminino e não pode mais se diferenciar numa gônada masculina (Saenger, 1984).

A transformação das gônadas indiferentes em ovários inicia-se na décima semana de gestação. Há um desenvolvimento acentuado da região cortical dos cordões sexuais primitivos e degeneração da região medular. As células mesenquimatosas diferenciam-se em células foliculares, que envolvem as células germinativas primordiais (ovogônias) as quais, posteriormente, darão origens aos folículos primários (Moore, 1978; Beiguelman, 1982; ⁴Toublanc, 1988; Larsen, 1993).

Para a manutenção ovariana é necessária a presença de dois cromossomos X íntegros, caso contrário os folículos ovarianos degeneram-se e a gônada torna-se disgenética, ou seja, constituída somente de tecido conjuntivo, sem elementos da linhagem germinativa ⁵(Tsafriri *et al.*, 1976).

Na ausência do hormônio anti-mülleriano, os dutos de Müller se desenvolvem e formam o trato genital feminino (útero, trompas e porção superior da vagina). Na falta de testosterona os dutos de Wolff continuam indiferenciados e parte deles permanece como apêndices residuais. Na ausência da di-hidrotestosterona, forma-se a genitália externa feminina (Moore, 1978; Beiguelman, 1982; ⁶Toublanc, 1988; Larsen, 1993).

II.2 Distúrbios da diferenciação gonadal

De forma geral a designação do sexo no ser humano é realizada corretamente com base na verificação dos genitais externos. À presença de testículos e genitais masculinos corresponde o cariótipo 46,XY; enquanto à presença de ovários e genitais femininos corresponde o cariótipo 46,XX. Existem, no entanto, distúrbios que afetam a determinação

⁴ Toublanc, 1988; Larsen, 1993 apud Guerra Jr. e Maciel-Guerra, 1997.

⁵ Tsafriri et al., 1976 apud Beiguelman, 1982.

⁶ Toublanc, 1988; Larsen, 1993 apud Guerra Jr. e Maciel-Guerra, 1997.

ou diferenciação sexual de forma que o sexo não pode ser definido com base apenas na aparência dos genitais.

Alguns destes distúrbios são avaliados somente na puberdade por se apresentarem através de atraso no aparecimento das características sexuais secundárias. A maior parte, no entanto, manifesta-se por ambigüidade genital e pode ser identificada no recém-nascido. Nestes casos a definição apropriada do sexo é urgente e requer uma série de procedimentos cirúrgicos, terapia hormonal e acompanhamento psicológico.

Há diversas maneiras de classificar os distúrbios da determinação e diferenciação do sexo. Seguimos no presente trabalho os critérios adotados pelo GIEDDS, descritos por Guerra Jr. (1997). De acordo com tais critérios, estas anomalias são sub-divididas em: (i) distúrbios da diferenciação gonadal, (ii) pseudo-hermafroditismo masculino, (iii) pseudo-hermafroditismo feminino, (iv) outros.

Dentre os distúrbios de diferenciação gonadal encontram-se: síndrome de Turner, aberrações estruturais do cromossomo X sem fenótipo de Turner, disgenesias gonadais, hermafroditismo verdadeiro, homens XX e síndrome de Klinefelter. Há vários tipos de disgenesia gonadal (DG), sendo elas: DG 46,XX; DG 46,XY; DG mista; DG associada a doença degenerativa renal e DG associada a Displasia Camptomélica (Guerra Jr., 1997).

No presente trabalho, foram estudados casos de disgenesia gonadal XY e de hermafroditismo verdadeiro XY.

II.2.1 Disgenesia Gonadal 46,XY

A denominação “disgenesia gonadal 46,XY” refere-se a um grupo de anomalias nas quais existe um defeito na determinação testicular (Berkovitz *et al.*, 1991). A disgenesia gonadal XY inclui as seguintes formas: pura, também chamada completa, e parcial ou incompleta.

A DG pura 46,XY caracteriza-se por um fenótipo feminino e ausência de tecido testicular. Os pacientes apresentam gônadas em forma de fita, constituídas de tecido fibroso, e quantidades variadas de estroma semelhante ao ovariano. Estão presentes o útero, as tubas uterinas e a vagina. A genitália externa é feminina. Em geral o diagnóstico é feito na época da puberdade devido à amenorréia primária e à falta de aparecimento dos caracteres sexuais secundários. Os níveis séricos basais de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) são normalmente elevados, enquanto os níveis de estrógenos e andrógenos são baixos.

Alguns trabalhos descrevem a presença de elementos típicos de tecido ovariano nas gônadas disgenéticas de mulheres 46,XY (Cussen *et al.*, 1979; Bernstein *et al.*, 1980; Berkovitz *et al.*, 1991). De acordo com Berkovitz *et al.* (1991), na ausência de determinação testicular as gônadas de mulheres 46,XY desenvolvem-se em ovários mas sofrem degeneração devido à falta de um segundo cromossomo X, processo semelhante ao que ocorre nas pacientes com síndrome de Turner. De fato, as gônadas de pacientes com DG pura XY são histologicamente indistinguíveis das pacientes com síndrome de Turner (45,X).

A maior parte das pacientes com DG pura XY, também chamadas mulheres 46,XY, não apresenta anomalias cromossômicas (Levilliers *et al.*, 1989). Isto quer dizer que as deleções de partes do cromossomo Y são raras nestas pacientes e, quando ocorrem, em geral estão associadas a características clínicas da síndrome de Turner.

A DG parcial ou incompleta, também conhecida como pseudohermafroditismo disgenético (Federman *et al.*, 1967), é definida pela presença de diferenciação testicular parcial e ambigüidade genital. A genitália externa pode apresentar graus variados de ambigüidade (Berkovitz *et al.*, 1991). Em geral, os indivíduos afetados têm níveis baixos de testosterona; dependendo da gravidade da disgenesia testicular, os níveis de hormônio anti-mülleriano (HAM) podem estar baixos ou serem indetectáveis.

Nos pacientes com DG parcial a histologia gonadal é variável, porém frequentemente observam-se túbulos seminíferos hipoplásicos associados a áreas semelhantes ao estroma ovariano (testículos disgenéticos). Podem ocorrer gônadas disgenéticas bilaterais ou um testículo disgenético e uma gônada disgenética (Berkovitz *et al.*, 1991; Berkovitz e Seeherunvog, 1998). Outros autores, no entanto, chamam de disgenesia gonadal parcial apenas os casos nos quais encontram-se gônadas disgenéticas bilaterais e preferem a denominação “diferenciação gonadal assimétrica” para os casos nos quais encontra-se um testículo disgenético (Rey *et al.*, 1999).

Na DG parcial a genitália interna consiste de uma combinação de derivados de Wolff e Müller. A opção do sexo é feminina desde que em idade precoce e com reconstrução da genitália externa e remoção das gônadas e dos derivados de Wolff (Berkovitz *et al.*, 1991).

Estima-se que tumores do tipo gonadoblastoma ocorram nas gônadas de até 30% dos indivíduos portadores de gônadas disgenéticas e cromossomo Y, tais como os pacientes com DG XY. (Page, 1987a; Mendes *et al.*, 1999). A estes tumores podem se associar disgerminomas ou outros tumores malignos; portanto, nesses casos, uma vez confirmado o diagnóstico, há indicação de gonadectomia bilateral.

Do ponto de vista molecular, sabe-se que mutações no gene *SRY* podem causar falha no desenvolvimento testicular levando à reversão sexual completa ou parcial. Em 10 a 15% dos casos de mulheres com cariótipo 46,XY detectam-se alterações neste gene (Pivnick *et al.*, 1992; Cameron e Sinclair, 1997). Há uma série de relatos de mutações em pacientes com DG pura. Por outro lado, existem apenas quatro casos de mutações em pacientes com a forma parcial de DG (McElreavey *et al.*, 1996; Domenice *et al.*, 1998; Baud *et al.*, no prelo; Assumpção *et al.*, no prelo).

II.2.2 Hermafroditismo verdadeiro

O hermafroditismo verdadeiro é definido pela presença simultânea de tecido testicular (com túbulos seminíferos distinguíveis) e tecido ovariano (contendo folículos) em um único

indivíduo. É denominado lateral quando há ovário de um lado e testículo do outro, bilateral quando há tecidos ovariano e testicular (ovotestis) de ambos os lados, e unilateral quando há ovotestis apenas de um lado, independentemente da gônada contralateral. Ovotestis é a gônada encontrada com maior frequência, seguida por ovário e, menos frequentemente, testículo (revisto por Guerra Jr., 1997; Guerra Jr. *et al.*, 1998).

Os indivíduos afetados normalmente apresentam genitália ambígua, mas também observam-se casos de genitália externa masculina. O grau de masculinização da genitália externa e dos ductos internos depende do quão desenvolvidos são os tecidos ovariano e testicular.

A frequência dos cariótipos no hermafroditismo verdadeiro varia em diferentes populações. O cariótipo 46,XX é o mais comum (70,6% dos casos), especialmente na África (96,9%) (Krob *et al.*, 1994; Spurdle *et al.*, 1995). Dados da literatura mostram que o cariótipo 46,XY é pouco freqüente em algumas regiões (aproximadamente 7% na Ásia, Europa e América do Norte), apesar de ser o cariótipo mais freqüente no Japão (⁷Fukuda *et al.*, 1985). Aberrações cromossômicas são observadas em 22% dos pacientes e várias combinações de mosaicismo são encontradas em pelo menos 10 a 20% dos hermafroditas (Krob *et al.*, 1994, Guerra-Jr. *et al.*, 1998).

Um estudo realizado pelo GIEDDS (Guerra-Jr. *et al.*, 1998) com um grupo de dez pacientes do estado de São Paulo revelou um perfil cariotípico diferente dos encontrados em outras publicações. Nesse trabalho, quatro pacientes tinham cariótipo 46,XY. Outras aberrações de cromossomos sexuais foram encontradas em quatro casos (dois 46,XX/46,XY; um 45,X/47,XY; um 46,X,delYq) e apenas dois indivíduos tinham cariótipo 46,XX.

Dentre os pacientes com diagnóstico de hermafroditismo verdadeiro e cariótipo 46,XY, foi observado que em 10% dos casos ocorrem tumores gonadais (Verp and Simpson, 1987).

⁷ Fukuda *et al.*, 1985 apud Guerra Jr *et al.*, 1998.

A etiologia do hermafroditismo verdadeiro 46,XY é pouco conhecida. Dois trabalhos relataram casos de portadores de mutações no domínio conservado do gene *SRY* (Braun *et al.*, 1993; Hiort e Klauber, 1995). É interessante notar que o paciente estudado por Braun *et al.* (1993) apresentava mosaicismo: a sequência obtida a partir de DNA de linfócitos correspondia à do alelo selvagem enquanto que o sequenciamento do produto gonadal revelou a coexistência do alelo normal e de um alelo mutante.

Berkovitz e Seeherunvog (1998) sugeriram que a DG 46,XY e o hermafroditismo verdadeiro 46,XY devem ser relacionados. Algumas evidências dão suporte a esta hipótese. Em primeiro lugar, mutações no gene *SRY* foram encontradas em pacientes com ambas anomalias. Em segundo lugar, testículos disgenéticos de alguns indivíduos com DG parcial XY têm áreas proeminentes de estroma ovariano, sugerindo que no útero materno estas gônadas possam ter sido ovotestis. Além disso, os experimentos realizados por Eicher e Washburn (1986) mostraram que após a introdução de um cromossomo Y da linhagem de camundongos POS-A no “background” da linhagem C57BL/6J encontravam-se nos fetos gerados testículos bilaterais, ovotestis e ovários. Quando as gônadas eram examinadas num período mais tardio, observava-se que o tecido ovariano dos ovotestis havia se degenerado e as gônadas remanescentes tinham aparência de testículos disgenéticos. Estes dados indicam que alguns dos casos de DG parcial 46,XY podem ter sido casos de hermafroditismo verdadeiro no período intra-uterino.

II.3 Genes envolvidos na determinação e diferenciação do sexo

II.3.1 Gene *SRY*

Desde 1959, graças ao desenvolvimento das técnicas de citogenética e ao estudo de indivíduos com constituições anormais de cromossomos sexuais, concluiu-se que nos mamíferos o sexo é determinado pela presença do cromossomo Y (Jacobs, 1959; Ford, 1959). As análises de anomalias estruturais do cromossomo Y em humanos sugeriram que o braço curto desse cromossomo (Yp) deveria conter um ou mais genes que direcionam a

formação dos testículos. Na ausência do braço curto o fenótipo é feminino, enquanto na ausência do braço longo (Yq) há presença de tecido testicular (Gordon e Ruddle, 1981).

Como o fenótipo masculino depende da presença de testículos, o suposto gene presente no cromossomo Y que determina o sexo em humanos foi denominado fator de determinação testicular (TDF). A busca por esse gene durou cerca de 30 anos e sua descoberta mostrou que os mecanismos genéticos da determinação sexual são ainda mais complexos do que se imaginava.

Watchtel *et al.* (1975) propuseram a hipótese de que o antígeno de histocompatibilidade macho-específico (H-Y) seria o responsável pela indução primária da formação dos testículos. As primeiras evidências contra a hipótese de que o antígeno H-Y seria o TDF surgiram em 1981, quando Haseltine e colaboradores encontraram dois indivíduos pseudohermafroditas, com cariótipo 46,XY e tecido testicular, sem evidência sorológica do antígeno H-Y.

Na década de 80 tornou-se possível definir a localização do TDF através da construção de mapas físicos detalhados do cromossomo Y humano. Um desses mapas foi construído com base em homens 46,XX que herdaram seqüências derivadas de Y, provavelmente por eventos de translocação ocorridos durante o emparelhamento dos cromossomos X e Y na meiose (Guellaen *et al.*, 1984; Page, 1986; Pritchard, 1987; Goodfellow, 1987). Esses trabalhos mostraram que o TDF deveria estar localizado na porção distal do braço curto do cromossomo Y.

O mapeamento de seqüências Y-específicas em indivíduos portadores de alterações estruturais nesse cromossomo possibilitou a divisão do Y em sete intervalos (Vergnaud *et al.*, 1986). A análise das deleções indicava que o TDF pertencia ao intervalo 1 desse cromossomo, adjacente à região pseudoautossômica. Nessa região foi encontrado um gene, chamado *ZFY*, altamente conservado que codifica uma proteína do tipo “Zinc-finger” (Page *et al.*, 1987b).

Alguns fatos, entretanto, levaram à exclusão do *ZFY* como fator de determinação testicular: a presença de uma sequência homóloga ao *ZFY* no cromossomo X (*ZFX*) (Schneider-Gädecke *et al.*, 1989); a presença de sequências homólogas em autossomos de marsupiais (Sinclair *et al.*, 1988); a descrição de três homens XX e um indivíduo intersexo XX que não apresentavam *ZFY*, mas eram positivos para marcadores do intervalo 1A1 (Palmer *et al.*, 1989); e a descoberta de que em camundongos o gene *Zfy* é expresso nas células germinativas, mas não nas células somáticas a partir das quais os testículos se desenvolvem (Koopman *et al.*, 1989).

Com base nas informações fornecidas por Palmer *et al.* (1989), concluiu-se que o TDF deveria encontrar-se dentre 60 Kb no intervalo 1A1. Conforme novos marcadores do cromossomo Y tornaram-se disponíveis, essa região foi reduzida para 35 Kb. Como resultado de uma busca minuciosa, foi identificado um fragmento denominado pY53.3 que detectava sequência de cópia única, Y-específica, não só em humanos mas também em outras espécies de mamíferos. Analisando-se esse segmento, encontrou-se um gene, conservado em mamíferos, que foi denominado *SRY* (Sinclair *et al.*, 1990) (figura 1).

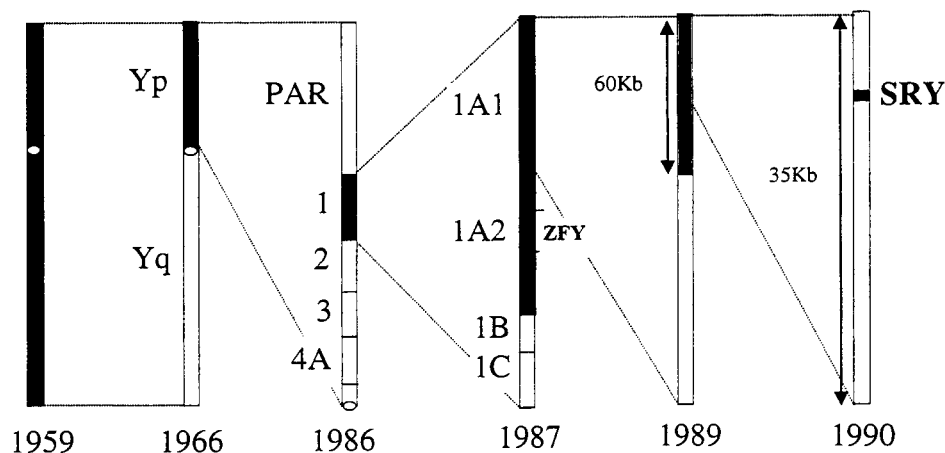


Fig.1 : Representação cronológica da busca pelo fator de determinação testicular entre 1959 e 1990 (modificado a partir de McLaren, 1990).

A análise da sequência de nucleotídeos do gene *SRY* revelou duas fases de leitura aberta (ORF - “Open Reading Frame”). A proteína codificada pela menor fase de leitura não foi relacionada com nenhuma outra proteína conhecida, ao passo que a fase de leitura maior codifica uma proteína que exibe alta homologia com a proteína Mc, necessária para a fissão de leveduras, e com proteínas nucleares não histônicas HMG1 e HMG2 que, ligando-se ao DNA, atuam como fatores de regulação da transcrição (Sinclair *et al.*, 1990).

Ao contrário da maioria dos genes humanos até agora caracterizados, o *SRY* humano consiste de um único exon e codifica uma proteína de 204 aminoácidos (Behlke *et al.*, 1993; Su e Lau, 1993). O estudo de suas sequências flanqueadoras mostrou a presença de dois pequenos segmentos ricos em GC localizados na região 5' não transcrita do gene *SRY*. Porém, a busca de um elemento promotor não revelou nenhuma sequência do tipo “TATA” ou “CCAAT box” na região rica em GC, próxima ao sítio de início da transcrição (Su e Lau, 1993).

Foram encontradas na porção 5' que flanqueia o gene *SRY* várias sequências conservadas que podem estar relacionadas com o controle da expressão desse gene (Vilain *et al.*, 1992; Su and Lau, 1993; Veitia *et al.*, 1997a). Pelo menos três fatores de transcrição que se ligam à essa porção estão aparentemente envolvidos na transativação do *SRY*: Sp1, SF-1 e WT1 (Desclozeaux *et al.*, 1998a; de Santa Barbara *et al.*, 2001; Hossain and Saunders, 2001). Entretanto os mecanismos pelos quais a expressão do *SRY* é regulada *in vivo* permanecem obscuros.

Paralelamente, Gubbay *et al.* (1990) descreveram em camundongos o gene ⁸*Sry*, homólogo ao *SRY* humano, e demonstraram que o padrão de expressão do *Sry* é consistente com o esperado para um gene responsável pela determinação testicular, ocorrendo especificamente nas células somáticas da prega urogenital justamente antes da formação do cordão testicular.

⁸ Usou-se a notação *SRY* para o gene humano e *Sry* para o gene de camundongo. O mesmo padrão foi adotado para os demais genes.

A evidência direta de que o *SRY* corresponde ao TDF foi obtida pela análise de mulheres que apresentavam DG 46,XY. Algumas dessas mulheres apresentavam mutações *de novo* no *SRY*, o que indicou que este gene é realmente requerido para a formação testicular (Berta *et al.*, 1990).

Esses experimentos, porém, não demonstraram se apenas o *SRY* era capaz de induzir a formação dos testículos. Essa dúvida foi esclarecida mais tarde por meio da obtenção de animais transgênicos: o gene *Sry* de camundongos e o gene *SRY* humano foram inseridos, separadamente, em embriões de camundongo XX. Apesar do gene humano não ter se expressado nos camundongos transgênicos, foi observado que o *Sry* levou ao desenvolvimento de testículos normais nos camundongos XX. O exame interno da genitália revelou que o trato reprodutivo era normal, sem sinais de hermafroditismo (Koopman *et al.*, 1991).

A expressão do gene *Sry* foi detectada em células precursoras das células de Sertoli (Rossi *et al.*, 1993). Aparentemente a função principal do *SRY* é ativar a diferenciação dessas células. Em camundongos, a expressão começa logo que surgem as cristas genitais, por volta de 10.5 dpc (“days post coitum”), atinge um pico em torno de 11.5 dpc e é mantida somente até que surjam os primeiros indícios da diferenciação testicular em torno de 12.5 dpc (Koopman *et al.* 1990; Hacker *et al.*, 1995).

O gene humano, por sua vez, tem um padrão de expressão mais amplo que se inicia no momento da determinação do sexo e continua até a vida adulta. Na espécie humana a expressão começa em 41 dpo (“days post ovulation”), atinge um pico em 44 dpo e persiste em níveis baixos a partir daí (Salas-Cortés *et al.*, 1999; McElreavey e Fellous, 1999; Hanley *et al.*, 2000).

Acredita-se que o *SRY* exerça sua função através da regulação da expressão de outros genes que participam do processo de determinação do sexo. A proteína *SRY* possui um domínio de ligação ao DNA formado por 79 aminoácidos. Este domínio foi primeiramente reconhecido nas proteínas nucleares do grupo de alta mobilidade (HMG) e é chamado

“HMG box”. Dentre as seqüências do tipo “HMG box” conhecidas, o *SRY* está mais relacionado com duas proteínas de linfócito T, TCF-1 e TCF- 1 α . Sabe-se que TCF-1 liga-se especificamente à seqüência AACAAAG. Harley *et al.* (1992) verificaram que a proteína *SRY* também reconhece fragmentos sintéticos de seqüência AACAAAG.

Foi demonstrado que algumas mutações associadas com reversão do sexo em mulheres XY diminuem a capacidade de ligação da proteína *SRY* ao DNA. Esses dados indicam que a ligação ao DNA é essencial para que o *SRY* estabeleça a determinação sexual masculina (Harley *et al.*, 1992).

Com a intensificação dos estudos, descobriu-se que o domínio HMG da proteína *SRY* não somente permite sua ligação ao DNA, mas também induz neste um dobramento (Ferrari *et al.*, 1992; Giese *et al.*, 1992). Isto sugere que esta proteína possa atuar influenciando a estrutura da cromatina e regulando a expressão gênica através da justaposição de sítios distantes da hélice de DNA. A importância desse dobramento para a função do *SRY* foi comprovada pelo achado de mutações que não afetam a capacidade de ligação da proteína ao DNA, mas alteram o ângulo de dobramento que ela induz (Pontiggia *et al.*, 1994).

Visto que provavelmente o *SRY* atua como fator de transcrição, outras características comuns a esse grupo de moléculas, tais como domínios de localização nuclear e de fosforilação, foram investigados nesse gene. Dois sítios de localização nuclear independentes foram detectados nas extremidades do “HMG box” (Poulat *et al.*, 1995; Südbeck e Scherer, 1997). Uma mutação na porção C-terminal do domínio HMG comprovadamente afeta a localização nuclear da proteína *SRY* apesar de não alterar sua capacidade de se ligar ao DNA e dobrá-lo (Li *et al.*, 2001).

A fosforilação é um dos principais mecanismos pelos quais a atividade de fatores de transcrição pode ser modulada na célula. A fosforilação de um fator de transcrição pode afetar sua localização nuclear, sua capacidade de ligação ao DNA ou sua capacidade de transativação. Desclozeaux *et al.* (1998b) demonstraram que a proteína quinase dependente de c-AMP (PKA) é capaz de fosforilar resíduos de serina localizados na porção N-terminal

da proteína SRY. Além disso, esse evento aumenta a atividade de ligação ao DNA dessa proteína.

Outra característica importante de um fator de transcrição é sua capacidade de ativar especificamente os seus genes alvo. O SRY é um membro de uma família de fatores de transcrição, conhecidos como proteínas SOX, que contêm domínios HMG semelhantes. Todas as proteínas SOX caracterizadas até o momento ligam-se a seqüências similares; acredita-se que a especificidade de ligação é alcançada através da interação com co-fatores distintos (Ng *et al.*, 1997; Kamachi *et al.*, 1999).

Recentemente foi descrito um fator que interage com SRY, SIP1 (“SRY interacting protein 1”), que contém domínios de interação com proteína denominados PDZ (Poulat *et al.*, 1997). SIP1 interage com sete aminoácidos da porção C-terminal do SRY e há na literatura um caso de mutação nesse sítio associado a DG XY (Tajima *et al.*, 1994).

Mutações no gene *SRY* podem causar falha no desenvolvimento testicular levando à reversão sexual completa ou parcial. Até o momento, foram descritas 44 mutações na fase de leitura aberta (“ORF”) do *SRY*. A grande maioria destas mutações foi encontrada em pacientes com diagnóstico de DG pura XY, mas há relatos de mutações em pacientes com DG parcial XY, hermafroditismo verdadeiro e reversão sexual com função ovariana parcial (revisto por Assumpção *et al.*, no prelo).

A suposição de que mutações no domínio conservado HMG do *SRY* causariam um dano maior à função da proteína produzida, gerando o fenótipo feminino na DG pura, fez com que as investigações dirigissem-se para essa porção do gene. De fato, a grande maioria das mutações descritas dentro do gene está presente no seu domínio conservado (figura 2). Há apenas sete relatos de mutações localizadas na fase de leitura aberta do *SRY* que se situam fora dessa região (revisto por Assumpção *et al.*, no prelo).

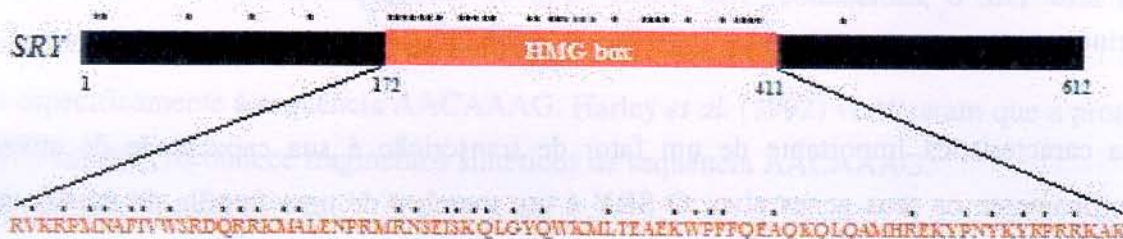


Fig. 2: Posição dos aminoácidos alterados por mutações no gene *SRY* humano.

Dentre os pacientes com sexo reverso foram observados casos nos quais as mutações no *SRY* ocorrem em mais de um indivíduo da mesma família, ou seja, são herdadas (Berta *et al.*, 1990; Jagger *et al.*, 1992; Hawkins *et al.*, 1992; Affara *et al.*, 1993; Tajima *et al.*, 1994; Schimitt-Ney *et al.*, 1995; Bilbao *et al.*, 1996; Hines *et al.*, 1997; Domenice *et al.*, 1998; Imai *et al.*, 1999; Assumpção *et al.*, no prelo).

A frequência de mutações no *SRY* em mulheres com DG é relativamente baixa e, como mencionado, raros são os casos de mutações encontradas associadas a outros distúrbios de diferenciação gonadal. O fato de que a maioria dos pacientes não apresenta mutações no *SRY* pode ser devido a fatores como: (1) ocorrência de mosaicismo; (2) mutações nas sequências que regulam a expressão do *SRY*; (3) mutações nas sequências às quais a proteína *SRY* se liga; (4) mutações em outros genes envolvidos nos processos de determinação e diferenciação do sexo.

No que diz respeito às sequências regulatórias, apesar de existirem algumas descrições de mutações na região promotora do *SRY* (McElreavey *et al.*, 1992; McElreavey *et al.*, 1996; Kwok *et al.*, 1996a; Poulat *et al.*, 1998), esses eventos são raros quando comparados com a frequência de mutação na região codificadora, particularmente no domínio conservado do gene (Schimitt-Ney *et al.*, 1995).

Desta forma, na ausência de mutações no *SRY* faz-se necessário o estudo de outros genes. Há no genoma humano uma série de cópias da sequência consenso à qual a proteína *SRY*

se liga. A maioria desses sítios de ligação não está implicada na determinação testicular, o que torna difícil a identificação dos genes regulados pelo *SRY*. Portanto, outra abordagem tem sido empregada na busca dos genes que participam da determinação sexual: a busca de *loci* envolvidos com síndromes nas quais ocorre reversão sexual.

Vários genes envolvidos no desenvolvimento das gônadas de mamíferos foram identificados, alguns dos quais encontram-se descritos em detalhe nas seções seguintes. Estes genes podem ser divididos em três classes com base na sua ordem de ação. Em primeiro lugar, há aqueles que são necessários para a formação das gônadas bipotentes, tais como *FTZF1* (Luo *et al.*, 1994) e *WT1* (Kreidberg *et al.*, 1993). Em segundo, há genes que determinam se a gônada indiferenciada vai seguir a via masculina ou feminina; estes incluem os genes *SRY* (Sinclair *et al.*, 1990) e *SOX-9* (Wagner *et al.*, 1994). É possível, ainda, que *DAX-1* (Swain *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998) e *WNT-4* (Vainio *et al.*, 1999; Jordan *et al.*, 2001) também atuem nesta etapa. Finalmente, há genes que promovem a diferenciação sexual masculina ou feminina da gônada, uma vez que seu sexo tenha sido determinado; nesse grupo incluem-se os genes *FTZF1* e *WT1* (Nachtigal *et al.*, 1998) e *WNT4* (Vainio *et al.*, 1999; Jordan *et al.*, 2001).

II.3.2 Genes ligados ao X

Duplicações do braço curto do cromossomo X podem inibir o desenvolvimento testicular em indivíduos com cariótipo XY, levando a um fenótipo feminino e disgenesia gonadal pura ou parcial (Bernstein *et al.*, 1980; Ogata *et al.*, 1992; Bardoni *et al.*, 1993; Arn *et al.*, 1994; Bajalica *et al.*, 1995). A menor porção duplicada responsável pela reversão do sexo foi definida como uma região de 160 Kb em Xp21 (Bardoni *et al.*, 1994). Nesse intervalo localiza-se o gene *DAX-1* (Zanaria *et al.*, 1994), que codifica um membro da superfamília de receptores nucleares de hormônios e tem sido considerado o provável responsável por esta reversão sexual sensível à dosagem (DSS).

A expressão do gene *Dax-1* de camundongos está associada com o desenvolvimento do trato genital, da glândula adrenal, do hipotálamo e da glândula pituitária (Swain *et al.*,

1996; Guo *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 1996). Sua expressão tem início na mesma época que a do *SRY* mas ocorre tanto nos embriões XX quanto nos XY. À medida que o desenvolvimento testicular prossegue o gene é reprimido enquanto sua expressão continua ao longo do desenvolvimento ovariano. Camundongos XY transgênicos portadores de cópias extras de *Dax-1* têm o seu desenvolvimento testicular atrasado quando o gene se expressa em altos níveis mas não sofrem reversão sexual. Quando o gene é testado contra alelos “fracos” (*Y poschiavinus*) do gene *Sry*, estes camundongos sofrem reversão sexual completa (Swain *et al.*, 1998). Isso leva a crer que *Dax-1* e *Sry* atuam de forma antagônica.

Com base nesses dados, foi sugerido que a reversão sexual causada pela duplicação de *Dax-1* se desse através da indução de genes responsáveis pelo desenvolvimento do ovário. Entretanto, demonstrou-se que a inativação de *Dax-1* não gerou um fenótipo característico em camundongos XX (Yu *et al.*, 1998).

Apesar de todas as evidências do envolvimento de *DAX-1* com a reversão sexual, duplicações em Xp21.3 não são comuns em mulheres XY. Zanaria *et al.* (1994) hibridizaram o DNA de trinta mulheres XY e todas apresentaram padrão normal de hibridização. Veitia e colaboradores também não encontraram evidências de duplicação em mais de quarenta pacientes estudadas (Veitia *et al.*, 1997b; Veitia *et al.*, 2001).

SOX-3 (“*SRY*-like HMG box protein 3”) também localiza-se no cromossomo X e, embora não exista evidência direta de que este gene esteja envolvido na determinação ou diferenciação do sexo, há a hipótese de que *SOX-3* seja a sequência ancestral do *SRY* (Collignon *et al.*, 1996). Em humanos, *SOX-3* não é necessário para a formação do testículo visto que pacientes com deleções nesse gene são homens (Stevanovic *et al.*, 1993). Contudo, Graves (1998) propôs um modelo de acordo com o qual a proteína *SRY* inibiria o gene *SOX-3*, que por sua vez seria um inibidor de um fator essencial para a determinação testicular.

Além de *DAX-1* e *SOX-3*, outro gene situado no cromossomo X pode estar envolvido com a determinação gonadal. A síndrome de talassemia- α e retardo mental ligada ao X (ATR-X)

é caracterizada por anomalias faciais e genitais (incluindo testículos disgenéticos) e retardo mental grave (Gibbons *et al.*, 1991, 1995a). Gibbons *et al.* (1995b) mostraram que a síndrome ATR-X é causada por mutações no gene *XH2* que pertence a uma família de helicases.

II.3.3 Genes autossômicos

Vários genes autossômicos importantes para a diferenciação do sexo também foram identificados. Alguns desses, tais como *FTZF1* e *WT1*, além de ter uma atuação essencial para o surgimento da gônada, também influenciam etapas posteriores do desenvolvimento gonadal. As proteínas codificadas por estes genes atuam como fatores de transcrição e devem ter um papel amplo na diferenciação embrionária, visto que, quando alteradas dão origem a doenças que afetam outros sistemas além do genital.

A proteína SF-1 é um membro da família de receptores nucleares órfãos. A expressão do gene que a codifica, conhecido como *FTZF1* (localizado em no braço longo do cromossomo 9), é necessária em três momentos ao longo da determinação e diferenciação testicular. Em primeiro lugar, na formação da gônada bipotente; depois, nas células de Sertoli para regular a expressão do gene do hormônio anti-mülleriano (HAM); e mais tarde nas células de Leydig, para regular a expressão de uma série de hormônios esteróides (Shen *et al.*, 1994; Sugawara *et al.*, 1996; Giulli *et al.*, 1997; Crawford *et al.*, 1998).

Camundongos homozigotos para deleções no *Ftz-f1* não desenvolvem gônadas e glândulas adrenais (Luo *et al.*, 1994). Recentemente o seqüenciamento desse gene em uma mulher XY revelou uma mutação que causa reversão sexual completa mesmo em heterozigose, além de causar falha adrenal (Achermann *et al.*, 1999).

O gene *WT1* localiza-se no cromossomo 11. Mutações nesse gene são encontradas em quatro diferentes patologias humanas: tumor de Wilms; síndrome de WAGR (tumor de Wilms, aniridia, malformação genitourinária e retardo mental), síndrome de Frasier e síndrome de Denys-Drash (Gessler *et al.*, 1990; Pelletier *et al.*, 1991; Barbeaux *et al.*,

1997). Embora os fenótipos associados às síndromes mencionadas variem, são freqüentes alterações renais e reversão sexual XY. Além disso, verificou-se que camundongos homozigotos para deleções no gene *Wt-1* não desenvolvem testículos e rins (Kreiberg *et al.*, 1993).

Foi sugerido que *Wt-1* atuaria potencializando a expressão de *Sry* (Hossain e Saunders, 2001). Para tentar determinar se mutações no *WT1* poderiam causar apenas disgenesia gonadal, Nordenskjöld *et al.* (1995) estudaram 27 casos de mulheres XY que não apresentavam alterações no *SRY*; como nenhuma mutação foi detectada, concluiu-se que alterações no *WT1* não são causa freqüente de DG isolada.

Outro fator de transcrição codificado por um gene autossômico tem grande relevância na determinação sexual. Ele pertence à família SOX de proteínas relacionadas ao *SRY*, e é chamado *SOX-9*. Em seres humanos, mutações em heterozigose no gene *SOX-9*, localizado no braço longo do cromossomo 17, estão associados a uma síndrome conhecida como Displasia Camptomélica (Foster e Graves, 1994; Wagner *et al.*, 1994). Esta síndrome caracteriza-se por graves anomalias esqueléticas e uma grande proporção dos pacientes com cariótipo XY são fenotipicamente femininos (Houston *et al.*, 1983; Tommerup *et al.*, 1993).

Nenhum caso de mutação em *SOX-9* resultando em sexo reverso sem Displasia Camptomélica foi relatado. Kwok *et al.* (1996b) analisaram amostras de DNA de 30 pacientes XY com aberrações variadas de desenvolvimento sexual e encontraram apenas um polimorfismo no gene *SOX9*. Meyer *et al.* (1997) estudaram 18 mulheres com DG pura e *SRY* intacto, mas não observaram alterações em *SOX-9*. Esses trabalhos indicam que mutações nesse gene não são freqüentes em pacientes com reversão sexual que não apresentam malformações esqueléticas. De fato, a distribuição das mutações encontradas em *SOX-9* até hoje não indica a existência de um domínio da proteína que seja importante unicamente para o seu papel na determinação do sexo (Koopman, 2001).

O tempo de expressão de *Sox-9* em camundongos é compatível com a possibilidade de que este gene seja diretamente regulado pelo *Sry*. Contudo, há evidências de que *Sox-9* pode induzir a diferenciação das células de Sertoli, mesmo na ausência do *Sry* (Morais da Silva *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2001). Em seres humanos, há um relato de duplicação de *SOX-9* em um único paciente com cariótipo 46,XX e genitália masculina (Huang *et al.*, 1999).

A proteína WNT-4 é uma molécula de sinalização que atua como repressora da determinação gonadal masculina e influencia o desenvolvimento sexual feminino. Em camundongos, a deleção de *Wnt-4* causa masculinização dos fetos XX. *Wnt-4* é inicialmente requerido em ambos os sexos para a formação dos dutos de Muller. A seguir, *Wnt-4* aparentemente suprime o aparecimento das células de Leydig na gônada feminina; conseqüentemente, fêmeas com mutações neste gene têm a síntese de testosterona ativada (Vainio *et al.*, 1999).

Em seres humanos o gene *WNT-4* situa-se no braço curto do cromossomo 1 (Jordan *et al.*, 2001). Esses pesquisadores estudaram uma paciente com genitália ambígua e testículos disgenéticos portadora de um rearranjo em 1p e verificaram que no intervalo duplicado estavam presentes duas cópias de *WNT-4*. Devido à semelhança entre o quadro clínico desta paciente e de indivíduos com duplicações de *DAX-1*, tais autores levantaram a hipótese de que estes dois genes devem atuar em sinergismo na determinação do sexo. De fato, a transfecção de *Wnt-4* em células de Leydig e de Sertoli resultou em um aumento na expressão de *Dax-1* (Jordan *et al.*, 2001). Desta forma é possível que *Sry* iniba *Dax-1* via *Wnt-4*, prevenindo sua função “anti-testículo”.

As alterações relatadas nos principais genes envolvidos na determinação e diferenciação do sexo (figura 3), com exceção do *SRY*, afetam outros órgãos além das gônadas. Por isso é provável que outros genes sejam responsáveis por casos de disgenesia gonadal, ou mesmo de hermafroditismo verdadeiro, quando mutações no *SRY* não são encontradas.

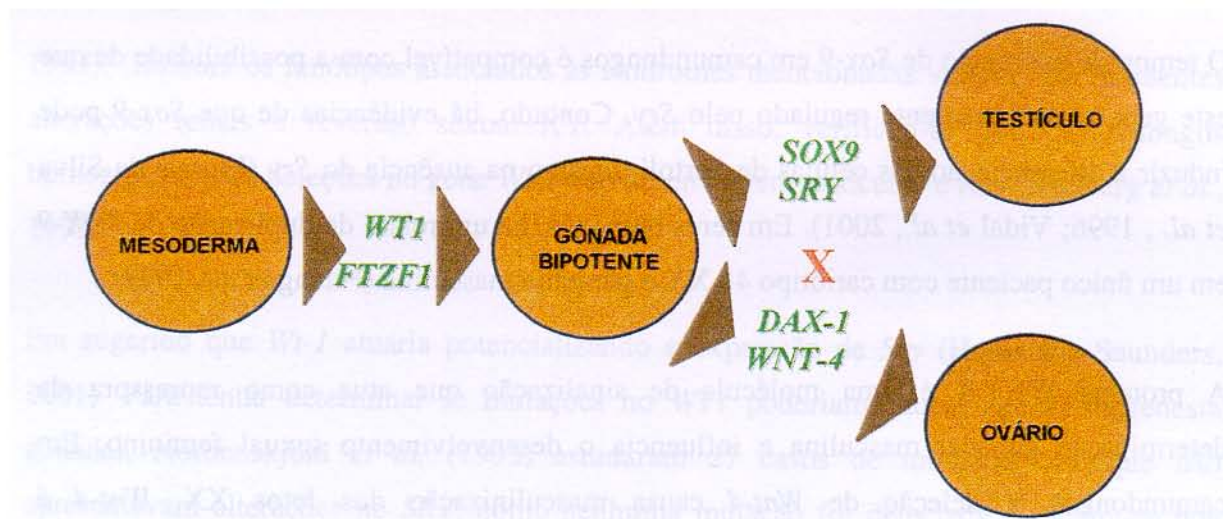


Fig 3: Desenho esquemático dos principais genes responsáveis pela formação da gônada bipotente e pela determinação sexual em humanos.

A busca por tais genes continua concentra-se em regiões de cromossomos autossômicos envolvidas com a reversão sexual. Deleções em heterozigose nos segmentos distais de 9p e 10q podem causar reversão sexual completa ou parcial em mulheres 46,XY (Bennet *et al.*, 1993; Wilkie *et al.*, 1993). Também a duplicação parcial do braço longo do cromossomo 22 foi relatada em um caso de hermafroditismo verdadeiro (Aleck *et al.*, 1999).

II.3.3.1 Gene DMRT1

A importância de 9p no desenvolvimento sexual masculino fica evidente numa revisão de 80 casos publicados de deleções no braço curto do cromossomo 9 visto que 25 dos 60 casos informativos tinham anomalias na genitália externa (Huret *et al.*, 1988).

A reversão sexual XY tem sido observada em um número substancial de indivíduos portadores de rearranjos cromossômicos que resultam em deleção da porção distal do braço curto do cromossomo 9. Os pontos de quebra variam de 9p21 a 9p24 (Jotterand & Juillard, 1976; Fryns *et al.*, 1986; Crocker *et al.*, 1988; Hoo *et al.*, 1989; Magenis *et al.*, 1990; Bennet *et al.*, 1993; McDonald *et al.*, 1997; Ogata *et al.*, 1997; Veitia *et al.*, 1997c; Flejter *et al.*, 1998; Guioli *et al.*, 1998; Ion *et al.*, 1998; Veitia *et al.*, 1998; Raymond *et al.* 1999a; Calvari *et al.*, 2000; Muroya *et al.* 2000).

Grande parte dos pacientes com deleções em 9p e cariótipo XY possui genitália externa feminina ou ambígua e graus variados de disgenesia gonadal, indo desde gônadas formadas por tecido fibroso (disgenéticas) até testículos hipoplásicos. Tal fenótipo sugere a presença de um ou mais genes na porção distal de 9p envolvidos com a diferenciação da gônada masculina.

Deleções relativamente grandes em 9p foram associadas a uma síndrome na qual os pacientes têm fenótipos variados incluindo retardo mental e anomalias craniofaciais. Deleções pequenas em 9p, contudo, podem causar reversão sexual e DG pura ou parcial XY sem outros sintomas associados (McDonald *et al.*, 1997; Veitia *et al.*, 1997c; Flejter *et al.*, 1998; Veitia *et al.*, 1998; Calvari *et al.*, 2000). Isto sugere que a DG e os demais sintomas são causados por perda de genes diferentes.

A análise citogenética e molecular dos casos de reversão sexual em pacientes com deleções em 9p levou à identificação de uma região crítica em 9p24.3. Mapeamentos recentes feitos através do uso de microssatélites refinaram ainda mais este intervalo, localizando-o próximo ao telômero do braço curto do cromossomo 9 (Flejter *et al.*, 1998; Guioli *et al.*, 1998; Veitia *et al.*, 1998). Um paciente descrito por McDonald *et al.* 1997 e posteriormente estudado por (Flejter *et al.* 1998) e Raymond *et al.* (1999a) aparentemente definiu o menor intervalo crítico estimado em 250 kb (Raymond *et al.*, 1999a). No entanto o tamanho dessa região é controverso devido a inconsistências nos dados de mapeamento dos marcadores de microssatélites em 9p (Calvari *et al.*, 2000).

Raymond *et al.* (1998) identificaram um gene humano que se localiza em 9p24.3 e tem sequência similar à de genes que regulam o desenvolvimento sexual de insetos e nematodos. Inicialmente foi isolado o gene *mab-3*, que está envolvido na diferenciação masculina em *C. elegans*, e codifica um domínio de ligação a DNA (domínio DM) que também é encontrado no gene “doublesex” (*dsx*²) de *D. melanogaster*. A análise de bancos de dados revelou um cDNA humano que codifica uma proteína com domínio DM, isolado a partir de uma biblioteca de testículo. Tal gene é chamado *DMRT1* (originalmente denominado *DMT1* – “DM domain gene expresses in testis”) (Raymond *et al.*, 1998). O

gene *DMRT1* tem cinco exons e é previsto que ele codifique uma proteína de 373 aminoácidos com um domínio DM próximo à sua porção N-terminal (Raymond *et al.*, 1999a). Foi demonstrado que em adultos este gene só se expressa em testículos (Raymond *et al.*, 1998).

A seguir, Raymond *et al.* (1999a) identificaram um segundo gene com domínio DM, chamado *DMRT2*, que também se localiza em 9p24.3. Sequências de cDNAs de *DMRT2* foram identificadas em bibliotecas de músculo de mulheres, o que demonstra que a sua expressão é menos restrita que a de *DMRT1*.

Para verificar a possibilidade de que mutações em *DMRT1* e *DMRT2* pudessem interferir na diferenciação sexual, Raymond *et al.* (1999a) sequenciaram toda a região que codifica *DMRT1* em 87 indivíduos com reversão sexual XY e encontraram apenas uma mutação em potencial. Também analisaram o domínio DM do gene *DMRT2* em 54 mulheres XY e não encontraram mutações. Tais dados mostraram que mutações pontuais nestes genes não são causa frequente de reversão sexual XY.

A ausência de mutações em *DMRT1* e *DMRT2* nesses pacientes sugere três possibilidades. A primeira é que tais genes não participam da diferenciação sexual humana. A segunda é que podem existir mutações fora da região sequenciada por Raymond *et al.* (1999) que afetem a expressão dos genes. Alternativamente, a reversão sexual poderia ser causada por hemizigose de ambos os genes. A terceira hipótese parece mais provável já que análises de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) revelaram que as menores deleções descritas até aquele momento removiam tanto *DMRT1* quanto *DMRT2*.

Posteriormente, Calvari *et al.* (2000) indentificaram uma deleção mínima em duas irmãs 46,XY, clonaram e mapearam esta região. Esta análise os permitiu esclarecer a ordem relativa dos marcadores situados em 9p24.3 e definir que a região apagada tem menos de 700 kb. Além disso, foi demonstrado que *DMRT1* e *DMRT2* estão fora desse intervalo; *DMRT1*, no entanto, situa-se a 30kb da deleção e tem sua porção 5' orientada para ela.

Dessa forma, é possível que a deleção interfira com a expressão de *DMRT1* por remover seus elementos regulatórios ou posicionar o gene muito próximo ao telômero.

Calvari *et al.* (2000) também não encontraram mutações após estudarem *DMRT1* em 72 pacientes com reversão sexual XY. Estes autores sugeriram que esse gene pode ser um fator que contribui para reversão sexual ligada a 9p, mas talvez não seja o único; ou que outro gene ainda não descoberto seja responsável por esse fenótipo.

Foi verificado que a região crítica tem uma densidade de genes maior do que se havia antecipado previamente. Ottolenghi *et al.* (2000) seqüenciaram a região que contém os genes *DMRT1* e *DMRT2* e identificaram agrupamentos de ESTs, ilhas CpG e uma nova seqüência que codifica um domínio DM (*DMRT3*).

Apesar da presença de outros genes no intervalo crítico, modelos animais, especialmente a obtenção de “knock-outs” e estudos de expressão de *Dmrt1*, reforçam a importância deste gene na diferenciação da gônada masculina. Assim como em humanos, camundongos com deleções de *Dmrt1* apresentam falha no desenvolvimento testicular acompanhada de morte de células germinativas. Além disso, o efeito da deleção de *Dmrt1* só foi observado em animais XY (Raymond *et al.*, 2000).

Raymond *et al.* (1999b) descobriram que o gene *Dmrt1* é expresso exclusivamente na crista urogenital de camundongos de ambos os sexos nos primeiros estágios da formação das gônadas. Durante a diferenciação da gônada, a expressão de *Dmrt1* é mantida apenas nos embriões masculinos e torna-se restrita aos túbulos seminíferos que estão em formação nos testículos. Em seres humanos, foi demonstrado que *DMRT1* também é expresso na crista urogenital de embriões masculinos e não nos femininos. Além disso, em embriões de sete semanas, *DMRT1* e *SRY* são expressos somente nos túbulos seminíferos em formação (Moniot *et al.*, 2000).

Nas aves, ao contrário dos mamíferos, o sexo feminino é heterogamético (ZW) e o masculino é homogamético (ZZ). Em galinhas, o gene *Dmrt1* é ligado ao Z. Raymond *et al.*

(1999b) mostraram que *Dmrt1* é expresso na crista urogenital e dutos de Wolff pouco antes da diferenciação sexual e é expresso em maiores níveis em embriões ZZ do que ZW. Baseados nesse trabalho e em publicações anteriores, Raymond *et al.* (1999b) sugeriram que genes contendo domínios DM provavelmente têm uma função importante no desenvolvimento sexual de mamíferos, aves, nematodos e insetos.

A expressão gônada-específica de *DMRT1* em camundongos e seres humanos é extremamente interessante, já que o único gene conhecido que participa da determinação do sexo e é expresso exclusivamente na gônada antes de sua diferenciação é o *SRY*. A expressão do *SRY* restringe-se aos embriões masculinos devido à sua localização no cromossomo Y. No entanto, não se sabe o que restringe sua expressão à crista urogenital. Raymond *et al.* (1999b) especulam a possibilidade de *DMRT1* ativar a transcrição do *SRY*. Tal ativação poderia explicar o fenótipo causado em humanos por deleções em 9p somente nos indivíduos com cariótipo XY e também a expressão restrita à gônada do gene *SRY*. Em acordo com esta possibilidade, a expressão de *Dmrt1* em camundongos é detectada no estágio 9,5 em camundongos, quando a crista urogenital começa a se formar, enquanto a expressão do *Sry* começa no estágio 10,5 (Hacker *et al.*, 1995). É importante ressaltar que esse modelo de regulação é hipotético e não existe até o momento evidência experimental que o comprove.

Com exceção de *SRY* e *DMRT1*, todos os genes citados nesta revisão expressam-se nas gônadas e em outros locais no embrião e têm outras funções no desenvolvimento embrionário além da determinação sexual. Não há na literatura relatos de pacientes com DG XY, sem anomalias somáticas adicionais, que tenham alterações em outros genes que não *SRY* e *DMRT1*. É possível que duplicações em *DAX-1* e *WNT4* também sejam compatíveis com este fenótipo, no entanto os casos publicados até o momento envolvem duplicação de porções cromossômicas grandes que estão associadas a uma série de expressões fenotípicas além da disgenesia gonadal. Dessa forma, neste trabalho, estudamos preferencialmente os genes *SRY* e a região cromossômica onde se encontra o gene *DMRT1* para tentar elucidar casos de reversão sexual XY isolada.

III. OBJETIVO

- ✓ Determinar a causa da diferenciação gonadal anormal em pacientes com disgenesia gonadal ou hermafroditismo verdadeiro portadores de cromossomo Y.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar, através de PCR, a presença do gene *SRY*.
- ✓ Procurar mutações na “ORF” do gene *SRY* através de sequenciamento.
- ✓ Nos casos em que forem encontradas mutações que causam troca de aminoácidos, determinar a capacidade de ligação ao DNA das proteínas produzidas a partir dos alelos alterados.
- ✓ Procurar mutações na região promotora do gene *SRY* através de sequenciamento.
- ✓ Investigar a presença de deleções em 9p24.3 através do uso de microssatélites.
- ✓ Investigar a perda de heterozigose no gene *DMRT1* através de “Southern-blotting”.

IV. CASUÍSTICA

Os pacientes foram diagnosticados pelo grupo de médicos do GIEDDS. Todos tiveram o exame de cromatina X em núcleos de células de mucosa oral e o cariótipo a partir de cultura de linfócitos de sangue periférico realizados no laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Genética Médica da FCM-UNICAMP. As anomalias do desenvolvimento gonadal foram classificadas de acordo com Guerra-Jr. (1997), Berkovitz *et al.* (1991) e Marcantonio *et al.* (1994).

A amostra consiste de vinte e dois indivíduos, dos quais dezoito têm disgenesia gonadal e quatro são hermafroditas verdadeiros (tabela 1).

Dentre aqueles que apresentam disgenesia gonadal, um tem cariótipo $^{9}46,X,i(Y)(q11)$. Neste caso específico estão presentes sintomas característicos da síndrome de Turner, conforme descrito em detalhe no Capítulo 1 (artigo 1) deste trabalho. Os demais casos de DG estão associados ao cariótipo 46,XY normal. Dentre eles, três apresentam DG pura 46,XY (mulheres XY típicas) e quatorze têm DG parcial 46,XY.

Dentre os quatro indivíduos com diagnóstico de hermafroditismo verdadeiro, três têm cariótipo 46,XY e um possui uma deleção de parte do braço longo do cromossomo Y [46,X,del(Y)(q11.2)].

Há duas situações nas quais a anomalia é familiar. Três dos pacientes com DG são irmãos (casos 3, 4 e 5), sendo que um deles apresenta DG pura e os demais, DG parcial. Além disso, há um caso de DG pura (caso 1) no qual foi relatada a existência de parentes com ambigüidade genital. Os dados a respeito do diagnóstico, cariótipo, genitália externa e gônadas dos pacientes encontram-se resumidos na tabela 1.

⁹ O cariótipo desta paciente foi originalmente descrito como sendo 46,X,+mar. A definição do cariótipo 46,X,i(Y)(q11) foi feita através de análises moleculares descritas no Capítulo 1 (artigo 1) do presente trabalho.

Tabela 1: Dados de cariótipo e genitália dos pacientes

Caso	Diagnóstico	Cariótipo	Genitália externa (Classificação de Prader) ^a	Posição Gônadas (D / E) ^b	Histologia Gônadas (D / E) ^b
CHP	DG ¹⁰	46,X,i(Y)(q11)	Feminina	A / A ^c	D / D ^e
1	DG pura ^d	46,XY	Feminina	A / A	D / D
2	DG pura	46,XY	Feminina	A / A	D / D
3 ^f	DG pura	46,XY	Feminina	A / A	D / D
4 ^f	DG parcial ^c	46,XY	4	I / A	TD / D ^e
5 ^f	DG parcial	46,XY	4	I / A ^d	TD / D
6	DG parcial	46,XY	4	I / I	TD / ? ^e
7	DG parcial	46,XY	5	A / A	? / D
8	DG parcial	46,XY	5	I / I	TD / TD
9	DG parcial	46,XY	4	I / I	? / TD
10	DG parcial	46,XY	5	I / I	TD / TD
11	DG parcial	46,XY	5	I / A	TD / D
12	DG parcial	46,XY	5	I / (-) ^d	TD / (-)
13	DG parcial	46,XY	5	I / I	TD / TD
14	DG parcial	46,XY	2	I / A	TD / D
15	DG parcial	46,XY	5	A / A	TD / D
16	DG parcial	46,XY	4	I / I	TD / TD
17	DG parcial	46,XY	4	I / A	TD / D
18	HV ^c	46,XY	3	A / A	T / O ^e
19	HV	46,XY	3	LS / A ^d	T / O
20	HV	46,X,del(Y)(q11.2)	4	LS / A	T / O
21	HV	46,XY	3	A / LS	O / T

^a Classificação de ambigüidade genital de acordo com Prader (1954)^b (D / E) = gônada direita / gônada esquerda^c A = abdominal; I = inguinal; (-) = não encontrada; LS = labioescrotal^d DG pura = disgenesia gonadal pura ou completa; DG parcial = disgenesia gonadal parcial ou incompleta; HV = hermafroditismo verdadeiro^e D = gônada disgenética; DT = testículo disgenético; ? = biópsia não realizada; T = testículo; O = ovário^f irmãos.

Dados clínicos dos pacientes nos quais foram encontradas alterações no gene *SRY* (casos 1, 2, 3, 4 e 5) encontram-se descritos em detalhe nos artigos que se seguem (Capítulo 2, artigo 2; Capítulo 3, artigo 3). Dados dos demais indivíduos com disgenesia gonadal parcial estão descritos em Scolfaro *et al.* (2001) (pacientes 1 a 11 e 13 naquele trabalho); e dos hermafroditas verdadeiros são descritos por Guerra-Jr. *et al.* (1998) (pacientes 2, 6, 8 e 9 naquele trabalho), em anexo.

¹⁰ Esta paciente apresenta aberrações de cromossomos sexuais e diagnóstico histológico de disgenesia gonadal pura.

CAPÍTULO 1

AMPLIFICAÇÃO DO GENE SRY

V. AMPLIFICAÇÃO DO GENE *SRY*

A primeira etapa do trabalho consistiu na amplificação do gene *SRY*. Todos os indivíduos estudados, com uma única exceção (paciente CHP), tiveram o *SRY* amplificado por PCR. Tal fato indica que, conforme o esperado, a maior parte dos pacientes com disgenesia gonadal ou hermafroditismo verdadeiro, portadores de cromossomo Y, não apresentam deleção do *SRY*.

A exceção mencionada refere-se à paciente com DG e cariótipo 46,X,i(Y)(q11). Para tentar identificar a estrutura do cromossomo derivado de Y foi feito um estudo detalhado com várias seqüências localizadas ao longo deste cromossomo. Observou-se que havia uma perda total do braço curto (Yp) e dos marcadores do loco centromérico (DYZ3). O cariótipo dos familiares demonstrou que nenhum deles era portador do cromossomo marcador.

Esse é um caso raro visto que a presença do centrômero é importante para que os cromossomos marcadores perpetuem-se ao longo das divisões celulares. Tal achado poderia ser explicado de três formas: i) o centrômero desse marcador poderia ser formado por uma quantidade mínima de DNA alfoide não detectada pelos métodos utilizados; ii) o centrômero poderia ser formado por seqüências centroméricas de outro cromossomo a partir de um evento de translocação; iii) na ausência do DNA alfoide Y-específico outra seqüência de DNA poderia ter assumido a função de centrômero.

A primeira hipótese parece pouco provável já que foram realizados experimentos de “nested-PCR” com a seqüência centromérica e o resultado foi negativo. A segunda explicação também foi descartada após os estudos de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), pois o marcador não mostrou sinal positivo com sondas de centrômero de X e de Y e com a sonda pan-centromérica. A terceira hipótese parece mais provável visto que há na literatura a descrição de casos semelhantes. A análise de imunofluorescência revelou a presença de proteínas centroméricas nesse marcador. Isso mostra que o cromossomo, apesar da ausência do DNA alfoide, possui um centrômero funcional (neocentrômero).

Esta etapa do trabalho foi realizada com a colaboração dos professores Dra. Maria Isabel Melaragno do Depto. de Morfologia (UNIFESP/EPM, SP) e Dr. Peter Warburton do Depto. de Genética Humana (Mount Sinai School of Medicine, New York). Os resultados obtidos culminaram na publicação do artigo: “Identification of a neocentromere in a rearranged Y chromosome with no detectable DYZ3 centromeric sequence” no “American Journal of Medical Genetics”, no prelo.

ARTIGO 1

Identification of a Neocentromere in a Rearranged Y Chromosome With No Detectable DYZ3 Centromeric Sequence

Juliana Godoy Assumpção,¹ Windy Berkofsky-Fessler,² Nilma Viguetti Campos,³ Andréa Trevas Maciel-Guerra,³ Shulan Li,² Maria Isabel Melaragno,⁴ Maricilda Palandi de Mello,¹ and Peter E. Warburton^{2*}

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

²Department of Human Genetics, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York

³Departamento^{Q1} Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

⁴Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia, UNIFESP/EPM, São Paulo, SP, Brasil

An 18-year-old woman was evaluated^{Q2} because of primary amenorrhea and hypogonadism. Chromosome analysis from peripheral blood lymphocytes revealed a nonmosaic 46,X,+mar constitution. The marker was shown to be a rearranged Y chromosome consisting of an inverted duplication of the long arm: *rea*(Y)(qter-q11::q11-qter). Deletion mapping analysis with Y-specific STS showed that the marker lacked Yp and Y-centromeric (DYZ3) sequences, but it was positive for Yq sequences tested. Fluorescence in situ hybridization analysis with Y and X chromosome centromeric and pancentromeric probes showed no hybridization signals. The marker chromosome is present in 100% of the cells; therefore, it is mitotically stable despite the absence of DYZ3 centromeric sequence. Hybridization with CENP-A and CENP-C specific antibodies localized a neocentromere close to the breakpoint.

© 2002 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: chromosomal abnormalities; chromosomal structure/function; clinical cytogenetics; FISH; neocentromere

INTRODUCTION

In eukaryotes, the centromere, cytogenetically defined as the primary constriction, is the site of sister chromatid attachment. It is essential for proper segregation of the chromosomes during mitosis and meiosis [Pluta et al., 1995]. The mammalian centromere contains large amounts of highly repeated satellite DNA, the best characterized of which is alpha-satellite DNA [Manuelidis, 1978^{Q3}].

Alpha-satellite DNA is believed to be important for centromeric function because it is the only type of sequence shown to be present at the primary constriction of all human chromosomes [Manuelidis, 1978]. The introduction of artificial chromosomes carrying alpha-satellite DNA into mammalian cells has demonstrated that this DNA sequence provides some, if not all, information required in cis for the formation of the centromere [Haff et al., 1992; Larin et al., 1994; Harrington et al., 1997; Ikeno et al., 1998].

Conflicting evidence for alphoid satellite as an essential DNA component of functional centromeres has emerged from the study of stable marker chromosomes, which fail to show labeling with specific alpha-satellite DNA probes. These anaphoid chromosomes carry newly derived centromeres (called "neocentromeres") that are apparently formed within interstitial chromosomal sites that have not previously been known to express centromere function [Choo, 1997; Warburton et al., 2000]. Moreover, in human dicentric chromosomes, the alpha-satellite DNA is present on both the active and inactive centromeres, suggesting that the presence of alpha satellite per se is insufficient to determine centromere function [Earnshaw et al., 1989; Warburton, 2001].

Five constitutive centromere-binding proteins have been implicated in centromere function: CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-G and CENP-H. Three of them (CENP-A, -C and -H) associate specifically with active centromeres, that is, are present on normal centromeres and neocentromeres and absent from inactive

Grant sponsor: Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq); Grant sponsor: National Institutes of Health; Grant numbers: R01, GM61150.

*Correspondence to: Dr. Peter E. Warburton, Department of Human Genetics, Box 1498, Mount Sinai School of Medicine, 1425 Madison Avenue, East Building 14-52A, New York, NY 10029. E-mail: peter.warburton@mssm.edu

Received 14 November 2001; Accepted 28 April 2002

DOI 10.1002/ajmg.10701

Published online 00 Month 2002 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)

© 2002 Wiley-Liss, Inc.

centromeres [reviewed by Warburton, 2001]. These CENPs may be responsible for the establishment of an epigenetic mark, which determines the propagation of human centromeres at particular chromosome locations.

One effective genetic approach to the learning about mammalian centromeres is to examine structurally rearranged chromosomes with abnormal centromeres. We report on an unusual rearranged Y chromosome with no detectable alphoid DNA bearing a functional neocentromere close to the breakpoint.

PATIENTS AND METHODS

Patient Description

An 18-year-old girl was referred to us due to primary amenorrhea and hypogonadism. She was born at term to nonconsanguineous and healthy parents. She had two healthy sibs (a 10-year-old sister and a 5-year-old brother). Family history was unremarkable. There was a history of a slight delay on motor and speech development, learning difficulties, and nocturnal enuresis. When she was 4 years old, a left inguinal hernia surgery was performed.

On physical examination, there was normal height (162 cm) and weight (64.4 kg), macrocephaly (head circumference = 59 cm), M-shaped nuchal hairline, posterior rotation of the ears, prominent forehead, a diffuse goiter, widely spaced nipples, cubitus valgus, short fourth and fifth metacarpals and fifth metatarsals, high frequency of whorl pattern on fingertips, a right simian crease, and clinodactyly of the fifth toes. There was no breast development, external genitalia were female, gonads were not palpable, and pubic hair was on Tanner stage IV with a female distribution.

Laboratory investigation showed high levels of follicle-stimulating hormone (68.7 mIU/mL) and luteinizing hormone (42.1 mIU/mL), low levels of estradiol (12 pg/mL) and total testosterone (1.5 ng/mL), normal levels of thyroid-stimulating hormone (0.61 μ UI/mL) and free thyroxine (1.23 ng/dL), and negative thyroid peroxidase and thyroglobulin antibodies. Bone age was 14 years, and there was lumbar osteopenia. Echocardiogram showed mitral valve prolapse. Ultrasonography revealed hypoplastic uterus (4.95 cm³) and the gonads were not detected. Bilateral gonadectomy was performed and histology revealed streak gonads.

Cytogenetic and FISH Studies

Cytogenetic analysis was performed on metaphase chromosomes obtained from PHA^{Q5}-stimulated peripheral blood lymphocytes using GTG, CBG and QFQ-banding. One hundred cells were analyzed. Fluorescence in situ hybridization (FISH) to metaphase cells using alpha-DNA satellite probes for X and Y chromosomes (DXZ1 and DYZ3, Oncor), X-painting probe (COATSOME⁺ X, Oncor), and human alpha-satellite pancentromere probe (Vysis^{Q6}) were performed according to the manufacturer's instructions. Probe HY10 consists of a 3.4-kb Y-specific repeat, which is a major component of the Y heterochromatic long arm [Nakahori

et al., 1986]. Immunofluorescence using antibodies to CENP-A or CENP-C and simultaneous FISH with probe HY10 were performed essentially as described [Warburton et al., 1997, 2000].

Molecular Studies

DNA was extracted from peripheral blood [Sambrook et al., 1989]. The sequences TSPY and DYZ3 were investigated by polymerase chain reaction (PCR) using external primers as in Binder et al. [1995]. DYZ3 sequence was reamplified in a nested-PCR reaction with internal primers [Binder et al., 1995]. The following Y-specific STS—sy81, sy86, sy151, sy117, sy143, sy254, sy255—were analyzed by PCR as described by Vollrath et al. [1992] and Reijo et al. [1995]. The presence of the SRY gene was investigated with primers XES10 and XES11 [Hawkins et al., 1992]. Each PCR contained normal female and male controls. A female operator performed all reactions, including DNA extraction.

RESULTS

Chromosome analysis from peripheral blood lymphocytes with G-, Q-, and C-banding revealed a nonmosaic 46,X,+mar constitution. The marker consisted of two blocks of Q-positive heterochromatin separated by a region of Q-negative euchromatin. C-banding also revealed positive bands on both marker extremities. The banding patterns suggested that the marker might be an i(Yq). The karyotype of her brother was normal (46,XY), as well as that of her sister (46,XX). Although the father was not available for examination, the presence of a normal Y chromosome in the karyotype of the brother suggests that the formation of this Y rearranged chromosome occurred de novo, assuming same paternity of the sibs.

Molecular techniques were employed to confirm the Y origin of the marker, and a deletion map was established (Fig. 1). PCR studies showed positive results for all Yq sequences tested. However, Yp (SRY, TSPY) and Y centromeric (DYZ3) sequences tested negative. DYZ3, which corresponds to the chromosome Y centromeric alpha-satellite DNA, was assayed by nested PCR and the result was negative. The marker was therefore interpreted as a re(Y)(qter-q11.2::q11.2-qter^{Q7}).

FISH experiments were carried out to search for possible centromere sequences within this marker. The marker failed to show labeling with X and Y centromeric probes and with X painting probe (data not shown). FISH with a human pancentromeric probe (Vysis) showed hybridization to all normal centromeres but not to the marker (Fig. 2a). CENP-C- and CENP-A-specific antibodies were shown to stain a region at or near the center of the chromosome, close to the breakpoint (Fig. 2b,c).

DISCUSSION

We report in this article a rearranged Y chromosome found in a patient with a 46,X,rea(Y)(qter-q11.2::q11.2-qter) chromosomal constitution. This rearranged Y chromosome is present in 100% of peripheral blood cells

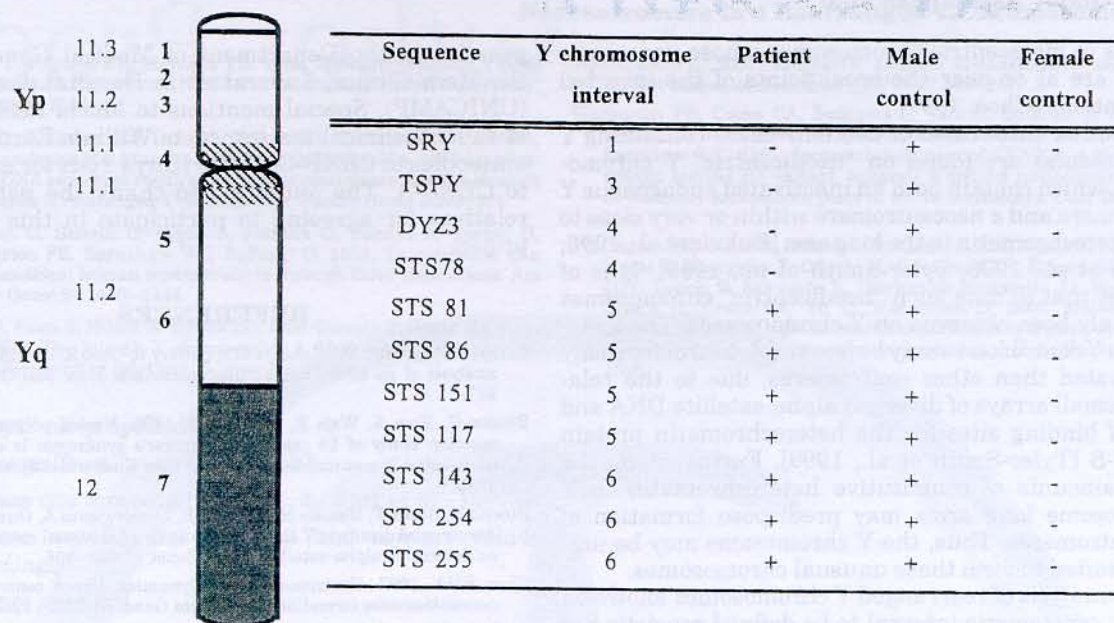


Fig. 1. Molecular map of the rearranged Y chromosome (+, sequence present; -, sequence absent).

and therefore has been efficiently retained through cell divisions despite the absence of the endogenous centromere region. The presence of a neocentromere on this marker was confirmed by the absence of detectable alpha-satellite DNA and the presence of CENP-A and CENP-C (Fig. 2). This marker chromosome raises the question of the functional requirements for centromere formation.

Four neocentromeres have been reported on derivative Y chromosomes. One previously reported neocentric Y chromosome was similar to the one reported here, although apparently contained slightly less euchromatic material (Fig. 1) [Floridia et al., 2000]. This marker consisted of an inverted duplication of the long arm heterochromatin and a small amount of euchromatin, with deletion of the endogenous Y centromere and

alpha-satellite DNA [Floridia et al., 2000]. The centromeric protein-binding domain in this marker was shown to be located within the DAZ gene cluster in Yq11.2. This chromosomal region is deleted in some infertile males [Reijo et al., 1995].

Thus, in the two reported cases of inverted duplication neocentric Y chromosome derivatives, the neocentromere appears to be found in the euchromatic DNA at or near the breakpoint [Floridia et al., 2000] (Fig. 2b,c). These chromosomes are consistent with the most common mechanism for the formation of anaphoid marker chromosomes, the de novo inverted duplication of distal segments of chromosomes, resulting in mirror-image chromosomes [Choo, 1997; Warburton et al., 2000]. In the majority of these cases, the neocentromeres are found on one of the duplicated arms, although there are

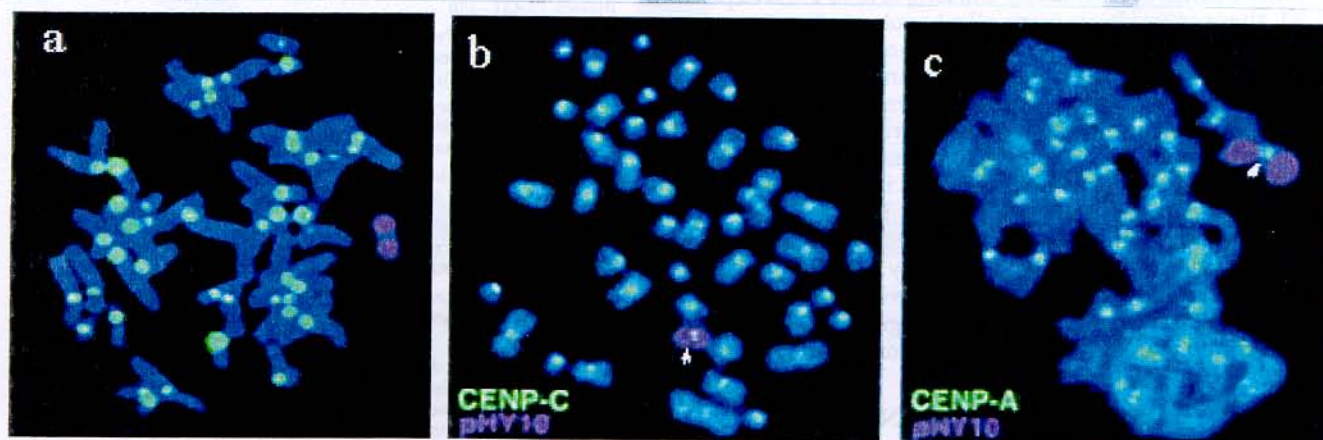


Fig. 2. Identification of alphoid DNA sequences and centromeric proteins. a: Fluorescence in situ hybridization (FISH) with a pancentromeric probe is shown in green and the derivative Y chromosome is identified by FISH using probe HY10 in pink. Immunofluorescence using antibodies to CENP-C (b) or CENP-A (c) is shown in green and the derivative Y chromosome is identified by FISH using probe HY10 in pink.

reports of metacentric chromosomes whose neocentromeres are at or near the breakpoints of the inverted duplications [Choo, 1997].

The other three cases of neocentromere-containing Y chromosomes are found on "neodicentric" Y chromosomes, which contain both an inactivated endogenous Y centromere and a neocentromere within or very close to the heterochromatin in the long arm [Bukvic et al., 1996; Rivera et al., 1996; Tyler-Smith et al., 1999]. It is of interest that to date such "neodicentric" chromosomes have only been observed on Y chromosomes. The endogenous Y centromeres may be less stable and more easily inactivated than other centromeres, due to the relatively small arrays of diverged alpha-satellite DNA and lack of binding sites for the heterochromatin protein CENP-B [Tyler-Smith et al., 1999]. Furthermore, the large amounts of constitutive heterochromatin in Y chromosome long arms may predispose formation of neocentromeres. Thus, the Y chromosome may be uniquely suited to form these unusual chromosomes.

The analysis of rearranged Y chromosomes allowed a mitotic centromeric interval to be defined consisting of approximately 150 kb of the alphoid array and about 300 kb of Yp adjacent short arm sequences [Tyler-Smith et al., 1993]. YACs^{Q8} containing human Y alphoid DNA were introduced into hamster and human cells and reformed several of the properties of a centromere [Larin et al., 1994]. This suggests that Y alphoid DNA contains the information required to specify some of the centromeric functions. However, human markers with neocentromeres that contain no detectable alpha-satellite DNA indicate that this DNA is not mandatory for centromere function [Choo, 1997; Warburton et al., 2000]. The detailed analysis of a human chromosome 10-derived neocentromere revealed that the neocentromere sequence is not similar to known centromeric sequences. It is possible that the overall composition and distribution patterns of various unknown functional elements, or any "ordinary" DNA under appropriate epigenetic influences, determine centromere formation and function [Barry et al., 1999; Lo et al., 2001].

Hsu [1994] reviewed seven nonmosaic cases of monocentric isochromosomes for the long arm of Y. As expected, these individuals were all phenotypic females with sexual infantilism since they lack the *SRY* gene. Streak gonads were reported in all cases in which this information was available, whereas Turner syndrome (TS) features and short stature were described in at least half of them. Therefore, the female phenotype, the normal height, and the TS features found in our patient are in accordance with her karyotype. It is not clear yet whether the slight delay in motor and speech development observed in childhood has any relation with the chromosomal rearrangement observed. Further characterization of patients with rearranged Y chromosomes might help to clarify these observations.

ACKNOWLEDGMENTS

J.G.A. has a Ph.D. grant from Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq). The authors thank the members of both the Laboratory of Cyto-

genetics in the Department of Medical Genetics and the Main Clinical Laboratory in Hospital das Clínicas (UNICAMP). Special mentions to Maria Madalena V. Rosa for technical assistance, to William Earnshaw for antibodies to CENP-C, and to Kinya Yoda for antibodies to CENP-A. The authors also thank the patient and relatives for agreeing to participate in this research project.

REFERENCES

- Barry AE, Howman EV, Cancilla MR, Saffery R, Choo KHA. 1999. Sequence analysis of an 80 kb human neocentromere. *Hum Mol Genet* 8:217–227.
- Binder G, Kich A, Wajs E, Ranke MB. 1995. Nested polymerase chain reaction study of 53 cases with Turner's syndrome: is cytogenetically undetected Y mosaicism common? *J Clin Endocrinol Metab* 80:3532–3535.
- Bukvic N, Susca F, Gentile M, Tangari E, Ianniruberto A, Guanti G. 1996. An unusual dicentric Y chromosome with a functional centromere with no detectable alpha-satellite. *Hum Genet* 97:453–456.
- Choo KHA. 1997. Centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromeres formation. *Am J Hum Genet* 61:1225–1233.
- du Sart D, Cancilla MR, Earle E, Mao J, Saffery R, Tainton KM, Kalitsis P, Martyn J, Barry AE, Choo KHS. 1997. A functional neo-centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA. *Nature Genet* 16:144–153.
- Earnshaw WC, Ratrie H, Steeten G. 1989. Visualization of centromere proteins CENP-B and CENP-C on a stable dicentric chromosome in cytologica spreads. *Chromosoma* 98:1–12.
- Florida G, Gimelli G, Zuffardi O, Earnshaw WC, Warburton PE, Tyler-Smith C^{Q9}. 2000. A neocentromere in the *DAZ* region of the human Y chromosome. *Chromosoma* 109:318–327.
- Haff T, Warburton PE, Willard HF. 1992. Integration of human alpha-satellite DNA into simian chromosomes: centromere protein binding and disruption of normal chromosome segregation. *Cell* 70:681–696.
- Harrington JJ, Bokkelen GV, Mays RW, Gustashaw K, Willard HF. 1997. Formation of *de novo* centromeres and construction of first-generation human artificial minichromosomes. *Nature Genet* 15:345–355.
- Hawkins JR, Taylor A, Berta P, Levilliers J, Van der Auwera B, Goodfellow PN. 1992. Mutational analysis of *SRY*: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum Genet* 88:471–474.
- Hsu LYF. 1994. Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am J Med Genet* 53:108–140.
- Ikeno M, Grimes B, Okazaki T, Nakano M, Saitoh K, Hoshino H, McGill NI, Coode H, Masumoto H. 1998. Creation of human artificial chromosomes by introduction of YACs retrofitted with human telomeric DNA. *Nat Biotech* 16:431–439.
- Larin Z, Fricker MD, Tyler-Smith C. 1994. *De novo* formation of several features of a centromere following introduction of a Y alphoid YAC into mammalian cells. *Hum Mol Genet* 3:689–695.
- Lo AW, Craig JM, Saffery R, Kalitsis P, Irvine DV, Earle E, Magliano DJ, Choo KH. 2001. A 330 kb CENP-A binding domain and altered replication timing at a human neocentromere. *EMBO J* 20:2087–2096.
- Manuelidis L. 1978. Chromosomal localisation of complex and simple repeated human DNAs. *Chromosoma* 66:23–32.
- Nakahori Y, Mitani K, Yamada M, Nakagome Y. 1986. A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides. *Nucl Acids Res* 14:7569–7580.
- Pluta AF, Mackay AM, Ainsztein AM, Goldberg IG, Earnshaw WC. 1995. The centromere: hub of chromosomal activities. *Science* 270:1591–1594.
- Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Satraus D, Hovatta O, de la Chapelle A, Siber S, Page DC. 1995. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 10:383–393.
- Rivera H, Vasquez AI, Ayala-Madriz ML, Ramirez-Duenas ML, Davalos IP. 1996. Alphoidless centromere of a familial unstable inverted Y chromosome. *Ann Genet* 39:236–239.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TE. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Tyler-Smith C, Oakey RJ, Larin Z, Fisher RB, Crocker M, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Muenke M, Zuffardi O, Jobling MA. 1993. Localization of DNA sequences required for human centromere function through an analysis of rearranged Y chromosomes. *Nature Genet* 5:368-375.
- Tyler-Smith C, Gimelli G, Giglio S, Floridia G, Pandya A, Terzoli G, Warburton PE, Earnshaw WC, Zuffardi O. 1999. Transmission of a fully functional human neocentromere through three generations. *Am J Hum Genet* 64:1440-1444.
- Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC. 1992. The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 258:52-59.
- Warburton PE. 2001. Epigenetic analysis of kinetochore assembly on variant human centromeres. *TIG* 17:243-247.
- Warburton PE, Cooke CA, Bourassa S, Vafa O, Sullivan B, Stetten G, Gimelli G, Warburton D, Tyler-Smith C, Sullivan KF, Poirier GG, Earnshaw WC. 1997. Immunolocalization of CENP-A, a kinetochore-specific histone H3 variant, suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr Biol* 7:901-904.
- Warburton PE, Dolled M, Mahmood R, Alonso A, Li S, Naritomi K, Tohma T, Nagai T, Hasegawa T, Ohashi H, Govaerts LCP, Eussen BHJ, Hemel JOV, Lozzio C, Schwartz S, Dowhanick-Morisette JJ, Spinner NB, Rivera H, Crolla JA, Yu C, Warburton D. 2000. Molecular cytogenetic analysis of eight inversion duplications of human chromosome 13q that each contain a neocentromere. *Am J Hum Genet* 66:1794-1806.

Q1: "Dept." ok as spelled out?

Q2: Change (from "ascertained") ok?

Q3: Please cite somewhere in text: du Sart et al., 1997.

Q4: Please use SI unit (pmol/L) and convert values accordingly.

Q5: Please spell out.

Q6: Please add location of manufacturer.

Q7: Double colon ok?

Q8: Spell out YACs?

Q9: OK as edited?

Q10: Please use Index Medicus abbreviation (if this is Trends in Genetics, abbreviate as Trends Genet)

CAPÍTULO 2

ESTUDO DO QUADRO DE LEITURA ABERTA DO GENE *SRY*

VI. ESTUDO DO QUADRO DE LEITURA ABERTA DO GENE *SRY*

Primeiramente foi estudada a região conservada do gene *SRY* (“HMG box”). Dentre os 21 pacientes que tiveram amplificação positiva para o *SRY*, apenas uma com disgenesia gonadal pura 46,XY apresentou alteração nessa região (paciente 2). A mutação foi identificada no nucleotídeo 193 e causa a mudança de um códon de asparagina para histidina (N65H). Apesar de não ter sido possível coletar amostra de sangue do pai da paciente para comprovar que não se trata de um polimorfismo, as evidências indicam que a mutação é responsável pelo fenótipo.

Em seguida toda a porção codificadora do gene *SRY* foi seqüenciada. Ao final dessa etapa, foi encontrada uma mutação em três indivíduos de uma mesma família (pacientes 3, 4 e 5). A substituição de uma guanina por uma timina no nucleotídeo 89 muda uma arginina para uma isoleucina no codon 30 (R30I), localizado fora do domínio conservado HMG. A análise de DNA de outros membros da família revelou que o pai e irmãos não afetados também eram portadores da mutação. Esta mutação afeta um sítio de fosforilação pela enzima PKA. Um experimento de ASO-PCR com a seqüência mutante mostrou que ela está ausente em 100 indivíduos da população controle, o que reduz a possibilidade de que essa variante seja um polimorfismo.

Para comprovar que as mutações estão de fato associadas aos fenótipos observados, foram realizados estudos funcionais. Os alelos normal e mutantes foram clonados no vetor de expressão pET-28a (Novagen) e as proteínas mutantes, bem como a selvagem, foram expressas em *E. coli*. Em primeiro lugar, testou-se a fosforilação destas proteínas. Verificou-se que a proteína *SRY*^{R30I} não é fosforilada por PKA. A seguir testou-se a capacidade de ligação ao DNA alvo contendo a seqüência consenso à qual o *SRY* liga-se. Para tanto, foram realizadas análises de alteração no padrão de mobilidade eletroforética (“EMSA” ou “gel shift”). Os resultados obtidos indicaram que as mutações descritas afetam a capacidade do *SRY* de ligar-se ao DNA.

Parte desta etapa do trabalho foi realizada no Centro de Biologia Molecular Estrutural - Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS), em colaboração com o professor Dr. Celso Eduardo Benedetti. Os dados obtidos resultaram na publicação do artigo: “Novel mutations affecting *SRY* DNA-binding activity: the HMG box N65H associates with 46,XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-HMG box R30I associated with variable phenotypes”, *Journal of Molecular Medicine*, no prelo.

ARTIGO 2

NOVEL MUTATIONS AFFECTING SRY DNA-BINDING ACTIVITY: THE HMG BOX N65H ASSOCIATED WITH 46,XY PURE GONADAL DYSGENESIS AND THE FAMILIAL NON-HMG BOX R30I ASSOCIATED WITH VARIABLE PHENOTYPES

ASSUMPÇÃO JG¹, BENEDETTI CE², MACIEL-GUERRA AT³, GUERRA JR G³, SCOLFARO MR³, DE MELLO M P¹(✉) .

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); ²Centro de Biologia Molecular Estrutural – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS); ³Grupo Interdisciplinar de Estudos de Distúrbios da Diferenciação do Sexo (GIEDDS) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

Running title: novel *SRY* mutations

Correspondence to:

Dra. Maricilda Palandi de Mello

CBMEG, UNICAMP

Caixa Postal 6010

13083-970 Campinas, SP, Brasil.

TeleFAX: 55 19 3788 1089

Telephone: 55 19 3788 1146.

e-mail: mmello@unicamp.br

SUMMARY

The *SRY* gene (sex-determining region of the Y chromosome) initiates the process of male sex differentiation in mammals. In humans, mutations in the *SRY* gene have been reported to account for 10 to 15% of the XY sex reversal cases. We describe here two novel missense mutations in the *SRY* gene after the screening of 17 patients, including 3 siblings, with 46,XY gonadal dysgenesis and 4 true hermaphrodites. One of the mutations, an A to C transversion within the HMG box, causes the N65H substitution and it was found in a patient presenting 46,XY pure gonadal dysgenesis. The *E. coli* expressed *SRY*^{N65H} protein did not present DNA-binding activity *in vitro*. The other mutation, a G to T transversion, causes the R30I substitution. This mutation was found in affected and non-affected members of a family, including the father, two siblings with partial gonadal dysgenesis, a phenotypic female with pure gonadal dysgenesis and three non-affected male siblings. The G to T base change was not found in the *SRY* sequence of 100 normal males screened by ASO-PCR. The R30I mutation is located upstream to the HMG box, within the ²⁹RRSSS³³ phosphorylation site. The *E. coli* expressed *SRY*^{R30I} protein was poorly phosphorylated and consequently showed reduced DNA-binding capacity *in vitro*.

Key words: SRY; 46,XY gonadal dysgenesis; 46,XY sex reversal; mutations; sex determination.

INTRODUCTION

The condition named 46,XY gonadal dysgenesis includes a complete (pure) and a partial form. Pure gonadal dysgenesis in 46,XY individuals is characterized by a female phenotype with full development of unambiguous female genitalia, normally developed Müllerian structures, and streak gonads. By contrast, 46,XY partial gonadal dysgenesis is characterized by partial testicular differentiation and ambiguous genitalia. The gonadal histology frequently consists of hypoplastic testicular tubules intermixed with areas of ovarian stroma. Internal ducts typically consist of a combination of Wolffian and Müllerian ducts [1]. According to Berkovitz *et al.* [1], patients with XY partial gonadal dysgenesis may present a range in the extent of testicular development characteristics and may have bilateral dysgenetic testes or a dysgenetic testis and a streak gonad. More recently, other authors referred to the former condition as partial testicular dysgenesis and to the latter as asymmetric gonadal differentiation [2]. All patients with 46,XY gonadal dysgenesis have an increased risk of gonadal neoplastic transformation [3]. In turn, true hermaphrodites are characterized by the presence of both ovarian tissue with mature graafian follicles and testicular tissue with distinct seminiferous tubules in the same individual. Ambiguity of external genitalia is a frequent feature, although external genital development

can range from almost normal female to almost normal male. Müllerian and Wolffian ducts can be present in different degrees of development [4].

Male to female sex reversal in individuals bearing a 46,XY chromosomal constitution results from failure of testis development, which may be due to mutations in the *SRY* gene [5, 6]. The Y-chromosome-located *SRY* gene encodes a small testis-specific protein containing a DNA-binding motif known as the HMG (high mobility group) box, which is found in a number of transcription factors [6]. The *SRY* protein is assumed to regulate other genes involved in the male determination pathway. Mutations in *SRY* have been considered to account for only 10 to 15% of the cases of 46,XY gonadal dysgenesis [7, 8]. The remaining patients may bear mutations in the *SRY* regulatory elements or in other genes involved in the sexual differentiation pathway.

To date, 42 different mutations, including point mutations, frameshifts and deletions, have been identified within the *SRY* open reading frame (ORF) (table I). Most of them are located within the HMG box [8], although a few have been reported outside of this domain [9-14, 42]. Mutations in the *SRY* almost always result in 46,XY unambiguous females with no testicular differentiation, however there are reports on true hermaphrodites [15, 24] and patients with partial gonadal dysgenesis [12, 40] or partial ovarian function [9] with mutant *SRY*.

Here we describe two novel missense mutations, one was found within the *SRY* HMG box in a patient with 46,XY pure gonadal dysgenesis and the other, located outside the HMG box, is familial and is associated with variable phenotypes. Moreover, we demonstrate that both mutations affect *SRY* function *in vitro* by altering DNA-binding activity.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Informed consent was obtained from all patients and control individuals studied. We classified abnormalities of testicular development according to Berkovitz *et al.* [1] and Marcantonio *et al.* [44]. The sample consisted of twenty-one Brazilian patients, three with pure 46,XY gonadal dysgenesis,

fourteen with 46,XY partial gonadal dysgenesis, and four true hermaphrodites (three 46,XY and one 46,X,delYq). Three of the patients are siblings, two of each presenting XY partial gonadal dysgenesis and one presenting XY pure gonadal dysgenesis. Among the 14 patients with partial gonadal dysgenesis, four developed bilateral dysgenetic testes, six had a streak gonad and a contralateral dysgenetic testis, one had a dysgenetic testis and a contralateral regression of the testis and the remaining three had only one of the gonads analyzed (one streak gonad and two dysgenetic testes).

Clinical and hormonal data from patients 2, 3, 4 and 5, who were found to bear *SRY* mutations, are described in detail below. Clinical and hormonal data from the true hermaphrodites were described in Guerra-Jr *et al.* [4] (their patients 2, 6, 8 and 9) and from the remaining partial gonadal dysgenesis patients, were reported by Scolfaro *et al.* [45] (their patients 1 to 11 and 13).

Patient 2, a 25 year-old woman, born to unrelated parents, was referred to us because of primary amenorrhoea and hypogonadism. She has 5 brothers and 2 sisters, all of them healthy and both girls experienced spontaneous menses. There was no history of other similarly affected relatives. At the age of 18, the patient's menses and secondary sexual characteristics were induced by sex hormone replacement, which was later on discontinued. On physical examination, her height was 171.8 cm and weight 72.8 kg. There was no dysmorphic picture, the external genitalia were female, and breast and pubic hair development were both at Tanner stage 5. Laboratory investigation showed a 46,XY karyotype and high levels of FSH (67.5 mIU/mL) and LH (43.5 mIU/mL). The diagnosis of 46,XY pure gonadal dysgenesis led to the surgical removal of the gonads to prevent malignancy. Microscopic study of both gonads revealed an ovarian-like stroma, absence of germ cells, and hilus cell hyperplasia.

Patients 3, 4 and 5 are siblings. Patient 4 (the proband), a four-year-old boy, was first evaluated when he was eight days old because of genital ambiguity. He was the tenth child born to healthy unrelated parents. According to the parents, a paternal aunt exhibited similar condition, but she could not be examined (for pedigree data see figure 2). On physical examination, there was a 2.5 cm phallus with a chordee, a penoscrotal urethral meatus and complete fusion of labioscrotal folds; the left gonad was not palpable and the right gonad was in the inguinal region. Laboratory studies showed a 46,XY karyotype, high LH (2.5 mIU/mL) and FSH (6.9 mIU/mL) levels; low total (0.45 ng/mL) and free testosterone (0.86 pg/mL) without increment after 3 days of hCG administration (2000 IU per day); low oestradiol (6 pg/mL) levels; normal androstenedione (1.76 ng/mL) and 17-OH-progesterone (4.5 ng/mL) levels. Genitography revealed urogenital sinus, uterus and left tube whereas laparoscopy

showed a left streak gonad with an ovarian-like stroma and the absence of germ cells, unilateral fallopian tube and hypoplastic uterus; the right gonad was a prepubertal testis. The diagnosis was 46,XY partial gonadal dysgenesis.

His younger brother, patient 5, was referred to us at the age of ten days presenting similar clinical features. Laboratory investigation showed a 46,XY karyotype; high LH (12.5 mIU/mL) and FSH (28.5 mIU/mL) levels; low levels of total and free testosterone and oestradiol (20 pg/mL). Pelvic sonography showed the presence of uterus and vagina. Laparoscopy revealed a left streak gonad with an ovarian-like stroma and absence of germ cells, unilateral fallopian tube and hypoplastic uterus; the right gonad was a prepubertal testis. These data were also in accordance with a diagnosis of 46,XY partial gonadal dysgenesis.

The remaining siblings (five males and five females) were also clinically evaluated and presented no signs of sexual ambiguity. One of the sisters, an 18-year-old girl (patient 3), presented amenorrhoea and lack of secondary sexual characteristics. Laboratory studies showed a 46,XY karyotype; high FSH (117 mIU/mL) and LH (15.3 mIU/mL) levels; low total (<0.2 ng/mL) and free (<0.6 pg/mL) testosterone levels, without increment after 3 days of hCG administration. Following gonadectomy, the microscopic study of both gonads revealed an ovarian-like stroma and absence of germ cells. The diagnosis was of 46,XY pure gonadal dysgenesis.

Molecular studies

SRY amplification and sequence analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using standard techniques [47] and from dysgenetic gonadal tissue of patient 4 according to Ausubel *et al.* [48]. PCR reactions were performed with 0.5 µg genomic DNA, 10% DMSO, 200 µM each dNTP, 0.5 µM each primer, 1X Taq buffer solution (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and 1.5 units Taq DNA polymerase (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Each PCR contained female and male normal control DNA. The *SRY* conserved domain was amplified with primers SRY1 (5'-cattgtcgacCAGTGTGAAACGGGAGAAAACA-3') and SRY4 (5'-cattgtcgacGTACAACCTGTTGTCCAGTTGC-3') generating a 380 bp fragment. After a five minute initial denaturing step, amplification was performed according to the following steps: 94°C for 45s,

60°C for 30s, 72°C for 30s (30 cycles). The *SRY* open reading frame was amplified and sequenced with primers XES10 and XES11 described by Hawkins *et al.* [19]. The cycling profile was: 94°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min (30 cycles).

Five µL of *SRY* amplification product were directly sequenced using the Thermo-sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Sequencing was carried out twice with products from different PCR reactions and with both sense and antisense primers to confirm the results.

Allele-specific oligonucleotides (ASO) were designed to perform an ASO-PCR screening for one of the mutations. The DNA samples from 100 male blood donors were analyzed by ASO-PCR assay for the T nucleotide at the position 89. Primers used to amplify the mutant sequence were: XES10 and SRYT499 (5'-GTGCAAAGGAAGGAAGAGCTTA-3') under the same conditions as described for XES10/XES11 reactions. Primers used to confirm the presence of the normal sequence were: XES10 and SRYG499 (5'-GTGCAAAGGAAGGAAGAGCTTC-3'). The amplification mix consisted of 0.5 µg genomic DNA, 10% DMSO, 200 µM each dNTP, 0.5 µM each primer, 1X Taq buffer solution (LifeTechnologies, Rockville, MD), 0.5 mM MgCl₂ and 1.5 units of Taq DNA polymerase (LifeTechnologies, Rockville, MD). The cycling profile was 94°C for 5 min; 94°C for 1 min, 60°C for 45s, 72°C for 45s (30 cycles); and a final extension step of 72°C for 7 min.

***E. coli* expression and purification of SRY proteins**

DNA encoding the *SRY* gene was amplified by PCR using 0.5 µg genomic DNA, 5% DMSO, 200 µM each dNTP, 1X Taq buffer solution (Amersham-Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden), 1.5 units of Platinum Taq DNA polymerase (LifeTechnologies, Rockville, MD), 0.5 µM of forward primer SRYs*NdeI* (5'- TGCATATGCAATCGTATGCTTC-3') and reverse primer SRYa*BamHI* (5'- GTTACCCGAGGATCCTACAGC-3'). After a five minute denaturing step, amplification was performed according to the following cycling profile: 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min (30 cycles). A single PCR product was gel purified and cloned into pGEM®-T easy vector (Promega, Madison, WI). The sequences of cloned wild type, N65H and R30I h*SRY* mutants were confirmed by DNA sequencing analysis. Recombinant plasmids were cleaved with *NdeI* and *BamHI* and the h*SRY* inserts were subcloned into pET 28a bacterial expression vector (Novagen, Madison, WI) to produce N-terminal His-tagged fusion proteins. Resulting constructs were used to transform BL21 (DE3) *E.*

coli cells. Wild-type and mutant SRY proteins were induced with isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (5 μ M) for 3h at 25°C and shaking at 250 rpm. Cells were collected by centrifugation (5,000 x g, at 4°C), suspended in lysis buffer (300 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM Imidazole; 250 μ g/ml lysozyme) and incubated on ice for 20 min. The suspension was repeatedly sonicated, centrifuged (17,000 x g at 4°C), and the supernatant filtered with a 0.45 μ m syringe filter. The supernatant was passed through a Ni-NTA agarose column (Qiagen, Valencia, CA) and the SRY protein was eluted with TS250 buffer (300 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 250 mM Imidazole). Glycerol was added to a final concentration of 5%. Aliquots were stored at -70°C.

***In vitro* SRY phosphorylation and Western blot**

The recombinant full-length hSRY or N65H and R30I mutant proteins (0.5 to 1 μ g) was added to a PKA reaction containing 20 mM Hepes, pH 7.5; 5 mM MgCl₂; 200 μ M unlabeled ATP; 5 mM DTT; 75 mM NaCl; 5 μ Ci [γ -³²P] ATP and 1.5 units of PKA catalytic subunit (Sigma Chem. Co, St. Louis, MO) in a final volume of 10 μ l. After 30 min incubation at 30°C, reaction was stopped by the addition of Laemmli sample buffer [49]. Purified proteins from *E. coli* transformed with non-recombinant pET28a vector were used as a negative control. Proteins were separated by SDS-PAGE and subjected to autoradiography. To estimate the amount of recombinant proteins to be used in the phosphorylation reactions and gel mobility assays, aliquots of proteins were analyzed by Western blot using an anti-His antibody (Amersham-Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden). Proteins were electrophoresed on 12% SDS-PAGE, blotted onto a PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA) and incubated with the anti-His antibody (1:3000) for 1h at room temperature. After washings in TBS buffer [47], membranes were incubated with a secondary antibody (1:3000) for 1h at room temperature, washed in TBS buffer, followed by the detection using the ECL chemiluminescent system (Amersham-Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden). The amount of recombinant protein was estimated by phosphor-imager quantification.

Gel Retardation Assay

Oligonucleotides As (5'-CCGGGTAAACAGACAATGGGTCTGGT-3') [29] and Aa (5'-ACCAGACCCATTGTTCTGTAAACCCGG-3') were synthesized and subsequently annealed to generate a double-stranded probe (oligo A). The ds-oligonucleotide was labeled with [γ -³²P] ATP (Amersham-Pharmacia-Biotech, Buckinghamshire, UK) using T₄ Polynucleotide Kinase. Gel mobility

assays were carried out using 3 µg of non-phosphorylated and unlabeled-ATP PKA phosphorylated proteins. SRY proteins were added to the binding buffer containing 10 mM Tris-HCl; pH 7.5, 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT and 5% glycerol; 5 mM MgCl₂ and 0.05 unit Poly (dI-dC) were also added to the reaction. Final NaCl concentration was 150 mM for non-phosphorylated proteins and 100 mM for phosphorylated proteins. After 15 min of incubation at 4°C, 20 fmol of labeled double-stranded probe (10,000 to 20,000 cpm) were added to the reaction and the final mixture was incubated for additional 15 min at 4°C. The samples were electrophoresed on a non-denaturing 6% polyacrilamide gel using 0.25X TBE buffer. Electrophoresis, as well as a pre-run, were performed at 10V/cm at 4°C.

RESULTS

Sequence analysis of *SRY* conserved domain included in the 380 bp amplified fragment from patient 2 revealed a point mutation resulting in an A to C transversion at nucleotide position 193 (sequence numbering according to Behlke *et al.* [43]). This mutation causes an asparagine to histidine substitution (N65H) within the HMG box of the *SRY* gene (Fig. 1). The sequencing of the whole *SRY* coding region did not show any other nucleotide variation.

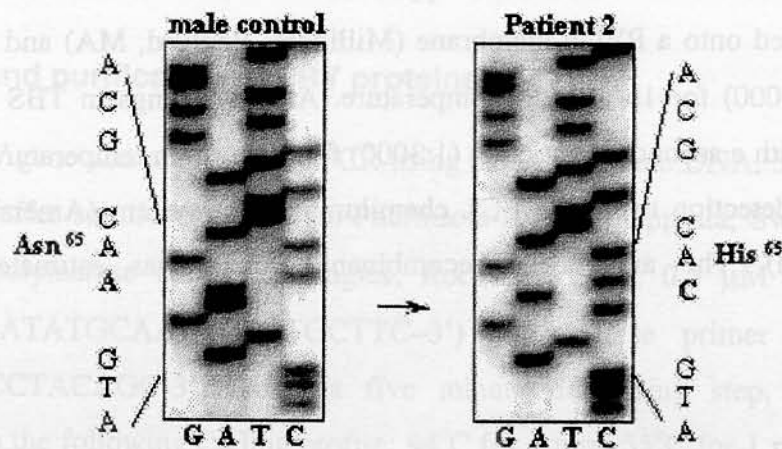


Figure 1: PCR direct sequencing analysis of the *SRY* gene showing the region bearing the N65H mutation: left - a normal male control; right - patient 2. The arrow indicates an A to C transversion at nucleotide position 193 causing the change of an asparagine to a histidine at codon 65.

SRY sequence analysis of peripheral leukocytes DNA from patients 3, 4 and 5 and of streak gonadal DNA from patient 3 showed a G to T transversion at nucleotide position 89 (Fig. 2). This mutation changes an arginine to an isoleucine at codon 30 (R30I), which is located outside the HMG domain. DNA sequencing analysis of the father and three of the five normal brothers showed the same mutated *SRY* gene sequence. The molecular study of two normal brothers could not be performed.

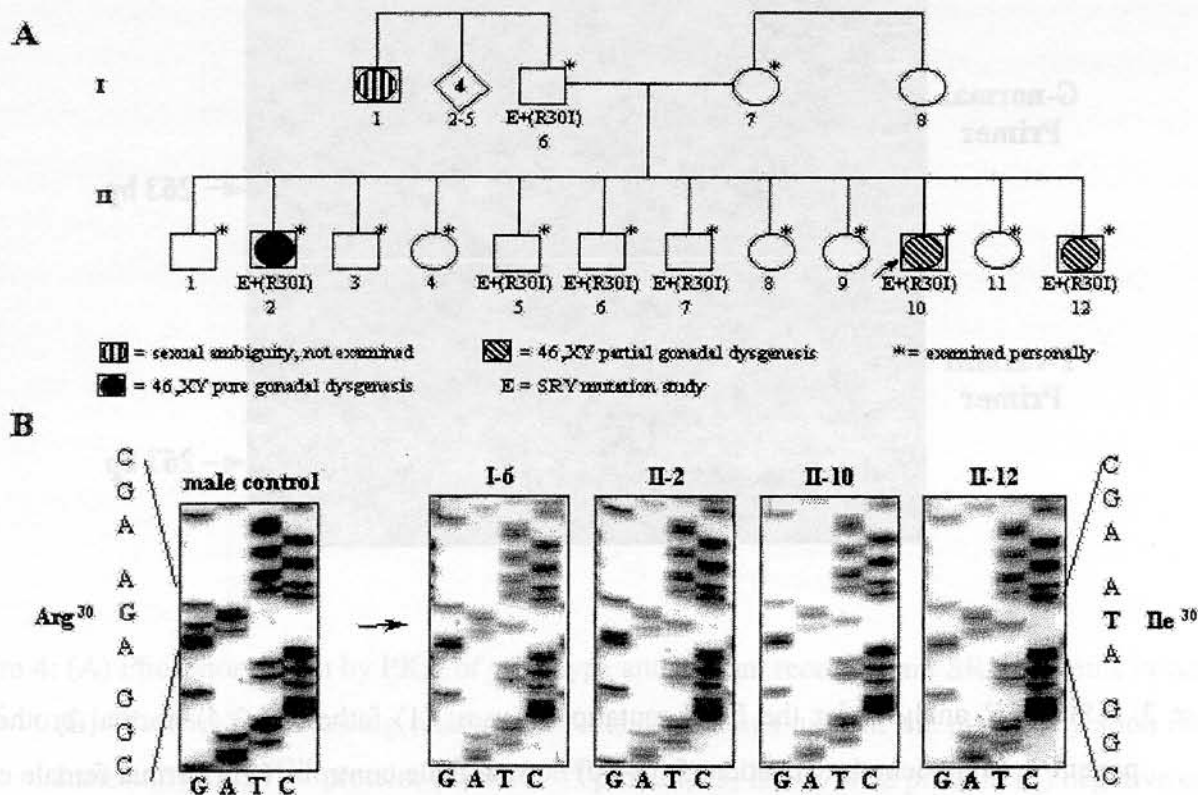


Figure 2: R30I mutational analysis. (A) Pedigree of family of patients 3, 4 and 5 constructed according to Bennet *et al.* [46]. The arrow indicates the proband. (B) PCR-direct sequencing analysis of the *SRY* gene. Part of *SRY* sequence is shown: left - a normal male control; right - father (I-6), patient 3 (II-2), patient 4 (II-10), patient 5 (II-12). The arrow indicates a G to T transversion at nucleotide position 89 causing the change of an Arginine to an Isoleucine at codon 30.

ASO-PCR with specific oligonucleotides for the normal G and mutant T sequences was designed to investigate the possibility of the mutation R30I being a polymorphism. The analysis of 100 non-affected males showed the absence of the T variant sequence in the population (Fig. 3).

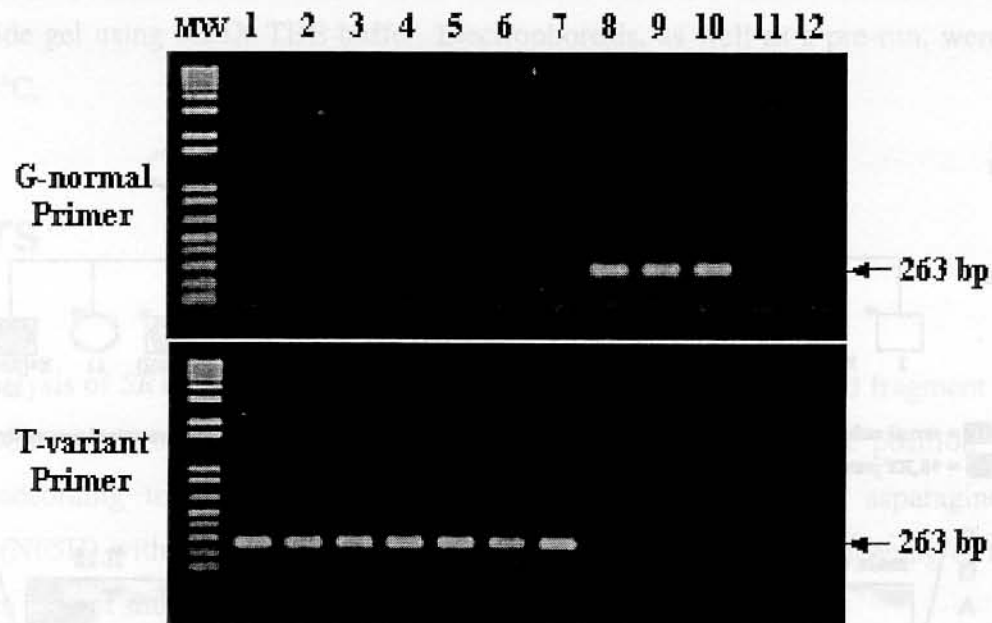


Figure 3: ASO-PCR analysis for the R30I mutation. Lanes: (1) father; (2,3,4) normal brothers; (5) patient 3; (6) patient 4; (7) patient 5; (8-10) normal male controls; (11) normal female control; (12) DNA free sample. The upper gel shows the amplification of the G allele at nucleotide position 89. The lower gel shows the amplification of the T allele at nucleotide position 89. Molecular weigh markers are 1kb ladder plus.

The R30I mutation lies in a SRY phosphorylation site that was shown to positively regulate DNA binding [50]. To evaluate the influence of the mutations on the SRY phosphorylation, full-length bacterial-expressed wild-type and mutant SRY proteins were tested by an *in vitro* kinase assay with the PKA catalytic subunit. As shown in figure 4A, wild-type and SRY^{N65H} proteins are substrates for PKA (lanes 1 and 3), however the SRY^{R30I} protein is poorly phosphorylated (lane 2). The amount of protein used in each reaction was estimated by Western blot (Fig. 4B).

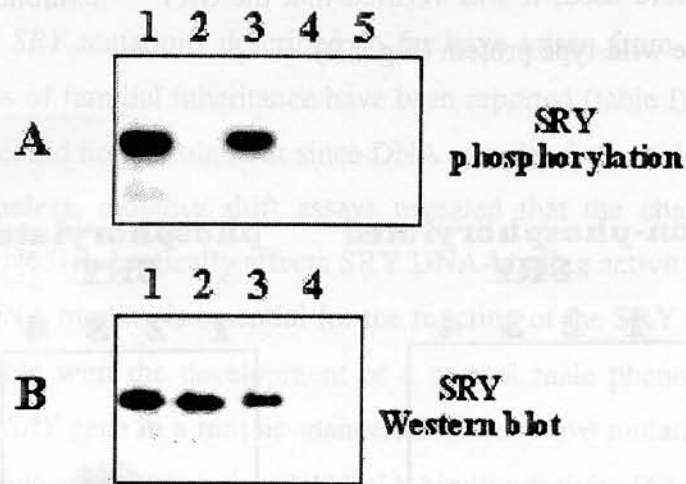


Figure 4: (A) Phosphorylation by PKA of wild-type and mutant recombinant SRY proteins *in vitro* and (B) Western blot showing relative amounts of proteins used in the phosphorylation reaction. Lanes: (1) SRY^{N65H} protein; (2) SRY^{R30I} protein; (3) hSRY wild protein; (4) negative control: *E. coli* proteins purified from cells transformed with non-recombinant pET28a; (5) negative control: hSRY wild protein in the absence of PKA enzyme.

To investigate the effect of the SRY mutations on DNA binding, SRY proteins were tested for their ability to interact with target DNA. Electrophoretic mobility shift assays with purified wild-type and mutant proteins were performed after binding to labeled ds-oligonucleotide A containing the sequence AACAAATG, which is known to be a target for the mouse and human SRY proteins [51, 52]. The assays were performed using physiological concentration of NaCl, which has been shown to enhance the specificity of the SRY-DNA complex [40]. Figure 5 shows that no protein-DNA complex is formed with either phosphorylated or non-phosphorylated SRY^{N65H}. In contrast, DNA binding activity of non-phosphorylated SRY^{R30I} and wild-type proteins were similar (Fig. 5A). However, when phosphorylated proteins were used, it was verified that the SRY^{R30I} exhibited reduced DNA-binding activity, as compared to the wild-type protein (Fig. 5B).

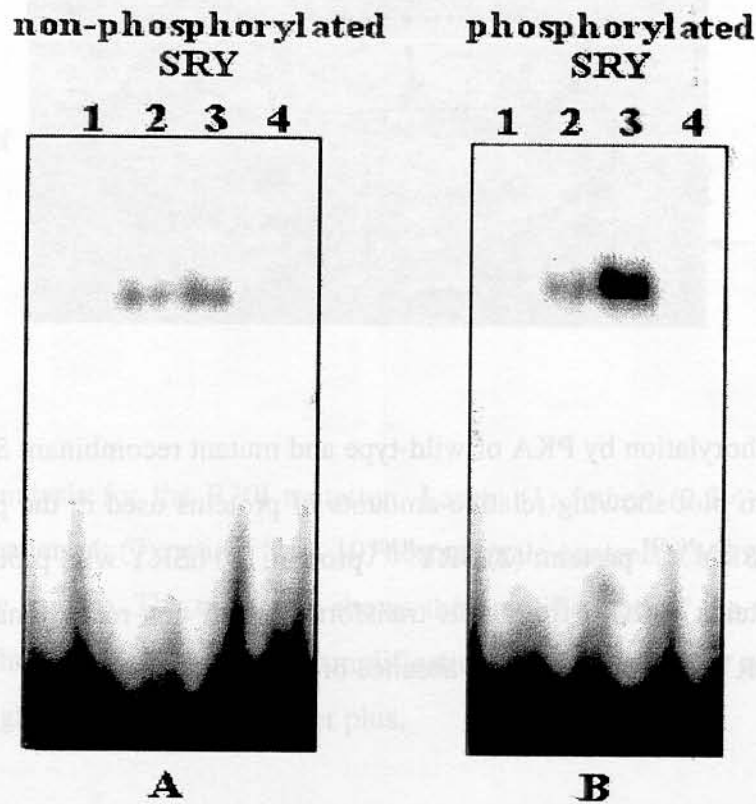


Figure 5: Gel mobility shift assays using (A) non-phosphorylated and (B) phosphorylated proteins. Lanes: (1) SRY^{N65H} protein; (2) SRY^{R30I} protein; (3) hSRY wild protein; (4) negative control: *E. coli* proteins purified from cells transformed with non-recombinant pET28a.

DISCUSSION

The occurrence of two novel *SRY* missense mutations in Brazilian patients with either pure or partial 46,XY gonadal dysgenesis is reported in this paper. Mutations were not found in any true hermaphrodite patient included in this study. The N65H mutation was found in a patient with XY pure gonadal dysgenesis and the R30I was present in three siblings, one with XY pure gonadal dysgenesis and two with partial gonadal dysgenesis, as well as in non-affected XY relatives.

The great majority of *SRY* mutations described so far have arisen from *de novo* mutational events, nonetheless some cases of familial inheritance have been reported (table I). The possibility that N65H is a familial mutation could not be ruled out since DNA samples from male relatives of patient 2 were not available. Nevertheless, mobility shift assays revealed that the change of an asparagine to a histidine at codon 65 (N65H) drastically affects *SRY* DNA-binding activity even after positive protein phosphorylation. As DNA binding is essential for the function of the *SRY* protein, the N65H mutation would not be compatible with the development of a normal male phenotype, unless it was present together with the wild *SRY* gene in a mosaic manner. Some *de novo* mutations in *SRY* HMG box have been demonstrated to reduce or abolish the *SRY* DNA-binding activity [53, 54].

The functional importance of the asparagine at codon 65 is further supported by other studies. This amino acid residue is conserved among *SRY* proteins of different mammalian species [55]. Moreover, Werner *et al.* [56] investigating the three-dimensional solution structure of the h*SRY*-DNA complex showed that asparagine 65 is one of the seven residues that contact the target DNA bases. In addition, N65 is located between the two motifs of a bipartite nuclear localization signal which are separated by residues 63 to 75 [57, 58]. Therefore, the aminoacid substitution at position 65 might as well interfere with the nuclear localization of the *SRY* protein.

The change of a guanine to a thymine at nucleotide position 89 in seven members of the same family constitutes a very unusual case. This familial mutation located outside the HMG box (R30I) is reported in a large pedigree with different forms of XY gonadal dysgenesis.

A mosaicism within the father's gonads could explain the co-existence of affected and non-affected XY individuals in the same family. However, since all the three analyzed non-affected male siblings

bear the same mutation, the occurrence of mosaicism in the father's sperm cells is very unlikely. Twelve *SRY* variants out of the 44 described so far (table I) have been found segregating in families and only four of these mutations are present in mosaic fathers [17, 29, 33].

Several hypotheses have been considered to explain the R30I variant. Firstly, the variant could be a *SRY* polymorphism fortuitously found in a family segregating for an autosomal or X-linked sex-reversing gene, as argued by Berta *et al.* [5] and Vilain *et al.* [59]. As sequences outside the region encoding the DNA-binding HMG box seem to evolve rapidly [53], the polymorphism hypothesis could not be promptly discarded. However, our experimental data did not support this hypothesis since allele-specific PCR assays for the T variant nucleotide failed to detect this base change in 100 male controls. In addition, aminoacid polymorphisms within the *SRY* open reading frame have never been described among human populations. There is only a C → T nucleotide polymorphism altering the codon 155 in the *SRY* gene, reported in Japanese and Korean populations, which does not cause aminoacid change and is not associated with sex reversal [60]. Moreover, in two familial cases where fathers did not present Y mosaicism, sequence changes were also not found in the *SRY* gene of normal male controls [12, 38].

A second hypothesis to explain the R30I variant is that this mutation could cause conditional sex reversal. Jäger *et al.* [36] and Pontiggia *et al.* [54] studied the binding behavior of *SRY* mutants and demonstrated that in three familial cases these proteins exhibited normal or close to normal binding affinities. It seems that, in contrast to the effect of *de novo* mutations, inherited variants produce proteins that slightly differ from the wild type. Their failure to function in some cases, but not all, must depend on the environment or on the genetic background. A mutation with variable penetrance could generate different phenotypes if it affects the *SRY* interaction with a target sequence of a gene downstream in the sex-determination pathway, or with a *SRY* cofactor [36].

The *SRY* protein is phosphorylated *in vitro* as well as *in vivo* on serine residues (²⁹RRSSS³³) located at the N-terminal and this phosphorylation event was shown to enhance *SRY* DNA binding [50]. By site directed mutagenesis of the three serine residues to alanine, Desclozeaux *et al.* [50] verified that the triple mutated protein was not a substrate for PKA reaction. Moreover, *in vivo* transfection assays with the mutant *SRY*-Ala revealed that, although it still binds DNA *in vitro*, its *in vivo* activity is rather low [50].

In the present report, we demonstrated that the phosphorylation of the SRY^{R30I} protein *in vitro* is negligible. We also showed that the non-phosphorylated SRY^{R30I} protein is able to bind the target DNA as effectively as the wild-type SRY; however, when using phosphorylated proteins in gel mobility shift assays, the SRY^{R30I} protein exhibited reduced DNA-binding activity in comparison to the phosphorylated wild-type protein. Therefore, the activity of the SRY^{R30I} *in vivo* could be close to a threshold level in which its ability to induce testicular development would depend on the physiological conditions or interactions with other genetic factors. This could explain the three phenotypes (normal male, partial gonadal dysgenesis and pure gonadal dysgenesis) observed in the individuals carrying the R30I substitution.

In our previous report [21], a patient with pure gonadal dysgenesis bearing the W70X nonsense mutation in the *SRY* gene has been described. Considering all the XY gonadal dysgenesis cases we studied, *SRY* coding region mutations have been identified in three out of four (75%) patients with pure gonadal dysgenesis. These findings suggest that the frequency of *SRY* mutations in XY pure gonadal dysgenesis is high, as pointed out by Hawkins *et al.* [27]. In contrast, *SRY* mutations in patients with XY partial gonadal dysgenesis seem less frequent. Accordingly, there are only three *SRY* mutations correlated to this phenotype: the S18N [12] and the R30I, both being missense mutations lying outside the HMG box, and the Y129N [40] located at the 3' end of the HMG box.

In conclusion, our results suggest that both *SRY* mutations described here could interfere with protein DNA binding *in vivo*. The HMG box N65H mutation, associated with 46,XY pure gonadal dysgenesis, abolishes DNA binding *in vitro* probably due to the change of an amino acid residue that is essential for protein-DNA contact. The non-HMG box R30I mutation, associated with variable phenotypes, affects mainly SRY PKA phosphorylation, therefore reducing DNA-binding activity. The results imply that the R30I mutation is very unlikely to be a rare neutral sequence variant and it probably generates a SRY protein with slightly altered activity, which could lead to a variety of phenotypes.

Table I – Mutations on the *SRY* gene Open Reading Frame (modified and updated from Cameron and Sinclair [8]).

Codon	Nucleotide ^a	Base change	Amino acid change	Phenotype	Familial	Reference
2 ^b	4	C→T	Gln→Stop	POF ^c		[9]
4 ^b	12	T→A	Tyr→Stop	PureGD ^c		[10]
4 ^b	12	T deletion	Tyr→Stop	UTS ^d		[11]
18 ^b	53	G→A	Ser→Asn	PartialGD ^c /UTS	Yes	[12, 13 ^e]
30 ^b	89	G→T	Arg→Ile	Pure/Partial GD	Yes	This study
43 ^b	127	T insertion	Lys→Stop	PureGD		[14]
60	178	G→C	Val→Leu	PureGD	Yes	[5]
60	179	T→C	Val→Ala	TH		[15]
62	184	C→G	Arg→Gly	PureGD		[16]
64	192	G→A	Met→Ile	PureGD		[5]
64	191	T→G	Met→Arg	PureGD		[14]
65	193	A→C	Asn→His	PureGD		This study
67	199	T→G	Phe→Val ^f	PureGD	Yes ^g	[17, 14]
68	203	T→C	Ile→Thr	PureGD		[18]
70	209	G→A	Trp→Stop	PureGD		[19,20,21,]
74	220	C→T	Glu→Stop	PureGD	Yes	[16]
75	224-225	GG→AT	Arg→Asn	PureGD		[22]
76	226	C→A	Arg→Ser	PureGD	Yes	[23]
78	233	T→C	Met→Thr	PureGD		[16]
79	237	T→C	Ala→Ala	TH		[24] ^h
86	256	C→T	Arg→Stop	PureGD		[25]
87	259	A→T	Asn→Tyr	PureGD		[26]
90	270	C→G	Ile→Met	PureGD	Yes	[27, 28 ⁱ]
91	271	A→G	Ser→Gly	PureGD	Yes ^g	[29]
92	274	A→T	Lys→Stop	PureGD		[30]
93	277	C→T	Gln→Stop	PureGD		[31]
95	283	G→C	Gly→Arg	PureGD		[19]
95	284	G→A	Gly→Glu	PureGD		[32]
97	289	C→T	Gln→Stop	PureGD	Yes ^g	[33]
101	302	T→A	Leu→His	TH		[24] ^h
106	317	A→T	Lys→Ile	PureGD		[27]
107	320	G→A	Trp→Stop	PureGD		[34]
108	324	A deletion	Frameshift	PureGD		[27]
108	323	C→G	Pro→Arg	PureGD		[35]
109	326	T→C	Phe→Ser	PureGD	Yes	[36]
113	337	G→A	Ala→Thr	PureGD		[37]
121-22	363-66	AGAG deletion	Frameshift	PureGD		[38]
125	374	C→T	Pro→Leu	PureGD	Yes ^g	[29]
127	380	A→G	Tyr→Cys	PureGD		[39]
127	381	T→A	Tyr→Stop	PureGD		[18]
129	385	T→A	Tyr→Asn	PartialGD		[40]
131	392	C→G	Pro→Arg	PureGD		[41]
133	397	C→T	Arg→Trp	PureGD		[16, 10]
163 ^b	488	T→A	Leu→Stop	PureGD	Yes	[42]

^a Nucleotide position according to Behlke *et al.* [43]^b Mutations located outside the SRY HMG box^c POF = partial ovarian function; PureGD = pure gonadal dysgenesis; PartialGD = partial gonadal dysgenesis; TH = true hermaphroditism.^d UTS = Ullrich-Turner syndrome. Karyotype in this case was 45,X/47,XXY.^e Canto *et al.* [13] described this mutation in two patients with UTS phenotype (karyotypes 46,X,+mar (Yq-) and 45,X/46,XY).^f The mutation was described by Hines *et al.* [17] in two sisters and by Scherer *et al.* [14] as a *de novo* mutation.^g Mutations inherited from mosaic fathers.^h Both mutations were found in a patient with gonadal mosaicism. Sequence obtained from peripheral blood DNA was shown to be normal.ⁱ Dork *et al.* [28] described the same mutation in a PureGD patient whose male relatives were not available for testing.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (FAEP-UNICAMP) and from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). The authors would like to thank the members of the Cytogenetics Laboratory of Medical Genetics Department and the Main Clinical Laboratory of the University Hospital (UNICAMP). We also thank Maria Madalena V. Rosa for technical assistance and all patients and their relatives for agreeing to participate in this research.

REFERENCES

1. Berkovitz GD, Fechner MD, Zacur HW, Rock JA, Snyder HM III, Migeon CJ, Perlman EJ (1991) Clinical and pathologic spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis: its relevance to the understanding of sex differentiation. *Medicine* 10:375-383.
2. Rey RA, Belville C, Nihoul-Fékété C, Michel-Calemard L, Forest MG, Lahlou N, Jaubert F, Mowszowicz I, David M, Saka N, Bouvattier C, Bertrand AM, Lecointre G, Soskin S, Cabrol S, Crosnier H, Léger J, Lortat-Jacob S, Nicolino M, Rabl W, Toledo SPA, Bas F, Gompel A, Czernichow P, Chatelain P, Rappaport R, Morel Y, Josso N (1999) Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum antimüllerian hormone measurement. *J Clin Endocrinol Metab* 84:627-631.
3. Schellas HF (1974) Malignant potential of the dysgenetic gonad. II. *Obstet Gynecol* 44:455-462.
4. Guerra-Jr G, de Mello MP, Assumpção JG, Morcillo AM, Marini SHVL, Baptista MTM, Silva RBPE, Marques-de-Faria AP, Maciel-Guerra AT (1998) True hermaphrodites in the southeastern region of Brazil: a different cytogenetic and gonadal profile. *J Pediatr Endocr Metab* 11:519-524.
5. Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M (1990). Genetic evidence equating *SRY* and the testis-determining factor. *Nature* 348:448-450.
6. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244.
7. Pivnick EK, Watchtel S, Woods D, Simpson JL, Bishop CE (1992) Mutations in the conserved domain of *SRY* are uncommon in XY gonadal dysgenesis. *Hum Genet* 90:308-310.
8. Cameron FJ and Sinclair AH (1997) Mutations in *SRY* and *SOX9*: testis-determining genes. *Hum Mut* 9:388-395.

9. Brown S, Yu C, Lanzano P, Heller D, Thomas L, Warburton D, Kitajewski J, Stadmauer L (1998) A de novo mutation (Gln2Stop) at the 5' end of the *SRY* leads to sex reversal with partial ovarian function. *Am J Hum Genet* 62:189-192.
10. Veitia R, Ion A, Barbaux S, Jobling MA, Souleyreau N, Ennis K, Ostrer H, Tosi M, Meo T, Chibani J, Fellous M, McElreavey K (1997) Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype. *Hum Genet* 99:648-652.
11. Takagi A, Imai A, Tamaya T (1999) A novel sex-determining region on Y (*SRY*) nonsense mutation identified in a 45,X/47,XXY female. *Fertil Steril* 72:167-169.
12. Domenice S, Nishi MY, Billerbeck AEC, Latronico AC, Medeiros MA, Russel AR, Vass K, Carvalho FM, Frade EMC, Arnhold JJP, Mendonça BB (1998) A novel missense mutation (S18N) in the 5' non-HMG box region of the *SRY* gene in a patient with partial gonadal dysgenesis and his normal male relatives. *Hum Genet* 102: 213-215.
13. Canto P, de la Chesnaye E, Lopez M, Cervantes A, Chaves B, Vilchis F, Reyes E, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S, Mendez JP (2000) A mutation in the 5' non-high mobility group box region of the *SRY* gene in patients with Turner syndrome and Y mosaicism. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1908-1911.
14. Scherer G, Held M, Erdel M, Meschede D, Horst J, Lesniewicz R, Midro AT (1998) Three novel *SRY* mutations in XY gonadal dysgenesis and the enigma of XY gonadal dysgenesis cases without *SRY* mutations. *Cytogenet Cell Genet* 80:188-192.
15. Hiort O and Klauber GT (1995) True hermaphroditism with 46,XY karyotype and a point mutation in the *SRY* gene. *J Pediatr* 126:1022.
16. Affara NA, Chalmers IJ, Ferguson-Smith MA (1993) Analysis of the *SRY* gene in 22 sex-reversed XY females identifies four new point mutations in the conserved DNA binding domain. *Hum Mol Genet* 2:785-789.
17. Hines RS, Tho SP, Zhang YY, Plouffe L Jr, Hansen KA, Khan I, McDonough PG (1997) Paternal somatic and germ-line mosaicism for a sex-determining region on Y (*SRY*) missense mutation leading to recurrent 46,XY sex reversal. *Fertil Steril* 67:675-679.
18. McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Costa JM, Souleyreau N, Kucheria K, Boucekkine C, Thibaud E, Brauner R, Flamant F, Fellous M (1992) XY sex reversal associated with a deletion 5' to the *SRY* "HMG box" in the testis-determining region. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11016-11020.
19. Hawkins JR, Taylor A, Berta P, Levilliers J, Van der Auwera B, Goodfellow PN (1992) Mutational analysis of *SRY*: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum Genet* 88:471-474.
20. Graves PE, Davis D, Erickson RP, Lopez M, Kofman-Alfaro S, Mendez JP, Speer IE (1999) Ascertainment and mutational studies of *SRY* in nine XY females. *Am J Med Genet*. 83:138-139.
21. Assumpção JG, Guerra ATM, de Mello, MP (1999) Recurrence of a nonsense mutation in the conserved domain of *SRY* in a Brazilian patient with 46,XY gonadal dysgenesis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 12:455-457.
22. Battiloro E, Angeletti B, Tozzi MC, Bruni L, Tondini S, Vignetti P, Verna R, D'Ambrosio E (1997) A novel double nucleotide substitution in the HMG box of the *SRY* gene associated with Swyer syndrome. *Hum Genet* 100:585-587.
23. Imai A, Takagi A, Tamaya T (1999) A novel sex-determining region on Y (*SRY*) missense mutation identified in a 46,XY female and also in the father. *Endocr J* 46:735-739.
24. Braun A, Kammerer S, Cleve H, Löhns U, Schwarz HP, Kuhnle U (1993) True hermaphroditism in a 46,XY individual, caused by a postzygotic somatic point mutation in the male gonadal sex-determining locus (*SRY*): molecular genetics and histological findings in a sporadic case. *Am J Hum Genet* 52: 578-585.
25. Cameron FJ, Smith MJ, Warne GL, Sinclair AH (1998) Novel mutation in the *SRY* gene results in 46,XY gonadal dysgenesis. *Hum Mut Suppl* 1:S110-S111.

26. Okuhara K, Tajima T, Nakae J, Fujieda K (2000) A novel missense mutation in the HMG box region of the SRY gene in a Japanese patient with an XY sex reversal. *J Hum Genet* 45:112-114.
27. Hawkins JR, Taylor A, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith D, Berkovitz GD (1992) Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *Am J Hum Genet* 51:979-984.
28. Dörk T, Stuhmann M, Miller K, Schmidtke J (1998) Independent observation of SRY mutation I90M in a patient with complete gonadal dysgenesis. *Hum Mut* 11:90-91.
29. Schmitt-Ney M, Thiele H, Kalwaber P, Bardoni B, Cisternino M, Scherer G (1995) Two novel SRY missense mutations reducing DNA binding identified in XY females and their mosaic fathers. *Am J Hum Genet* 56:862-869.
30. Muller J, Schwartz M, Skakkebaek NE (1992) Analysis of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in sex reversed patients: point-mutation in SRY causing sex-reversion in a 46,XY female. *J Clin Endocrinol Metab* 75:331-333.
31. McElreavey KD, Vilain E, Boucekkine C, Viaud M, Jaubert F, Richaud F, Fellous M (1992) XY sex reversal associated with a nonsense mutation in SRY. *Genomics* 13:838-840.
32. Schäffler A, Barth N, Winkler K, Zietz B, Rümmele P, Knüchel R, Schölmerich J, Palitzsch KD (2000) Identification of a new missense mutation (Gly95Glu) in a highly conserved codon within the high-mobility group of the sex-determining region Y gene: report on a 46,XY female with gonadal dysgenesis and yolk-sac tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2287-2292.
33. Bilbao JR, Loidan L, Castaño L (1996) A novel postzygotic nonsense mutation in SRY in familial XY gonadal dysgenesis. *Hum Genet* 97:537-539.
34. Iida T, Nakahori Y, Komaki R, Mori E, Hayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y, Nakagome Y (1994) A novel nonsense mutation in the HMG box of the SRY gene in a patient with XY sex reversal. *Hum Mol Genet* 3:1437-1438.
35. Jakubiczka S, Bettecken T, Stumm M, Neulen J, Wieacker P (1998) Another mutation within the HMG-box of the SRY gene associated with Swyer syndrome. *Hum Mut* 13: 85.
36. Jäger RJ, Harley VR, Pfeiffer RA, Goodfellow PN, Scherer G (1992) A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes. *Hum Genet* 90:350-355.
37. Zeng YT, Ren ZR, Zhang ML, Huang Y, Zeng FY, Huang SZ (1993) A new de novo mutation (A113T) in HMG box of the SRY gene leads to XY gonadal dysgenesis. *J Med Genet* 30:655-657.
38. Jäger RJ, Anvret M, Hall K, Scherer G (1990) A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* 348:452-454.
39. Poulat F, Soullier S, Goze C, Heitz F, Calas B, Berta P (1994) Description and functional implications of a novel mutation in the sex-determining gene SRY. *Hum Mut* 3: 200-204.
40. Baud S, Margeat E, Lumbroso S, Paris F, Sultan C, Royer C, Poujol N (2002) Equilibrium binding assays reveal the elevated stoichiometry and salt-dependence of the interaction between full-length human SRY and DNA. *J Biol Chem* (in press).
41. Lundberg Y, Ritzén, Harlin J, Wedell A (1998) Novel missense mutation (P131R) in the HMG box of SRY in XY sex reversal. *Hum Mut Suppl* 1:S328.
42. Tajima T, Nakae J, Shinohara N, Fujieda K (1994) A novel mutation localized in the 3' non-HMG box region of the SRY gene in 46,XY gonadal dysgenesis. *Hum Mol Genet* 3:1187-1189.
43. Behlke MA, Bogan JS, Beer-Romero P, Page DC (1993) Evidence that the SRY protein is encoded by a single exon on the human Y chromosome. *Genomics* 17:736-739.
44. Marcantonio SM, Fechner PY, Migeon CJ, Perlman EJ, Berkovitz GD (1994) Embryonic testicular regression sequence: a part of the clinical spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis. *Am J Med Genet* 49:1-5.

45. Scolfaro MR, Cardinali IA, Stuchi-Perez EG, de-Mello MP, Assumpção JG, Baptista MTM, Silva JMB, Maciel-Guerra AT, Guerra-Jr G (2001) Morphometry and histology of gonads from 13 children with dysgenetic male pseudohermaphroditism. *Arch Pathol Lab Med* 125:652-656.
46. Bennet RL, Steinhaus KA, Uhrich AB, Sullivan CKO, Resta RG, Lochner-Doyle D, Markel DS, Vincent V, Hamanishi J (1995) Recommendations for standardized human pedigree nomenclature. *Am J Hum Genet* 56:745-752.
47. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TE (1989) "Molecular cloning: a laboratory manual." New York: Cold Spring Harbor.
48. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl, K (1991) "Current Protocols in Molecular Biology". New York: John Wiley & Sons.
49. Laemli VK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 247:37.
50. Desclozeaux M, Poulat F, de Santa Barbara P, Capony JP, Turowski P, Jay P, Mejean C, Moniot B, Boizet B, Berta P (1998) Phosphorylation of an N-terminal motif enhances DNA-binding activity of the human SRY protein. *J Biol Chem* 273:7988-7995.
51. Giese K, Cox J, Grosschedl (1992) The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* 69:185-195.
52. Giese K, Pagel J, Grosschedl R (1994) Distinct DNA-binding properties of the high mobility group domain of murine and human SRY sex-determining factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3368-3372.
53. Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD, Sockanathan S, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1992) DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science* 255:453-456.
54. Pontiggia A, Rimini R, Harley VR, Goodfellow PN, Lovell-Badge, Bianchi ME (1994) Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J* 13:6115-6124.
55. Foster JW, Brennan PE, Hampikian GK, Goodfellow PN, Sinclair AH, Lovell-Badge R, Selwood L, Renfree MB, Cooper DW, Graves JAM (1992) Evolution of sex determining and Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials. *Nature* 359:531-533.
56. Werner MH, Huth JR, Gronenborn AG, Clore GM (1995) Molecular basis of human 46,XY sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex. *Cell* 81:705-714.
57. Poulat F, Girard F, Chevron MP, Gozé C, Rebillard X, Calas B, Lamb N, Berta P (1995) Nuclear localization of the testis determining gene product SRY. *J Cell Biol* 128:737-748.
58. Sudbeck P, Scherer G (1997) Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J Biol Chem* 272:27848-27852.
59. Vilain E, McElreavey K, Jaubert F, Raymond JP, Richaud F, Fellous M (1992) Familial case with sequence variant in the testis-determining region associated with two sex phenotypes. *Am J Hum Genet* 50:1008-1011.
60. Shinka T, Tomita K, Toda T, Kotliarova SE, Lee J, Kuroki Y, Jin DK, Tokunaga K, Nakamura H, Nakahori Y (1999) Genetic variations on the Y chromosome in the Japanese population and implications for modern human Y chromosome lineage. *J Hum Genet* 44:240-245.

CAPÍTULO 3

ESTUDO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *SRY*

VII. ESTUDO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *SRY*

Os pacientes que não apresentaram mutações na fase de leitura aberta do *SRY* podem apresentar o fenótipo observado devido mutações nas seqüências que regulam a expressão desse gene ou mutações em outros genes envolvidos na determinação e diferenciação sexuais. Para investigar a possibilidade de uma alteração na região promotora do *SRY* optamos pelo seqüenciamento direto de 360 pb que antecedem o sítio de início da tradução. Em um caso de DG pura XY (paciente 1) foi encontrada uma deleção de três pares de bases. Essa deleção remove parte de um suposto elemento regulatório do gene *SRY*, o sítio de ligação ao fator de transcrição ubíquo Sp1.

Foi estudado o DNA do pai da paciente e verificou-se que esse também apresenta a mutação. Após avaliação médica, observou-se que o pai apresentava uma hipospadia grave que foi corrigida cirurgicamente. Constatou-se, também, que outros membros da família apresentavam genitália ambígua. Estes dados indicam que se trata de uma mutação familiar associada a diferentes fenótipos.

Para verificar se essa mutação poderia ser um polimorfismo, foram desenhados “primers” para uma PCR alelo-específica. O experimento de ASO-PCR mostrou ausência da deleção nos cinquenta controles masculinos testados.

É possível que a deleção encontrada no sítio de ligação a Sp1 resulte numa expressão deficiente do gene *SRY*. Os fenótipos diferenciais observados podem estar relacionados com a quantidade de produto formada no momento da determinação sexual e também com outros genes que interagem com o *SRY*.

Os dados obtidos nesta etapa do trabalho foram utilizados na elaboração do artigo: “An Inherited deletion in a Sp1 binding site in the 5’ non-coding region of *SRY* gene is associated with sex reversal”. Este manuscrito será enviado para publicação, na forma de “Comments”, para o “Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism”.

ARTIGO 3

AN INHERITED DELETION IN A Sp1 BINDING SITE IN THE 5' NON-CODING REGION OF SRY GENE IS ASSOCIATED WITH SEX REVERSAL

Juliana Godoy Assumpção¹, Andréa Trevas Maciel-Guerra², Antônia Paula Marques-de-Faria²; Gil Guerra Jr.³; Márcia R. Scolfaro³; Maricilda Palandi de Mello¹.

CBMEG/Laboratório de Genética Humana – UNICAMP, Campinas – SP¹, Departamento de Genética Médica/FCM – UNICAMP, Campinas – SP², Departamento de Pediatria/FCM – UNICAMP, Campinas – SP³.

Running title: familial mutation in the *SRY* promoter

Correspondence to:

Dra. Maricilda Palandi de Mello

CBMEG, UNICAMP

Caixa Postal 6010

13083-970 Campinas, SP, Brasil.

TeleFAX: 55 19 3788 1089

Telephone: 55 19 3788 1146.

e-mail: mmello@unicamp.br

INTRODUCTION

Mutations in the *SRY* gene (sex determining region on the Y chromosome) have been reported to account for 10 to 15% of XY gonadal dysgenesis cases (Pivnick *et al.*, 1992; Cameron and Sinclair, 1997). Most *SRY* mutations described so far were found within its open reading frame, mainly in the conserved domain (HMG box).

Male to female sex reversal in individuals with normal *SRY* coding sequence may occur because of mutations in the *SRY* regulatory elements or in other genes involved in the male differentiation pathway. Although nucleotide changes in the 5' flanking sequence of the *SRY* gene seem not to be a major cause of sex reversal (Shimitt-Ney, 1995; Kwok *et al.*, 1996; Veitia *et al.*, 1997), a few mutations that might affect its expression have been reported in XY females. McElreavey *et al.* (1992) described a deletion of 33-60 kb of DNA beginning no more than 1.8 kb upstream from the first ATG of *SRY* open reading frame. Kwok *et al.* (1996) found a polymorphism at -1533 and another variant, which was also present in the patient's father, at -2027. Poulat *et al.* (1998) found a G to A transition 75 base pairs 5' to the *SRY* start codon.

The *SRY* gene contains a small GC-rich region at its 5' flanking sequence, which lacks TATA and CCAAT boxes (Su and Lau, 1993). The putative *SRY* promoter has been mapped to a 310 bp DNA segment upstream from the first ATG since this sequence is capable of supporting CAT reporter gene expression in heterologous cell lines (Su and Lau, 1993). Moreover the presence of an Alu element 5' to the *SRY* gene in old world monkeys suggested that the core promoter is indeed located within the 500 pb sequence immediately upstream to the gene (Veitia *et al.*, 1997).

In this study, we investigated a 360 pb sequence, encompassing the *SRY* putative core promoter, in seventeen patients with varying degrees of 46,XY sex reversal. All of them were previously shown not to bear mutations in the *SRY* open reading frame (Assumpção *et al.*, "in press"). Sequencing analysis revealed a three base pair deletion within a Sp1 binding site in the XY pure gonadal dysgenesis patient. Upon familial investigation the

father was found to bear the same deletion and several relatives were reported to have sexual ambiguity. This is the first report of a mutation in this *SRY* putative regulatory element associated with sex reversal.

PATIENTS

Informed consent was obtained from all patients and control individuals studied. We classified abnormalities of testicular development according to Berkovitz *et al.* (1991) and Marcantonio *et al.* (1994). The sample consisted of seventeen Brazilian patients, one presenting 46,XY pure gonadal dysgenesis, twelve presenting 46,XY partial gonadal dysgenesis, and four true hermaphrodites [three 46,XY and one 46,X,del(Y)(q11.2)]. The XY pure gonadal dysgenesis patient (case 1) was found to have relatives with sexual ambiguity. For the remaining cases, familial investigation did not indicate any relatives with similar conditions. Clinical and hormonal data from case 1 are described in detail below. Data from the partial gonadal dysgenesis individuals were described in Scolfaro *et al.* (2001) (patients 1 to 11 and 13) and data from the true hermaphrodites were described in Guerra-Jr *et al.* (1998) (patients 2, 6, 8 and 9).

Patient 1, a 25-year-old woman, was referred to us at the age of 16 years due to primary amenorrhea. At 16 years old her height was 159.5 cm (50th centile for girls) and weight was 42.4 Kg (<3rd centile). There were no dysmorphic features, and she exhibited normal female external genitalia without pubertal signs (Tanner stages B1P1). Ultrasound examination revealed uterus hypoplasia and the gonads could not be detected. There were elevated levels of gonadotropins (FSH and LH), and her karyotype was 46,XY. She was then diagnosed as presenting 46,XY pure gonadal dysgenesis (Swyer syndrome), and bilateral gonadectomy was performed. Histology analysis revealed bilateral streak gonads. Since then, she has been subject to estrogen replacement therapy.

The patient had an older sister with normal menses, and an older brother who died in an accident. As a child, her father was submitted to 18 genital surgeries due to severe hypospadias and penoscrotal fusion without cryptorchidism. He had a paternal half-brother

and a paternal first cousin (born to a paternal uncle) with genital ambiguity. Another paternal first cousin (born to the same paternal uncle) had four children: two girls with normal pubertal development and two boys with ambiguous genitalia. Unfortunately these affected relatives could not be examined.

MATERIALS AND METHODS

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using standard techniques (Sambrook *et al.*, 1989). For the amplification of the *SRY* 5' 360 pb flanking sequence we used primers and PCR conditions described by Schmitt-Ney *et al.* (1995). Five μ L of amplification product were directly sequenced using the Thermo-sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

The DNA samples from 50 male controls were analyzed by ASO-PCR assay using allele-specific oligonucleotides designed to detect the 3 pb deletion found in the one of our patients. To amplify the mutant sequence we used forward primer SRYsDelM (5'-TTGAGGGGGTGTGGCGG - 3') and reverse primer XES11 described by Hawkins *et al.* (1992). Primers used to confirm the presence of the normal sequence were: SRYsDelN (5'-GGGTTGAGGGGGTGTGAGG - 3') and XES11. PCR reactions were performed with 0.5 μ g genomic DNA, 10% DMSO, 200 μ M each dNTP, 20 pmoles of each primer, 1X Taq buffer solution (Amersham-Pharmacia Biotech) and 1.5 units Taq DNA polymerase (Amersham-Pharmacia Biotech). The cycling profile was 94°C for 5 min; 94°C for 1 min, 63°C for 1 min, 72°C for 1 min (30 cycles); and a final extension step of 72°C for 5 min.

RESULTS

Sequence analysis of the *SRY* 5' 360 bp flanking sequence revealed a 3 bp deletion in a 46,XY pure gonadal dysgenesis patient (figure 1). The deletion could have removed nucleotides -132 to -134 (GAG) or nucleotides -131 to -133 (GGA) (sequence numbering according to Behlke *et al.*, 1993), as both deletions give the same sequence reading. These nucleotides are part of an Sp1 binding site that is located in the *SRY* putative promoter

region. The same mutation was found in the father of this patient. The remaining patients had no nucleotide alterations within this segment.

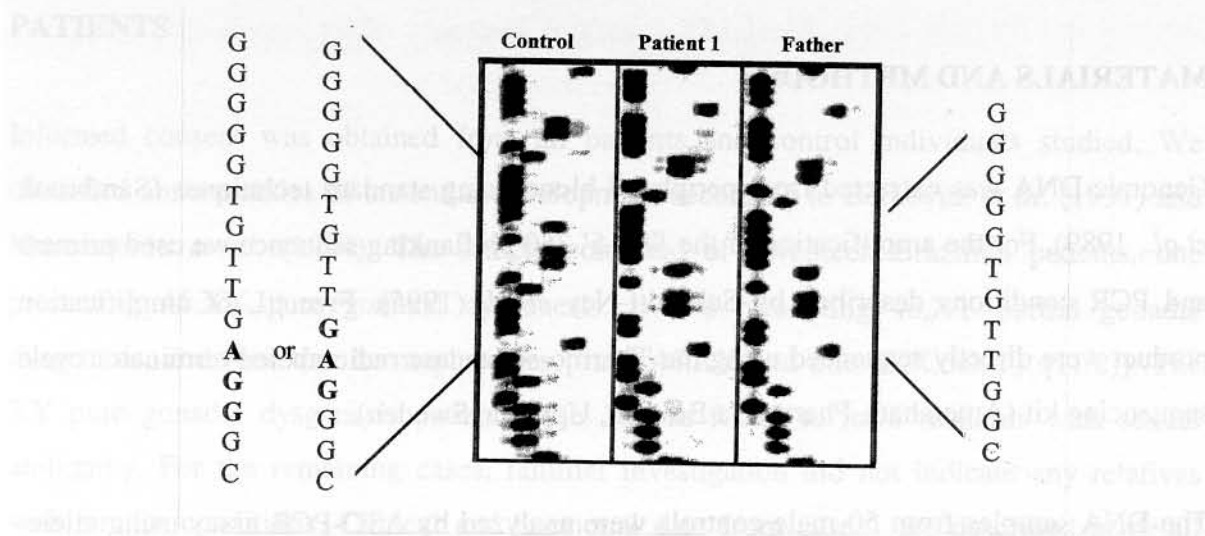


Fig. 1: Sequencing analysis of the three base pair deletions found in patient 1 and her father. Nucleotides deleted are highlighted in bold.

ASO-PCR with specific oligonucleotides for the normal and mutant sequences was performed to investigate if the deletion is a polymorphism. The screening of 50 non-affected males through ASO showed the absence of this variant in the control population.

DISCUSSION

The deletion we report here is a unique case since it is a familial mutation located in the *SRY* promoter region. The proband is a 46,XY gonadal dysgenesis patient; her father is a fertile man who was born with severe hypospadias and penoscrotal fusion. Although their relatives could not be tested, it is possible that this mutation is also associated with the sex ambiguity presented by other members of this family.

Some hypotheses are considered to explain the presence of the 3 pb deleted variant in a XY female and a fertile male. Firstly, the variant could be a *SRY* polymorphism fortuitously found in a family segregating for an autosomal or X-linked sex-reversing gene, as argued in a paper by Berta *et al.* (1990) and Vilain *et al.* (1992a). However, our experimental data did not support this hypothesis since allele-specific PCR assays for the deleted variant failed to detect this base change in 50 male controls.

A second hypothesis is that the mutation could cause conditional sex reversal. As argued by Kwok *et al.* (1996), if the SRY protein level has to exceed a threshold to induce testis differentiation, regulatory mutations could be associated either with a normal male or with a sex-reversed female phenotype, depending on whether the protein's level surpassed the threshold or not. Alternatively, reduced levels of normal SRY protein might permit some degree of testicular development, resulting in patients with variable degrees of virilization. In the latter case the extent of virilization would depend on the level of SRY protein produced.

Several highly conserved sequences that may have a function in the control of *SRY* expression have been found in its 5' flanking region (Su and Lau, 1993; Veitia *et al.*, 1997; Margarit *et al.*, 1998;). However, the mechanisms by which the *SRY* gene is activated and regulated remain unclear. Generally, in TATA-less promoters, where TFIID binding sequences are not conserved, transcription may depend on initiator sequences (Inr's), Sp-1 binding sites, or interaction among binding sites within the proximal promoter (reviewed by Crawford *et al.*, 1999). The identification of non-coding mutations in the *SRY* gene could help to identify the regulatory elements in the promoter region.

Two putative binding sites for the ubiquitous transcription factor Sp1 have been identified within the *SRY* core promoter (Vilain *et al.*, 1992b; Su and Lau, 1993; Veitia *et al.*, 1997). These Sp1 recognition sequences have been described immediately upstream to a transcription initiation site (Vilain *et al.*, 1992b; Su and Lau, 1993). To characterize the potential Sp1 binding sites, named Sp1A and Sp1B, Desclozeaux *et al.* (1998) performed

transfection experiments and showed that Sp1 protein is able to transactivate the *SRY* promoter, mainly through the Sp1B site.

The three base pair deletion we describe in this paper removes part of the Sp1A binding site. Although the Sp1A site seems not to be crucial for Sp1 dependent activation of the *SRY* gene, its cooperation with the Sp1B site in this activation has not been excluded (Desclozeaux *et al.*, 1998). The Sp1A site is conserved in sequence and approximate position with respect to the first ATG in all species analyzed by Veitia *et al.* (1997). This observation is consistent with a possible function of this domain in the regulation of *SRY* expression.

De Santa Barbara *et al.* (2001) have demonstrated that the steroidogenic factor 1 (SF-1) and Sp1 proteins interact in the NT2/D1 cell line and these two proteins cooperate to transactivate *SRY*. However, full expression of *SRY* may require other factors. One of these factors may be the Wilm's tumor suppressor gene (WT1). The WT1 protein has been shown to up-regulate the *SRY* gene through the proximal EGR-1-like DNA-binding sequence located between the two Sp1 binding sites (Hossain and Saunders, 2001).

Taken together, the available data suggest that *SRY* expression depends on the coordinate activity of various transcription regulators recognizing specific sites within the proximal *SRY* promoter, including the Sp1, SF-1 and WT1 proteins. Therefore, mutations in one of these binding sites might diminish *SRY* expression without abolishing it.

Mutations in *SRY* promoter region are rare and polymorphisms within the 360 pb segment upstream to the first ATG have never been reported in this gene. Moreover, the 3 bp deletion was not found in the male controls studied and it is located in a Sp1 binding domain. Therefore, we suggest that this mutation is involved in the generation of the different phenotypes observed. This hypothesis may only be confirmed by the analysis of a promoter-reporter system transfected in cultured cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (FAEP-UNICAMP) and from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). The authors would like to thank the members of the Cytogenetics Laboratory of Medical Genetics Department and the Main Clinical Laboratory of the University Hospital (UNICAMP). We also thank Maria Madalena V. Rosa for technical assistance and all patients and their relatives for agreeing to participate in this research.

REFERENCES

1. Assumpção JG, Benedetti CE, Maciel-Guerra AT, Guerra Jr G, Scolfaro MR, de Mello M P (2002) Novel mutations affecting SRY DNA-binding activity: the HMG box N65H associated with 46,XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-HMG box R30I associated with variable phenotypes. *J Mol Med* – in press.
2. Behlke MA, Bogan JS, Beer-Romero P, Page DC (1993) Evidence that the SRY protein is encoded by a single exon on the human Y chromosome. *Genomics* 17:736-739.
3. Berkovitz GD, Fechener MD, Zacur HW, Rock JA, Snyder HM III, Migeon CJ, Perlman EJ (1991) Clinical and pathologic spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis: its relevance to the understanding of sex differentiation. *Medicine* 10:375-383.
4. Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M (1990). Genetic evidence equating *SRY* and the testis-determining factor. *Nature* 348:448-450.
5. Cameron FJ and Sinclair AH (1997) Mutations in *SRY* and *SOX9*: testis-determining genes. *Hum Mut* 9:388-395.
6. Crawford DL, Segal JA, Barnett JL (1999) Evolutionary analysis of TATA-less proximal promoter function. *Mol Biol Evol* 16(2):194-207.
7. de Santa Barbara P, Méjean C, Moniot B, Malclès M-H, Berta P, Boizet-Bonhoure B (2001). Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human *SRY* gene expression. *Biol Reprod* 64:775-783.

8. Desclozeaux M, Poulat F, de Santa-Barbara P, Soullier S, Jay P, Berta P, Boizet-Bonhoure B (1998) Characterization of two Sp1 binding sites of the human sex determining SRY promoter. *Biochim Biophys Acta* 1397:247-252.
9. Guerra-Jr G, de Mello MP, Assumpção JG, Morcillo AM, Marini SHVL, Baptista MTM, Silva RBPE, Marques-de-Faria AP, Maciel-Guerra AT (1998) True hermaphrodites in the southeastern region of Brazil: a different cytogenetic and gonadal profile. *J Pediatr Endocr Metab* 11:519-524.
10. Hawkins JR, Taylor A, Berta P, Levilliers J, Van der Auwera B, Goodfellow PN (1992) Mutational analysis of *SRY*: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum Genet* 88:471-474.
11. Hawkins JR, Taylor A, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith D, Berkovitz GD (1992) Evidence for increased prevalence of *SRY* mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *Am J Hum Genet* 51:979-984.
12. Hossain A and Saunders GF (2001) The human sex-determining gene *SRY* is a direct target of WT1. *J Biol Chem* 276(20):16817-16823.
13. Kwok C, Tyler-Smith C, Mendonca BB, Hughes I, Berkovitz GN, Goodfellow PN, Hawkins JR (1996) Mutation analysis of the 2 kb 5' to *SRY* in XY females and XY intersex subjects. *J Med Genet* 33:465-468.
14. Marcantonio SM, Fechner PY, Migeon CJ, Perlman EJ, Berkovitz GD (1994) Embryonic testicular regression sequence: a part of the clinical spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis. *Am J Med Genet* 49:1-5.
15. Margarit E, Guillén A, Rebordosa C, Vidal-Taboada J, Sánchez M, Ballesta F, Oliva R (1998) Identification of conserved potentially regulatory sequences of the *SRY* gene from 10 different species of mammals. *Biochem Biophys Res Commun* 245:370-377.
16. McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Costa JM, Souleyreau N, Kucheria K, Boucekkine C, Thibaud E, Brauner R, Flamant F, Fellous M (1992) XY sex reversal associated with a deletion 5' to the *SRY* "HMG box" in the testis-determining region. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11016-11020.
17. Pivnick EK, Watchtel S, Woods D, Simpson JL, Bishop CE (1992) Mutations in the conserved domain of *SRY* are uncommon in XY gonadal dysgenesis. *Hum Genet* 90:308-310.

18. Poulat F, Desclozeaux M, Tuffery S, Jay P, Boizet B, Berta P (1998) Mutation in the 5' noncoding region of the SRY gene in an XY sex-reversed patient. *Hum Mut (supplement)* 1:S192-194.
19. Schmitt-Ney M, Thiele H, Kalwaber P, Bardoni B, Cisternino M, Scherer G (1995) Two novel *SRY* missense mutations reducing DNA binding identified in XY females and their mosaic fathers. *Am J Hum Genet* 56:862-869.
20. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TE (1989) "Molecular cloning: a laboratory manual." New York: Cold Spring Harbor.
21. Scolfaro MR, Cardinalli IA, Stuchi-Perez EG, de-Mello MP, Assumpção JG, Baptista MTM, Silva JMB, Maciel-Guerra AT, Guerra-Jr G (2001) Morphometry and histology of gonads from 13 children with dysgenetic male pseudohermaphroditism. *Arch Pathol Lab Med* 125:652-656.
22. Su H and Lau Y-F C (1993) Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am J Hum Genet* 52:24-38.
23. Veitia RA, Fellous M, McElreavey K (1997) Conservation of Y chromosome-specific sequences immediately 5' to the testis determining gene in primates. *Gene* 199:63-70.
24. Vilain E, McElreavey K, Jaubert F, Raymond JP, Richaud F, Fellous M (1992) Familial case with sequence variant in the testis-determining region associated with two sex phenotypes. *Am J Hum Genet* 50:1008-1011.
25. Vilain E, Fellous M, McElreavey K (1992b) Characterization and sequence of the 5'flanking region of the human testis-determining factor SRY. *Method Mol Cell Biol* 3:128-134.

CAPÍTULO 4

ANÁLISE MOLECULAR DA REGIÃO CROMOSSÔMICA 9p24 E DO GENE *DMRT1*

VIII. ANÁLISE MOLECULAR DA REGIÃO CROMOSSÔMICA 9p24 E DO GENE *DMRT1*

A ocorrência de anomalias genitais foi relatada em 70% dos indivíduos XY com monossomia da porção distal do braço curto do cromossomo 9 ⁹(De Grouchy e Turleau, 1982). Além disso, um número crescente de casos de disgenesia gonadal XY tem sido relatado em indivíduos portadores de deleção em 9p.

Deleções em 9p visíveis em nível citogenético foram associadas a uma síndrome na qual os pacientes frequentemente apresentam retardo mental e anomalias craniofaciais, dentre outras anomalias. Deleções submicroscópicas em 9p24.3, contudo, podem causar reversão sexual e DG pura ou parcial XY sem outros sintomas associados (McDonald *et al.*, 1997; Veitia *et al.*, 1997c; Flejter *et al.*, 1998; Veitia *et al.*, 1998; Calvari *et al.*, 2000).

Na maior parte dos casos, estas deleções submicroscópicas removem um segmento de DNA que contém os genes *DMRT1* e *DMRT2*. Vários trabalhos mostraram que o gene *DMRT1* pode estar envolvido no desenvolvimento testicular e que a presença de duas cópias desse gene é importante para sua função (Raymond *et al.*, 1999a; Raymond *et al.*, 1999b; Raymond *et al.*, 2000).

Para investigar a possibilidade de uma deleção em 9p nos pacientes com distúrbios de diferenciação gonadal desta amostra, foi escolhida a metodologia descrita a seguir. Em primeiro lugar, realizou-se um estudo utilizando microssatélites com o intuito de selecionar pacientes que pudessem apresentar perda de um segmento de DNA no intervalo crítico 9p24.3. Caso o estudo de microssatélites sugerisse perda de heterozigose nesta região cromossômica, a monossomia seria confirmada através das técnicas de “Southern-blotting” e “FISH”.

⁹ De Grouchy e Turleau, 1982 apud Veitia *et al.*, 1998.

VIII.1. Estudo de perda de heterozigosidade na região cromossômica 9p24 através de microssatélites

Para esta análise, foram escolhidos os seguintes marcadores polimórficos situados na extremidade distal de 9p: D9S143 (Furlong *et al.*, 1992); D9S1779, D9S1858, D9S1813 (<http://www.genethon.fr>). A posição relativa destes microssatélites foi descrita por Calvari *et al.* (2000), Guioli *et al.* (1998), Veitia *et al.* (1998) e encontra-se esquematizada na figura 1. Dois deles, D9S1779 e D9S1858, localizam-se na banda 9p24.3 no intervalo crítico associado à reversão do sexo causada por deleções em 9p, sendo que D9S1858 é o marcador mais próximo aos genes *DMRT1* e *DMRT2*.

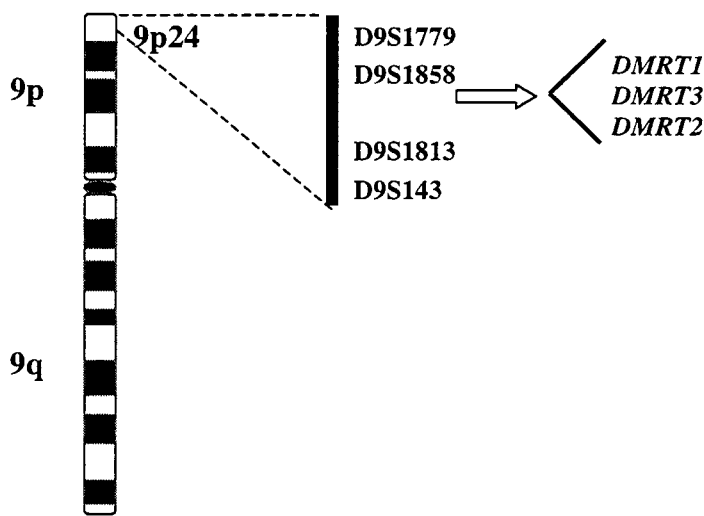


Fig 1. : Mapeamento dos microssatélites estudados na porção terminal do braço curto do cromossomo 9.

VIII.1.1. Amplificação dos microssatélites por PCR

Cada microssatélite foi amplificado numa reação de PCR radioativa independente. A reação de PCR foi realizada num volume final de 12,5 µl contendo de 50 a 100 ng de DNA genômico, 20 pmol de cada “primer”, 200 µM de cada dNTPs (0.2 mM dATP + 0.2 mM dTTP + 0.2 mM dGTP + 0.1 mM dCTP + 1 µCi [α - 32 P] dCTP), 0,25 U de Taq DNA

Polimerase (Gibco-BRL), tampão de reação para a enzima, $MgCl_2$ (1,0 mM a 1,5 mM). Esta reação foi feita de acordo com os seguintes ciclos de temperatura: 94°C por 5 min; 94°C por 30 seg, 57°C por 30 seg, 72°C por 30 seg (25 ciclos); e uma etapa final de 72°C por 5 min.

Os “primers” utilizados nessa reação, bem como informações sobre o tamanho do produto esperado, encontram-se descritos na tabela 1.

Tabela 1: “Primers” utilizados na amplificação dos microssatélites localizados em 9p24.

Loco	% H ^a	Tamanho ^b	“Primer sense” (5' → 3')	“Primer antisense” (5' → 3')
D9S1779	63	124-144	CCCTGCCAGGTGTGCATCCTG	TCAGGCTCCCTCGTGGCTCT
D9S1858	58	236-248	TGCACTGTCCTGCCAAG	CCCAGACTCAGATTTCCCA
D9S1813	83	226-264	GGGCCTGGCACTTAATAC	AATGGCCTAAATAAACCTGG
D9S143	54	111-123	CCAAAAATGATGACTACATCC	GCAACAACAAAAATGAACACT

^a = porcentagem de heterozigotos estimada para esse loco

^b = tamanho dos alelos em pares de base

VIII.1.2. Separação e identificação dos produtos de PCR dos microssatélites

O produto radioativo das reações de PCR foi misturado a um tampão de carregamento contendo 95% de formamida; 0,05% de azul de bromofenol; 20 mM de EDTA, pH 8,0. A seguir, as amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 94°C e aplicadas em gel de desnaturante de poliacrilamida 6%. A eletroforese foi feita a 1500 V, 50 W, 50 mA, por 2 a 4 horas, conforme o tamanho previsto das seqüências. Os géis foram colocados em secador de gel por uma hora e posteriormente expostos a filmes de raio-X (Hyperfilm MP – Amersham-Pharmacia Biotech) a -70°C por 2 a 8 horas.

VIII.1.3 Resultados e Discussão

Exemplos dos padrões de amplificação obtidos para cada microsatélite encontram-se na figura 2.

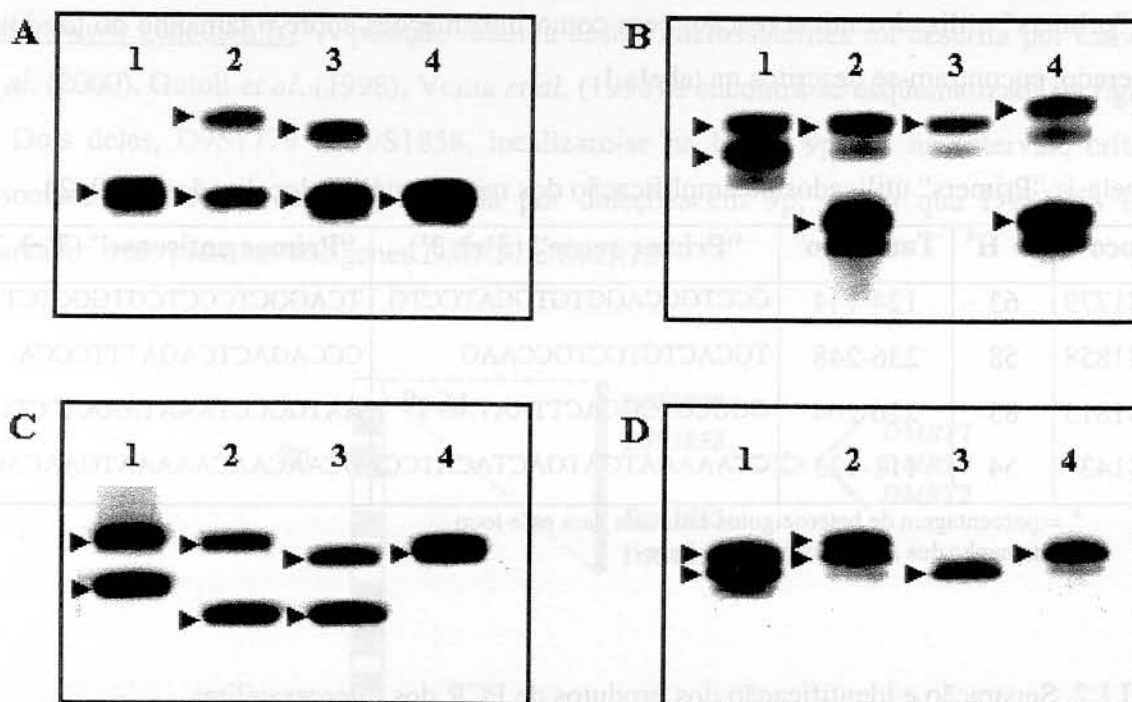


Fig. 2: Padrão de amplificação dos microsatélites localizados em 9p24.3. (A) D9S1779; (B) D9S1858; (C) D9S1813; (D) D9S143. As setas indicam o tamanho relativo dos alelos. Canaletas 1 a 4: controles masculinos.

Estes padrões foram analisados para cada paciente; os resultados foram resumidos na tabela 2. A presença de duas bandas numa determinada canaleta indica que o indivíduo em questão é heterozigoto. A presença de uma única banda pode indicar que o indivíduo é homozigoto, tendo herdado alelos de mesmo tamanho de seus pais, ou pode ainda indicar que o indivíduo apresenta uma deleção de um dos alelos do loco estudado.

De acordo com os dados da tabela 2, sete pacientes têm apenas uma banda para o microssatélite D9S1779, seis têm apenas uma banda para D9S1858, três apresentam apenas uma banda para D9S1813 e dez têm apenas uma banda para D9S143.

Tabela 2: Resumo dos resultados da amplificação dos microssatélites localizados em 9p24

Caso	D9S1779	D9S1858	D9S1813	D9S143
CHP	nt ^a	nt	nt	nt
1	++ ^b	++	++	++
2	++	++	++	++
3	+ ^c	++	++	++
4	+	++	++	++
5	+	++	++	++
6	+	++	++	+
7	+	++	++	+
8	++	++	++	+
9	++	++	++	++
10	++	++	++	+
11	++	++	+	+
12	+	++	++	+
13	++	+	++	++
14	++	++	++	++
15	++	+	++	++
16	++	+	++	+
17	++	++	++	++
18	+	+	+	+
19	++	+	++	++
20	+	+	+	+
21	++	++	++	+

^a nt = não foi testado

^b ++ = presença de dois alelos de tamanhos diferentes (heterozigoto)

^c + = presença de apenas um tamanho de alelo (homozigoto ou hemizigoto)

Para confirmar a perda de heteroziguidade, deve-se estudar o DNA dos pais dos indivíduos que apresentam apenas uma banda em um dos locos situados no intervalo crítico em 9p24. Esta análise torna-se ainda mais importante nos casos dos pacientes que têm apenas um tamanho de alelo no microssatélite DS1858, o qual se encontra mais próximo do gene *DMRT1*. Contudo, dentre os seis pacientes que aparentemente são homozigotos nesse microssatélite, foi possível coletar sangue de familiares em apenas três casos e só em um (paciente 20) o pai e a mãe do indivíduo estavam presentes.

Os pacientes 18 e 20, ambos com diagnóstico de hermafroditismo verdadeiro, apresentam apenas uma banda em todos os locos avaliados. O DNA dos pais do paciente 20 foi estudado e verificou-se que o padrão de segregação dos alelos D9S1858 não foi informativo visto que os membros desta família são homozigotos. A amplificação do microssatélite D9S1813 mostrou que os pais são heterozigotos, e o paciente 20 pode ser homozigoto (tendo herdado dois alelos de mesmo tamanho); esse padrão, contudo, não exclui a possibilidade de que este paciente seja hemizigoto (apresentando apenas um alelo nesse loco). A amplificação de D9S1813 pode ser observada na figura 3.

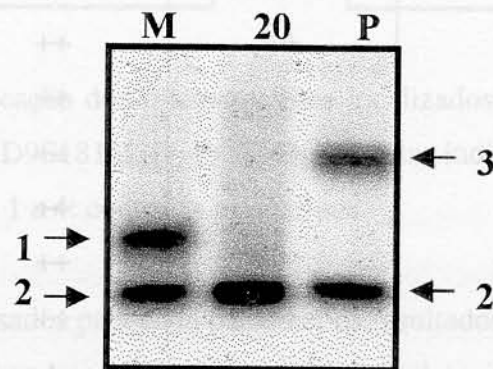


Fig. 3: Amplificação do microssatélite D9S1813 na família do paciente 20. Canaletas: (M) mãe; (20) paciente 20; (P) pai. As setas indicam a posição dos alelos de diferentes tamanhos (1, 2 e 3).

No estudo dos microssatélites em 9p a atenção foi dirigida para os pacientes que apresentam apenas uma banda nos locos estudados. Um dado interessante, no entanto, diz respeito ao padrão de amplificação de D9S1858 na família dos pacientes 3, 4 e 5, que são heterozigotos para esse loco. A distribuição de alelos em sua família mostra que os três irmãos afetados têm exatamente o mesmo genótipo. Tal genótipo, contudo, difere daquele encontrado nos irmãos não afetados (figura 4).

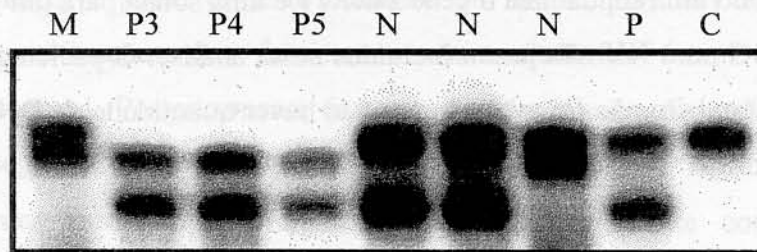


Fig. 4: Padrão de amplificação do microssatélite D9S1858 na família dos pacientes 3, 4 e 5. Canaletas: (M) mãe; (P3) paciente 3; (P4) paciente 4; (P5) paciente 5; (N) irmãos; (P) pai; (C) controle.

Esta distribuição de alelos pode ser casual. Por outro lado, todos os indivíduos XY desta família são portadores da mutação R30I no gene *SRY*, mas só três deles desenvolveram anomalias da diferenciação gonadal. A variação de fenótipos nesta família pode ter sido causada por uma alteração em algum gene que participa da determinação testicular e não está localizado no cromossomo Y. Desta forma, é possível supor que os indivíduos afetados são portadores de uma alteração em *DMRT1* (ou em outro gene localizado em 9p24.3 que seja importante para o desenvolvimento do testículo), o que justificaria a reversão sexual somente nesses casos. Será necessária uma caracterização minuciosa dos alelos de *DMRT1* encontrados nessa família, bem como das sequências próximas a esse gene, para que esta questão seja esclarecida.

O estudo de microssatélites tinha como principal objetivo fazer uma seleção inicial para detectar os pacientes que pudessem apresentar perda de heterozigosidade no intervalo crítico. Dessa forma, a análise do DNA dos pais destes pacientes poderia confirmar a

ocorrência de deleções. Tal estudo, contudo, não foi terminado devido à dificuldade de coletar amostras dos familiares. Para tentar detectar perda de heterozigosidade especificamente no gene *DMRT1* foi utilizada técnica de “Southern-blotting”.

VIII.2. Investigação de deleções de *DMRT1*

Para tentar identificar deleções em *DMRT1* foram realizados experimentos de “Southern-blotting” utilizando uma sonda para o gene *DMRT1* e uma sonda para um gene controle. Os pacientes com DG pura XY não foram incluídos nesta análise. O paciente 6, que apresenta DG parcial XY, também não foi avaliado por não haver quantidade de DNA suficiente para esse experimento.

VIII.2.1. Transferência do DNA para membrana

Para obtenção das membranas, cerca de 10 µg de DNA genômico dos pacientes e controles foram digeridos com a enzima de restrição *HindIII* (Gibco-BRL). As amostras de DNA digerido foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8%, coradas com brometo de etídio e fotografadas sob luz UV. Posteriormente as amostras foram transferidas para membranas Hybond-N (Pharmacia-Biotech) conforme Sambrook *et al.* (1989).

VIII.2.2. Hibridização

A princípio foi feita uma tentativa de hibridizar as membranas utilizando-se produto de PCR purificado dos microssatélites D9S1779 e D9S1858 como sondas. Tais reações, no entanto, geraram enorme “background”. Portanto, decidiu-se utilizar nos experimentos de “Southern blotting” uma sonda para o gene *DMRT1*.

Um produto de 226 pb, foi obtido a partir da amplificação por PCR de parte do exon 1 do gene *DMRT1*. Para tanto foram utilizados os “primers” DMRT1.1s (5'-ACTTCTCCTAGGGGCACCAT-3') e DMRT1.1a (5'-ACTTCTTGCTCCCGGCAC-3'). Um produto de PCR do gene da Conexina 26 (*Cx26*) foi utilizado como controle visto que

este é um gene de cópia única e situa-se em outro cromossomo. Além disso, o produto de PCR de *Cx26* tem um tamanho de 284 pb, próximo ao do produto utilizado para o gene *DMRT1*. Para obtenção do fragmento de *Cx26* foram usados os “primers” Cx1F (5'-TCTTTTCCAGAGCAAACCGC -3') e Cx1R (5'-GACACGAAGATCAGCTGCAG -3') descritos por Kelsell *et al.* (1997).

Os produtos de PCR foram purificados através do kit “Concert Nucleic Acid Purification System” (Gibco-BRL) e posteriormente clonados em vetor “pGEM-T easy” (Promega), conforme as especificações dos fabricantes. As seqüências foram verificadas por sequenciamento manual. Posteriormente foram realizadas a extração e digestão do DNA dos plasmídios, seguidas de purificação dos fragmentos de interesse. Aproximadamente 50 ng dos fragmentos purificados foram marcados radioativamente com [α -³²P]dCTP utilizando o kit “RadPrime DNA Labeling System” (Gibco-BRL). Os fragmentos marcados foram utilizados como sondas na hibridização das membranas.

Incubou-se as membranas por 18 h a 42°C em solução de pré-hibridização contendo formamida deionizada 50%; SSC 5X, Denharts 10X; Tris-HCl 20 mM (pH 7,5); SDS 1%; DNA de esperma de salmão sonificado 200 µg/ml. A hibridização foi realizada por 16h a 42°C na mesma solução descrita para a pré-hibridização, adicionada da sonda marcada. Após a hibridização, as membranas foram lavadas por 15 minutos em uma condição de baixa estringência (1X SSC; 0,1% SDS) à temperatura ambiente. A seguir foram lavadas duas vezes, em condições de alta estringência (0,5% SSC; 0,1% SDS), a 65°C, por cerca de 10 minutos cada vez. Após a lavagem, as membranas foram expostas a filmes de raio-X (Kodak X-OMAT AR) a -70°C por um período adequado.

As imagens obtidas nos filmes autoradiográficos foram digitalizadas e a intensidade dos sinais de hibridização de cada amostra foi quantificada utilizando-se o programa “Kodak Digital Science 1D Image Analysis”, versão 2.0.1. A intensidade da banda referente ao gene *DMRT1* foi comparada à intensidade da banda referente ao gene *Cx26*. Esperava-se que no caso de perda de um alelo de *DMRT1* o valor obtido esta banda correspondesse aproximadamente à metade do valor obtido para a banda *Cx26*.

VIII.2.3. Resultados e Discussão

As imagens das autorradiografias obtidas encontram-se dispostas na figura 5.

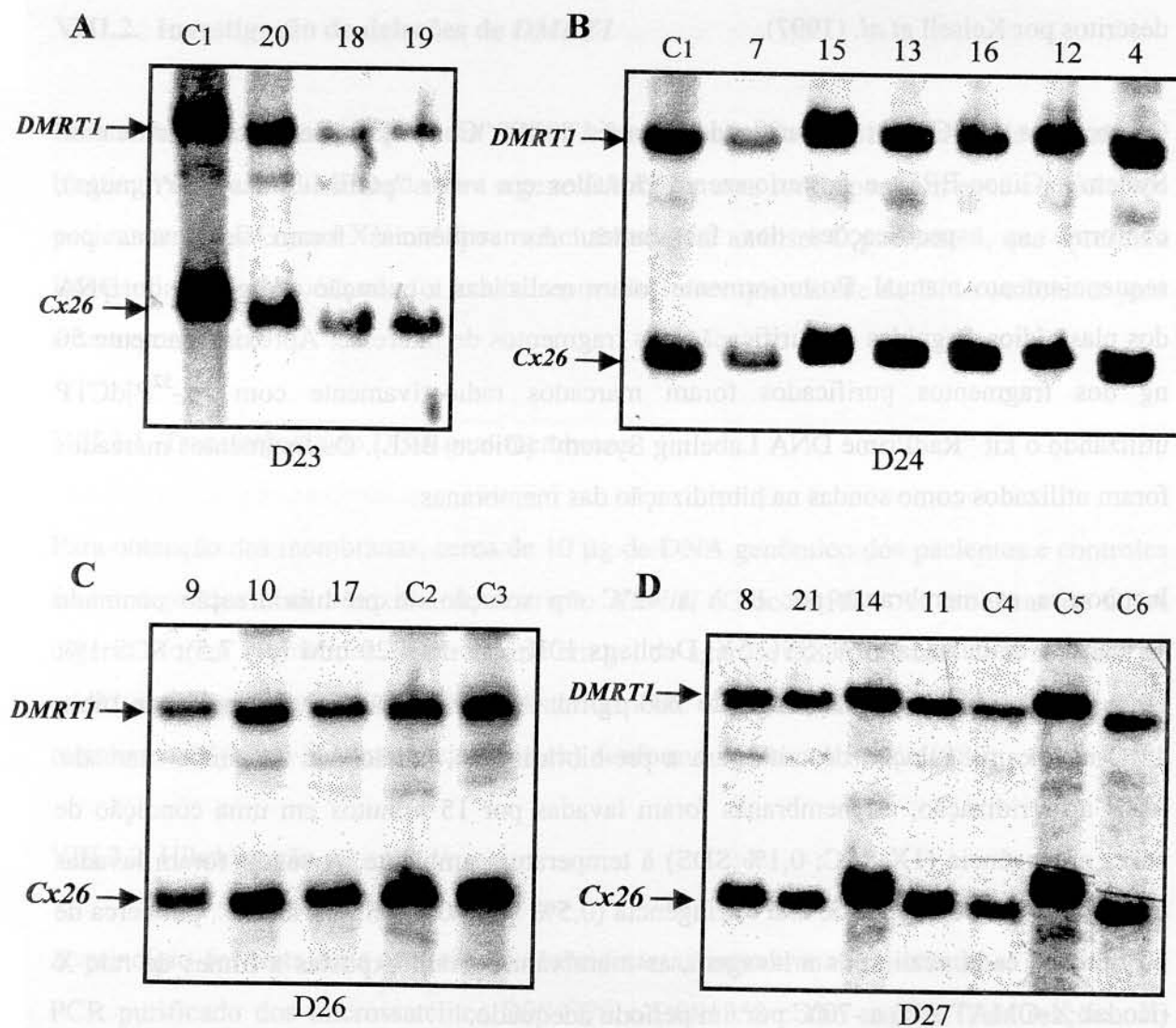


Fig. 5: Fotos das autorradiografias dos “Southern-blots” hibridizados com as sondas DMRT1 e Cx26. (A) Membrana D23: (C1) controle masculino, ¹⁰(20, 18, 19) pacientes; (B) Membrana D24: (C1) controle masculino, (7, 15, 13, 16, 12, 4) pacientes; (C) Membrana D26: (C2, C3) controles masculinos, (9, 10, 17) pacientes; (D) Membrana D27 (C4, C5, C6) controles masculinos (8, 21, 14, 11) pacientes.

¹⁰ número de referência dos pacientes (Casuística, tabela 1)

Os valores da intensidade das bandas obtidas a partir das autoradioagrafias estão resumidos na tabela 3. A intensidade da banda referente ao gene *DMRT1* foi comparada à da obtida para a banda referente ao gene *Cx26*, tanto nos pacientes como em controles masculinos normais.

Tabela 3: Intensidade dos sinais obtidos na hibridização das membranas

Membrana	Referência	DMRT1	Cx26	R1/2 ^a
D23	C1	147.203	158.121	0,93
D23	20	98.968	101.939	0,97
D23	18	48.608	62.873	0,77
D23	19	42.388	75.309	0,56
D24	C1	87.038	96.711	0,90
D24	7	32.238	35.535	0,91
D24	15	157.694	154.412	1,02
D24	13	106.899	129.292	0,83
D24	16	98.353	138.158	0,71
D24	12	122.129	129.612	0,94
D24	4	135.658	134.832	0,99
D26	9	231.777	255.992	0,91
D26	10	301.273	391861	0,77
D26	17	246.962	316.226	0,78
D26	C2	348.366	423.446	0,82
D26	C3	361.977	477.543	0,76
D27	8	184.809	250.427	0,74
D27	21	162.452	201.719	0,81
D27	14	232.595	363.697	0,64
D27	11	183.256	251.457	0,73
D27	C4	135.326	181.101	0,75
D27	C5	261.646	335.731	0,78
D27	C6	189.868	248.706	0,76

^a R1/2 = razão entre as intensidades 1 (DMRT1) e 2 (Cx26)

De acordo com os resultados gerados pela hibridização das membranas, a razão das intensidades das bandas DMRT1/Cx26 varia de 0,76 a 0,94 nos controles masculinos normais, sendo que a média dessa razão é 0,82. Dessa forma, espera-se que no caso de perda de um alelo de *DMRT1* o valor obtido para a razão DMRT1/Cx26 ficasse em torno da metade do valor médio.

A razão mais baixa verificada dentre os indivíduos que compõem esta amostra é de 0,56 (paciente 19, membrana D23). No entanto, neste caso a análise foi prejudicada por uma mancha na membrana que pode ter alterado a intensidade da banda Cx26. O estudo de microssatélites indicou que este paciente apresenta apenas uma banda no loco D9S1858 (tabela 2). Portanto, será necessária nova coleta de sangue deste indivíduo para confirmar a suspeita de perda de heterozigosidade por “Southern-blotting” e “FISH”. O teste de FISH deverá ser realizado também com o DNA do paciente 14 (membrana D27) cuja razão DMRT1/Cx26 é de 0,64.

Nos demais casos, as razões DMRT1/Cx26 estão próximas àsquelas observadas nos controles normais, o que sugere que não há perda de heterozigosidade.

Para a realização da técnica de “Southern-blotting” foi necessário utilizar uma quantidade grande de DNA genômico (10 µg) de cada indivíduo na membrana. A escassez de DNA de alguns pacientes dificultou a repetição dos experimentos bem como a padronização da quantidade de DNA colocada em cada membrana. Tais medidas facilitariam a análise dos dados obtidos nesta etapa do trabalho.

Apesar das limitações técnicas, as análises dos “Southern-blots” sugerem que a deleção da região cromossômica que contém o gene *DMRT1* não é uma causa frequente de reversão sexual XY.

A revisão da literatura indica que os resultados obtidos no presente trabalho são semelhantes àsquelas obtidos por outros grupos que pesquisam alterações em *DMRT1*. Veitia *et al.* (1998) realizaram uma busca por microdeleções em 9p, utilizando

microssatélites, em 10 indivíduos com DG XY pura ou parcial nos quais não se havia encontrado mutações no *SRY* e em *DAX-1*. Em apenas um caso de DG parcial foi encontrada uma deleção em 9p24.3. Utilizando metodologia semelhante, Calvari *et al.* (2000) investigaram 30 casos de reversão sexual XY e encontraram uma deleção sub-microscópica em 9p24.3 em duas irmãs, uma com DG pura e outra com DG parcial.

A análise molecular do DNA dos pacientes estudados por Veitia *et al.* (1998) e Calvari *et al.* (2000) confirmou que deleções em 9p estão associadas à reversão sexual XY na ausência de outras características dismórficas aparentes, mas sugere que este evento não seja muito freqüente visto que de um total de 40 casos encontrou-se alteração em 3.

Em contraste, Ferguson-Smith *et al.* (1998) utilizaram uma sonda de cDNA de 1,5kb do gene *DMRT1* em experimentos de FISH. Dentre onze casos de mulheres XY, três tinham deleção completa do gene em 100% das células analisadas e dois eram mosaicos, apresentando deleção em cerca de 50% das células. Esta freqüência é surpreendente e talvez deva-se, em parte, à diferença da metodologia utilizada. É provável, por exemplo, que os experimentos de microssatélites e de “Southern-blotting” não sejam capazes de revelar deleções nos casos de mosaicismo.

Outro estudo feito através de FISH não corrobora uma alta freqüência de deleções de *DMRT1* em indivíduos com reversão sexual XY (Ottolenghi *et al.*, 2000). Contudo, a sonda utilizada nesta pesquisa era derivada de um cromossomo artificial e tinha tamanho bem maior que a utilizada por Ferguson-Smith *et al.* (1998); portanto esta sonda pode não ter detectado microdeleções.

O mesmo artefato pode acontecer com as análises de microssatélites e “Southern-blotting”. O “Southern-blotting” é eficiente para investigar deleções totais de *DMRT1*. No presente trabalho, a sonda empregada para investigar perda de heterozigosidade no gene *DMRT1* provinha de um fragmento do primeiro exon desse gene. É possível que deleções pequenas que não afetem o exon 1 ocorram nesses pacientes mas não tenham sido detectadas. Da

mesma forma, a análise de microssatélites revelaria deleções que incluíssem as seqüências que flanqueiam o gene e pode não revelar alterações que não incluam os locos estudados.

No entanto, para explicar a raridade de mutações pontuais em *DMRT1* nas mulheres XY foi sugerido que a disgenesia gonadal XY associada a deleções em 9p seria causada pela perda de um segmento de DNA contendo mais de um gene (genes *DMRT1* e *DMRT2*) (Raymond *et al.*, 1999a). Visto que a porção terminal do braço curto do cromossomo 9 contém vários genes com domínios DM, pode-se supor que mais de um gene *DMRT* está envolvido na determinação do sexo. De acordo com este modelo, é pouco provável que microdeleções apenas em *DMRT1* afetem o desenvolvimento testicular. Para que elas o fizessem, deveriam estar combinadas com mutações em *DMRT2*.

Contudo, a deleção detectada por Calvari *et al.* (2000) em uma mulher XY não remove os genes *DMRT1* e *DMRT2*, apesar de situar-se a 30kb da extremidade 5' de *DMRT1*. Estes dados não corroboram a hipótese de que a reversão sexual ocorra devido a haploinsuficiência tanto de *DMRT1* quanto de *DMRT2*. É possível, no entanto, que a deleção tenha removido um elemento regulatório importante para a função desses genes.

Outra possibilidade que deve ser considerada é a de que o gene localizado em 9p24.3 responsável pela reversão sexual não tenha ainda sido encontrado. Ottolenghi *et al.* (2000) fizeram uma busca por mutações e não encontraram qualquer alteração em outros genes situados nesse intervalo. Isso pode indicar que a reversão sexual XY associada a 9p é uma síndrome de deleção ou que o gene envolvido de fato não foi identificado.

Para o momento, a busca de novos genes na região cromossômica 9p24.3 continua. A elucidação da base molecular da reversão sexual causada por re-arranjos no cromossomo 9 provavelmente vai trazer grande avanço nesse campo de pesquisa já que estas alterações podem resultar em disgenesia gonadal na ausência de outras anomalias. Isso sugere que o gene (ou genes) responsável está envolvido na determinação do testículo ou na etapa inicial de sua diferenciação. Portanto, alterações nesse gene vão afetar o desenvolvimento testicular de forma muito semelhante àquela causada por mutações no *SRY*.

IX. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi estudada inicialmente uma paciente com disgenesia gonadal, cujo cariótipo foi caracterizado como sendo 46,X,i(Y)(q11). A ausência do braço curto do cromossomo Y justifica o fenótipo feminino da paciente, bem com a presença de características somáticas típicas da síndrome de Turner.

A seguir, foram estudadas três pacientes com DG pura XY. Nesses casos, o fenótipo feminino deve-se, provavelmente, às mutações encontradas no gene *SRY* das três pacientes: duas são portadoras de mutações no quadro de leitura aberta do *SRY* e uma tem uma deleção na região promotora do gene. Foi demonstrado que as mutações N65H e R30I, localizadas na “ORF”, afetam a capacidade de ligação da proteína *SRY* ao DNA.

Em uma publicação anterior (Assumpção *et al.*, 1999), descrevemos uma paciente com DG pura 46,XY com a mutação W70X. Portanto, nos últimos anos identificamos mutações nas quatro pacientes com DG pura XY que estudamos (100%). Apesar da amostra ser pequena, esses achados sugerem que a frequência de mutações no *SRY* em pacientes com tal diagnóstico seja mais alta do que a que tem sido relatada.

A porcentagem de 10 a 20% de mulheres XY com mutação no *SRY* descrita na literatura deve-se, provavelmente, à análise conjunta de indivíduos com as formas pura e parcial de DG, visto que mutações nos pacientes com a forma parcial são muito mais raras. Além disso, em muitos trabalhos apenas o domínio conservado (“HMG box”) foi estudado e mutações fora desse domínio, ou em elementos regulatórios, podem não ter sido detectadas.

A presença de duas mutações familiares no gene *SRY* nesta amostra (R30I e deleção de 3pb na região promotora) ressalta a importância da avaliação dos familiares nos casos de distúrbios da diferenciação gonadal. Apesar dos artigos publicados sobre esse assunto frequentemente mencionarem que a grande maioria das mutações ocorre *de novo*, um quarto das mutações descritas no *SRY* até hoje são herdadas. Estas famílias são exemplos de

que uma mesma mutação pode estar associada à patologia, mas também pode ocorrer em indivíduos masculinos férteis.

A mutação R30I foi encontrada em todos os indivíduos XY de uma mesma família, incluindo uma paciente com DG pura e dois com DG parcial. Estes foram os únicos indivíduos com diagnóstico de DG parcial, dentre os quatorze avaliados neste trabalho, que apresentaram alteração no gene *SRY*. Portanto, apesar de ser um evento raro, mutações no *SRY* podem estar associadas à forma parcial de DG. Provavelmente, apenas as mutações que não afetam drasticamente a atividade da proteína sejam condizentes com fenótipos nos quais se observa desenvolvimento incompleto do testículo. Dentre os quatro casos descritos na literatura de indivíduos com diagnóstico de DG parcial XY com alteração no gene *SRY* ou nas seqüências que o flanqueiam, três são alterações que ocorreram fora do domínio conservado do gene.

Os resultados indicam que a grande maioria dos casos de DG parcial XY não se deve a mutações no *SRY*. É possível que mutações em alguns dos genes já descritos envolvidos na determinação ou diferenciação sexual sejam responsáveis por este fenótipo. Por exemplo, pode-se cogitar que algum destes pacientes tenha uma alteração no gene *WT1* e ainda não tenha desenvolvido anomalias renais. No entanto, em um trabalho paralelo, o gene *WT1* foi estudado na mesma amostra de pacientes com DG parcial aqui descrita e as únicas alterações encontradas tratavam-se de polimorfismos (Tagliarini E.B., comunicação pessoal).

Mutações no *SRY* não foram encontradas nos quatro pacientes estudados com diagnóstico de hermafroditismo verdadeiro. Existem apenas dois relatos na literatura de hermafroditas verdadeiros com mutações nesse gene. E um dos casos (Braun *et al.*, 1993), a seqüência obtida a partir do DNA de linfócitos era idêntica à normal, no entanto havia duas mutações na seqüência obtida a partir do DNA extraído da gônada. Este exemplo mostra que em algumas situações, especialmente nos casos de hermafroditas verdadeiros, é importante buscar mutações no DNA gonadal. A co-existência da seqüência selvagem e de uma

seqüência mutada poderia explicar o desenvolvimento de tecido testicular e ovariano em um mesmo indivíduo.

A avaliação de deleções no gene *DMRT1* e em outras seqüências localizadas em 9p24.3, embora não tenha sido concluída, não esclareceu a etiologia dos pacientes com DG parcial ou hermafroditismo verdadeiro que não apresentam mutações no *SRY*. O único indivíduo desta amostra para o qual esta análise sugeriu perda de heterozigosidade tem diagnóstico de hermafroditismo verdadeiro. Conforme já foi mencionado, essa possibilidade será investigada futuramente.

No geral os resultados mostram que deleções de *DMRT1* não são comuns nos casos de DG e hermafroditismo verdadeiro. Ou ainda, a metodologia empregada não foi eficiente para detectar possíveis alterações em 9p. Provavelmente, em breve a reversão sexual ligada a essa região cromossômica será decifrada, tornando possível a escolha de uma técnica mais adequada e o esclarecimento de alguns dos casos de DG parcial XY e hermafroditismo verdadeiro.

Vários outros genes que participam dos processos da formação e determinação da gônada e da diferenciação sexual foram identificados recentemente. Com certeza outros ainda estão por ser descobertos. O estudo das funções destes genes, associado à investigação molecular minuciosa dos casos de distúrbios da diferenciação gonadal, certamente irá revelar os fatores que interagem diretamente com o *SRY* e explicar os casos de determinação gonadal ainda não resolvidos.

Até o momento, a maioria dos esforços realizados na tentativa de se entender a forma como os genes interagem aconteceu através de ensaios nos quais testam-se as relações entre um par de fatores: *SRY* e *HAM*, *SRY* e *DAX-1*, *SOX-9* e *SF1*, *SOX-9* e *HAM*, *WT1* e *DAX-1*, e assim por diante. Algumas dessas relações provavelmente são genuínas. Outras, entretanto, resultaram em alianças que provavelmente são artefatos. Muitos destes trabalhos geraram dados contraditórios ou difíceis de se conciliar. Em parte isto se deve ao fato de que estes ensaios são realizados *in vitro* e nem sempre refletem a situação *in vivo*. Outro motivo é

que ainda faltam peças essenciais neste quebra-cabeça, sem as quais ainda não é possível resolvê-lo (Koopman, 2001). Resta a certeza de que os processos de determinação e diferenciação do sexo são bastante complexos e a elucidação de todos os genes envolvidos ainda vai exigir tempo e dedicação dos pesquisadores que trabalham nesta área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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* 22:125-126, 1999.
- Affara, N.A.; Chalmers, I.J.; Ferguson-Smith, M.A. Analysis of the SRY gene in 22 sex-reversed XY females identifies four new point mutations in the conserved DNA binding domain. *Human Molecular Genetics* 2:785-9, 1993.
- Aleck, K.A.; Argueso, L.; Stone J.; Hackel, J.G.; Erickson, R.P. True hermaphroditism with partial duplication of chromosome 22 and without SRY. *American Journal of Medical Genetics* 85:2-4, 1999.
- Arn, P; Chen, H.; Tuck-Muller, C.M.; Mankinen, C.; Watchtel, G.; Li, S.; Shen, C.; Watchtel, S.S. SRVX, a sex reversing locus in Xp21.2-p22.11. *Human Genetics* 93:389-393, 1994.
- Assumpção, J.G.; Guerra, A.T.M.; de Mello, M.P. Recurrence of a nonsense mutation in the conserved domain of SRY in a Brazilian patient with 46,XY gonadal dysgenesis. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 12:455-457, 1999.
- Assumpção, J.G.; Benedetti, C.E.; Maciel-Guerra, A.T.; Guerra Jr, G.; Scolfaro, M.R.; de Mello, M. P. Novel mutations affecting SRY DNA-binding activity: the HMG box N65H associated with 46,XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-HMG box R30I associated with variable phenotypes. *Journal of Molecular Medicine* (in press).
- Bajalica, S.; Blennow, E.; Tsezou, A.; Galla-Voumvouraki, A.; Alevizaki, M.; Sinaniotis, C.; Kitsiou-Tzeli. Partial disomy of Xp and the presence of SRY in a phenotypic female. *Journal of Medical Genetics* 32:987-990, 1995.

- Barbaux, S.; Niaudet, P.; Gubler, M.C.; Grunfeld, J.P.; Jaubert, F.; Kuttann, F.; Fékété, C.N.; Souleyreau-Thervile, N.; Thibaud, E.; Fellous, M.; McElreavey, K. Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nature Genetics* 17:467-470, 1997.
- Bardoni, B.; Floridia, G.; Guioli, S.; Peverali, G.; Anichini, C.; Cisternino, M.; Casalone, E.; Danesino, C.; Fraccaro, M.; Zuffardi, O.; Camerino, G. Functional disomy of Xp22-pter in three males carrying a portion of Xp translocated to Yq. *Human Genetics* 91:333-338, 1993.
- Bardoni, B.; Zanaria, E.; Guioli, S.; Floridia, G.; Worley, K.C.; Tonini, G.; Ferrante, E.; Chiumello, G.; McCabe, E.R.; Fraccaro, M. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature Genetics* 7:497-501, 1994.
- Baud, S.; Margeat, E.; Lumbroso, S.; Paris, F.; Sultan, C.; Royer, C.; Poujol, N. Equilibrium binding assays reveal the elevated stoichiometry and salt-dependence of the interaction between full-length human SRY and DNA. *Journal of Biological Chemistry* (in press).
- Behlke, M.A.; Bogan, J.S.; Beer-Romero, P.; Page, D.C. Evidence that the SRY protein is encoded by a single exon on the human Y chromosome. *Genomics* 17:736-739, 1993.
- Beiguelman, B. *Citogenética Humana*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. 328p.
- Bennet, C.P.; Docherty, Z.; Robb, S.A.; Ramani, P.; Hawkins, J.R.; Grant, D. Deletion 9p and sex reversal. *Journal of Medical Genetics* 30:518-520, 1993.
- Berkovitz, G.D.; Fechner, M.D.; Zacur, H.W.; Rock, J.A.; Snyder III, M.D.; Migeon, C.J.; Perlman, E.J. Clinical and pathologic spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis: its relevance to the understanding of sex differentiation. *Medicine* 10:375-383, 1991.

- Berkovitz, G.D. e Seeherunvong, T. Abnormalities of gonadal differentiation. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 12(1):133-142, 1998.
- Bernstein, R.; Koo, G.C.; Wachtel, S.S. Abnormality of the X chromosome in human 46,XY female siblings with dysgenetic ovaries. *Science* 207:768-769, 1980.
- 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* 348:448-450, 1990.
- Bilbao, J.R.; Loridan, L.; Castaño, L. A novel postzygotic nonsense mutation in SRY in familial XY gonadal dysgenesis. *Human Genetics* 97:537-539, 1996.
- Braun, A.; Kammerer, S.; Cleve, H.; Löhrs, U.; Schwarz, H-P.; Kuhnle, U. True hermaphroditism in a 46,XY individual, caused by a postzygotic somatic point mutation in the male gonadal sex-determining locus (SRY): molecular genetics and histological findings in a sporadic case. *American Journal of Human Genetics* 52: 578-585, 1993.
- Calvari, V.; Bertini, V.; De Grandi, A.; Peverali, G.; Zuffardi, O.; Ferguson-Smith, M.; Knudtzon, J.; Camerino, G.; Borsani, G.; Guioli, S. A new submicroscopic deletion that refines the 9p region of sex reversal. *Genomics* 65:203-212, 2000.
- Cameron, F.J. e Sinclair, A.H. Mutations in *SRY* and *SOX9*: testis-determining genes. *Human Mutation* 9:388-395, 1997.
- Crawford, P.A.; Dorn, C.; Sadovsky, Y.; Milbrandt, J. Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. *Molecular and Cellular Biology* 18(5):2949-2956, 1998.

- Crocker, M.; Coghill, S.B.; Cortinho, R. An unbalanced autosomal translocation (7;9) associated with feminization. *Clinical Genetics* 34:70-73, 1988.
- Collignon, J.; Sockanathan, S.; Hacker, A.; Cohen-Tannoudji, M.; Norris, D.; Rastan, S.; Stevanovic, M.; Goodfellow, P.N.; Lovell-Badge, R. A comparison of the properties of Sox-3 with SRY and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* 122:509-520, 1996.
- Cussen, L.J.; MacMahon, R.A. Germ cells and ova in dysgenetic gonads of a 46,XY female dizygotic twin. *American Journal of Diseases of Children* 133:373-375, 1979.
- de Santa Bárbara, P.; Méjean, C.; Moniot, B.; Malclès, M-H.; Berta, P.; Boizet-Bonhoure, B. Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. *Biology of Reproduction* 64:775-783, 2001.
- Desclozeaux, M.; Poulat, F.; de Santa Barbara, P.; Capony, J.P.; Turowski, P.; Jay, P.; Mejean, C.; Moniot, B.; Boizet, B.; Berta, P. Phosphorylation of an N-terminal motif enhances DNA-binding activity of the human SRY protein. *Journal of Biological Chemistry* 273:7988-7995, 1998.
- Domenice, S.; Nishi, M.Y.; Billerbeck, A.E.C.; Latronico, A.C.; Medeiros, M.A.; Russel, A.R.; Vass, K.; Carvalho, F.M.; Frade, E.M.C.; Arnhold, I.J.P.; Mendonça, B.B. A novel missense mutation (S18N) in the 5' non-HMG box region of the SRY gene in a patient with partial gonadal dysgenesis and his normal male relatives. *Human Genetics* 102: 213-215, 1998.
- Eicher, E.M. e Washburn, L.L. Genetic control of primary sex determination in mice. *Annual Review of Genetics* 20:327-360, 1986.
- Federman, C.C. Disorders of sexual development. *New England Journal of Medicine* 277:351-360, 1967.

- Ferguson-Smith, M.A.; Sanoudou, D.; Lee, C. Microdeletion of DMT1 at 9p24.3 is the commonest cause of 46,XY females. *American Journal of Human Genetics* 63 (supplement):A162, 1998.
- Ferrari, S.; Harley, V.R.; Pontiggia, A.; Goodfellow, P.N.; Lovel-Badge, R.; Bianchi, M.E. SRY, like HMG1, recognises sharp angles in DNA. *The European Journal of Molecular Biology* 11:4497-4506, 1992.
- Flejter, W.L.; Fergestad, J.; Gorski, J.; Varvill, T.; Chandrasekharappa, S. A gene involved in XY Sex reversal is located on chromosome 9, distal to marker D9S1779. *American Journal of Human Genetics* 63:794-802, 1998.
- Fryns, J.P.; Kleczkowska, A.; Casaer, P.; Van Den Berghe, H. Double autosomal chromosomal aberration (3p trisomy/9p monosomy) and sex reversal. *Annales de Génétique* 29:49-52, 1986.
- Ford, C.E.; Jones, K.W.; Polani, P.E.; Almeida, J.C.; Briggs, J.H. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* i:711-713, 1959.
- Foster, J.W. e Graves, J.A.M. An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91:1927-1931, 1994.
- Furlong, R.A.; Lyall, E.W.; Lush, M.J.; Affara, N.A.; Ferguson-Smith, M.A. Four dinucleotide repeat polymorphisms on chromosome 9 (D9S143-146). *Human Molecular Genetics* 1(6):447, 1992.

- Gessler, M.; Poustka, A.; Cavenee, W.; Neve, R.L.; Orkin, S.H.; Bruns, G.A. Homozygous deletions in Wilm's tumors of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343:774-778, 1990.
- Gibbons, R.J.; Wilkie, A.O.M.; Weatherall, D.J.; Higgs, D.R. A newly defined X linked mental retardation syndrome associated with alpha thalassemia. *Journal of Medical Genetics* 28:729-743, 1991.
- Gibbons, R.J.; Bruton, I.; Burn, J.; Clayton-Smith, J.; Davison, B.C.C.; Gardner, R.J.M.; Homfray, T.; Kearney, L.; Kingston, H.M.; Newbury-Ecob, R.; Porteous, M.E.P.; Wilkie, A.O.M.; Higgs, D.R. Clinical and hematologic aspects of the X-linked alpha-thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-X). *American Journal of Medical Genetics* 55:288-299, 1995a.
- Gibbons, R.J.; Picketts, D.J.; Villard, L.; Higgs, D.R. Mutations in a putative global transcription regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X) syndrome. *Cell* 80:837-845, 1995b.
- Giese, K.; Cox, J.; Grosschedl, R. The HMG domain of the lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* 69:185-195, 1992.
- Giulli, G.; Shen, W-H.; Ingraham, H.A. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of müllerian inhibiting substance, *in vivo*. *Development* 124:1799-1807, 1997.
- Goodfellow, P.N. Mapping the Y chromosome. *Development* 101(supplement):39, 1987.
- Goodfellow, P.N. e Darling, S.M. Genetics of sex determination in man and mouse. *Development* 102:251-258, 1988.

- Gordon, J.W. e Ruddle, F.H. Mammalian gonadal determination and gametogenesis. *Science* 211:1265-1271, 1981.
- Graves, J.A.M. Interactions between SRY and SOX genes in mammalian sex determination. *Bioessays* 20:264-269, 1998.
- Gubbay, J.; Collignon, J.; Koopman, P.; Capel, B.; Economou, A.; Munsterberg, A.; Vivian, N.; Goodfellow, P.; Lovell-Badge, R. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346:245-250, 1990.
- Guellaen, G.; Casanova, M.; Bishop, C. Human XX males with Y single-copy DNA fragments. *Nature* 307:172-173, 1984.
- Guerra Jr., G. Análise da resolução de 163 casos de ambigüidade genital em atendimento interdisciplinar no hospital das clínicas da universidade estadual de Campinas de 1989 a 1995. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1997.
- Guerra Jr., G. e Maciel-Guerra, A.T. A determinação e a diferenciação sexual normais: atualização. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 41:191-197, 1997.
- Guerra Jr., G.; Mello, M.P.; Assumpção, J.G.; Morcillo, A.M.; Marini, H.V.L.; Baptista, M.T.M.; Silva, R.B.P.E.; Marques-de-Faria, A.P.; Maciel-Guerra, A.T. True hermaphrodites in the Southeastern region of Brazil: a different cytogenetic and gonadal profile. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 11:519-524, 1998.
- Guioli, S.; Schmitt, K.; Critcher, R.; Bouzyk, M.; Spurr, N.K.; Ogata, T.; Hoo, J.J.; Pinski, L.; Gimelli, G.; Pasztor, L.; Goodfellow, P.N. Molecular analysis of 9p deletions associated with XY sex reversal: refining the localization of a sex reversal: refining the localization of a sex-determining gene on the tip of the chromosome. *American Journal of Human Genetics* 63:905-908, 1998.

- Guo, W.; Burris, T.P.; McCabe, E.R. Expression of Dax-1, the gene responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenital and hypogonadotropic hypogonadism in the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axis. *Biochemistry and Molecular Medicine* 56:8-13, 1995.
- Hacker, A.; Capel B.; Goodfellow, P.; Lovell-Badge, R. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121:1603-1614, 1995.
- Hanley, N.A.; Hagan, D.M.; Clement-Jones, M.; Ball, S.G.; Strachan, T.; Salas-Cortés, L.; McElreavey, K.; Lindsay, S.; Robson, S.; Bullen, P.; Ostrer, H.; Wilson, D.I. SRY, SOX9 and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mechanisms of Development* 91:402-407, 2000.
- Harley, V.R.; Jackson, D.I.; Hextall, P.J; Hawkins, J.R.; Berkovitz, G.D.; Sockanathan, S.; Lovell-Badge, R.; Goodfellow, P.N. DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science* 255:453-456, 1992.
- Harrison, R.G. Clinical Embryology. Londres: Academic Press, 1978.
- Haseltine, F.P.; Genel, M.; Crawford, J.D. H-Y antigen negative patients with testicular tissue and 46,XY karyotype. *Human Genetics* 57:265-268, 1981.
- Hawkins, J.R.; Taylor, A.; Goodfellow, P.N.; Migeon, C.J.; Smith, D.; Berkovitz, G.D. Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *American Journal of Human Genetics* 51:979-984, 1992.
- Hines, R.S.; Tho, S.P.; Zhang, Y.Y.; Plouffe Jr, L.; Hansen, K.A.; Khan, I.; McDonough, P.G. Paternal somatic and germ-line mosaicism for a sex-determining region on Y

- (SRY) missense mutation leading to recurrent 46,XY sex reversal. *Fertility and Sterility* 67:675-679, 1997.
- Hiort, O. e Klauber, G.T. True hermaphroditism with 46,XY karyotype and a point mutation in the SRY gene. *The Journal of Pediatrics* 126:1022, 1995.
- Hoo, J.J.; Salafsky, I.S.; Lin, C.C.; Pinsky, L. Possible location of a recessive testis forming gene on 9p24. *American Journal of Human Genetics* 45(supplement):A78, 1989.
- Hossain, A. e Saunders, G.F. The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *Journal of Biological Chemistry* 276(20):16817-16823, 2001.
- Houston, C.S.; Opitz, J.M.; Spranger, J.W.; Macpherson, R.I.; Reed, M.H.; Gilbert, E.F.; Herrmann, J.; Schinzel, A. The campomelic syndrome: review, report of 17 cases and follow-up on the currently 17-year-old boy fist reported by Maroteaux et al. in 1971. *American Journal of Medical Genetics* 15:3-28, 1983.
- Huang, B.; Wang, S.; Ning, Y.; Lamb, A.N.; Bartley, J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *American Journal of Medical Genetics* 87:349-353, 1999.
- Huret, J.L.; Leonard, C.; Forestier, B.; Rethoré, M.O.; Lejeune, J. Eleven new cases of del(9p) and features from 80 cases. *Journal of Medical Genetics* 25:741-749, 1988.
- 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* 8:654-662, 1996.
- Imai, A.; Takagi, A.; Tamaya, T. A novel sex-determining region on Y (SRY) missense mutation identified in a 46,XY female and also in the father. *Endocrinology Journal* 46:735-739, 1999.

- Ion, R.; Telvi, L.; Chaussain, J.L.; Barbet, J.P.; Nunes, M.; Safar, A.; Réthoré, M.O.; Fellous, M.; McElreavey, K. Failure of testicular development associated with a rearrangement of 9p24.1 proximal to the SNF2 gene. *Human Genetics* 102:151-156, 1998.
- Jacobs, P.A.; Strong, J.A. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183:302-303, 1959.
- Jägger, R.J.; Harley, V.R.; Pfeiffer, R.A.; Goodfellow, P.N.; Scherer, G. A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes. *Human Genetics* 90:350-355, 1992.
- Jost, A.; Vigier, B.; Prepin, J.; Perchellet, J.P. Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Progress in Hormone Research*. 29:1-41, 1973.
- Jordan, B.K.; Mohammed, M.; Saunders, T.C.; Délot, E.; Chen, X-N.; Dewing, P.; Swain, A.; Rao, N.; Elejalde, B.R.; Vilain, E. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage sensitive sex reversal in humans. *American Journal of Human Genetics* 68:1102-1109, 2001.
- Jotterand, M.; Juillard, E. A new case of trisomy for the distal part of 13q due to maternal translocation, t(9;13)(21;q21). *Human Genetics* 33:213-222, 1976.
- Kamachi, Y.; Chean, K.S.; Kondoh, H. The mechanism of regulatory target selection by the SOX HMG domain proteins as revealed by comparison of SOX1/2 and SOX9. *Molecular and Cell Biology* 19:107-120, 1999.
- Kelsell, D.P.; Dunlop, J.; Stevens, H.P.; Lench, N.J.; Liang, J.N.; Parry, G.; Mueller, R.F.; Leigh I.M. *Nature* 387:80-83, 1997

- Koopman, P.; Gubbay, J.; Collignon, J.; Lovell-Badge, R. Zfy gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. *Nature* 342:940-942, 1989.
- Koopman, P.; Münsterberg, A.; Capel, B.; Vivian, N.; Lovell-Badge, R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348:450-452, 1990.
- Koopman, P.; Gubbay, J.; Vivian, N.; Goodfellow, P.; Lovell-Badge, R. Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature* 351:117-121, 1991.
- Koopman, P. Sry, Sox9 and mammalian sex determination p.25-56. *Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination*. Birkhäuser Verlag Basel, 2001.
- Kreiberg, J.A.; Sariola, H.; Loring, J.M.; Maeda, M.; Pelletier, J.; Housman D., Jaenisch, R. WT1 is required for early kidney development. *Cell* 74: 679-691, 1993.
- Krob, G.; Braun, A.; Kuhnle, U. True hermaphroditism: geographical distribution, clinical findings, chromosomes and gonadal histology. *European Journal of Pediatrics* 153:2-10, 1994.
- Kwok , C.; Tyler-Smith, C.; Mendonça, B.B.; Hughes, I.; Berkowitz, G.D.; Goodfellow, P.N.; Hawkins, J.R. Mutational analysis of 2Kb 5'to the SRY in XY females and XY intersex subjects. *Journal of Medical Genetics* 33:465-468, 1996a.
- Kwok, C.; Goodfellow, P.N.; Hawkins, J.R. Evidence to exclude SOX9 as a candidate gene for XY sex reversal without skeletal malformation. *Journal of Medical Genetics* 33:800-801, 1996b.

- Levilliers, J.; Quack, B.; Weissenbach, J.; Petit, C. Exchange of terminal portions of X and Y chromosomal short arms in humans XY females. *Proceedings of National Academy of Science USA* 86:2296-2300, 1989.
- Li, B.; Zhang W.; Chan, G.; Jancso-Radeck, A.; Liu, S.; Weiss, M.A. Human sex reversal due to impaired nuclear localization of SRY. *Journal of Biological Chemistry* 276(49):46480-46484, 2001.
- 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.
- Magenis, R.E.; Allen, L.J.; Brown, M.G. 9p monosomy associated with XY gonadal dysgenesis: a contiguous gene syndrome. *American Journal of Human Genetics* 47 (supplement):A33, 1990.
- Marcantonio, S.M.; Fechner, P.Y.; Migeon, C.J.; Perlman, E.J.; Berkovitz, G.D. Embryonic testicular regression sequence: a part of the clinical spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis. *American Journal of Medical Genetics* 49:1-5, 1994.
- McDonald, M.T.; Flejter, W.; Sheldon, S.; Putzi, M.J.; Gorski, J.L. XY sex reversal and gonadal dysgenesis due to 9p24 monosomy. *American Journal of Medical Genetics* 73: 321-326, 1997.
- McElreavey, K.; Vilain, E.; Abbas, N.; Costa, J.M.; Souleyreau, N.; Kucheria, K.; Boucekkine, C.; Thibaud, E.; Brauner, R.; Flamant, F.; Fellous, M. XY sex reversal associated with a deletion 5' to the SRY "HMGbox" in the testis-determining region. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 89:11016-11020, 1992.
- McElreavey, K.; Vilain, E.; Barbaux, S.; Fuqua, J.S.; Fechner, P.Y.; Souleyreau, N.; Doco-Fenzy, M.; Gabriel, R.; Quereux, C.; Fellous, M.; Berkovitz, G.D. Loss of sequences 3' to the testis-determining gene, SRY, including the Y pseudoautosomal boundary

- associated with partial testicular determination. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 93:8590-8594, 1996.
- McElreavey, K. e Fellous, M. Sex determination and the Y chromosome. *American Journal of Medical Genetics* 89:176-185, 1999.
- McLaren, A. What makes a man a man? *Nature* 346:216, 1990.
- Mendes, J.R.T.; Strufaldi, M.W.L.; Delcelo, R.; Moisés, R.C.M.S.; Vieira, J.G.; Kasamatsu, T.S.; Galera, M.F.; Andrade, J.A.D.; Verreschi, I.T.N. Y-chromosome identification by PCR and gonadal histopathology in Turner's syndrome without overt Y-mosaicism. *Clinical Endocrinology* 50:19-26, 1999.
- Meyer, J.; Südbek, P.; Held, M.; Wagner, T.; Schmitz, M.L.; Bricarelli, F.D.; Eggermont, E.; Friedrich, U.; Hass, O.A.; Kolbert, A.; Leroy, J.L.; Maldergem, L.V.; Michel, E.; Mitulla, B.; Pfeiffer, R.A.; Schinzel, A.; Schmidt, H.; Scherer, G. Mutational analysis of the SOX9 gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: lack of genotype/phenotype correlation. *Human Molecular Genetics*:91-98, 1997.
- Moniot, B.; Berta, P.; Scherer, G.; Südbek, P.; Poulat, F. Male specific expression suggests role of DMRT1 in human sex determination. *Mechanisms of Development* 91:323-325, 2000.
- Moore, K.L., Editor. *Embriologia Clínica*. Interamericana. Rio de Janeiro, 1978.
- Morais-da-Silva, S.; Hacker, A; Harley, V.; Goodfellow, P.; Swain, A; Lovell-Badge, R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genetics* 14(1):62-68, 1996.
- Muroya, K.; Okuyama, T.; Goishi, K.; Ogiso, Y.; Fukuda, S.; Kameyama, J.; Sato, H.; Suzuki, Y.; Terasaki, H.; Gomyo, H.; Wakui, K.; Fudushima, Y.; Ogata, T. Sex-

- determining gene(s) on distal 9p: clinical and molecular studies in six cases. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85(9):3094-3100, 2000.
- Nachtigal, M.W.; Hirokawa, Y.; Enyeart-VanHourten, D.L.; Flanagan, J.N.; Hammer, G.D.; Ingraham, H.A. Wilm's tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell*, 93:445-454, 1998.
- Ng, L-J.; Wheatley, S.; Muscat, G.E.O.; Conway-Campbell, J.; Bowles, J.; Wright, E.; Bell, D.M.; Tam, P.P.; Cheah, K.S.; Koopman, P. SOX9 binds DNA, activates transcription and co-expresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Developmental Biology* 183:108-121, 1997.
- Nordenskjöld, A.; Fricke, G.; Anvret, M. Absence of mutations in the WT1 gene in patients with XY gonadal dysgenesis. *Human Genetics* 96:102-104, 1995.
- Ogata, T.; Hawkins, J.R.; Taylor, A.; Matsuo, N.; Hata, J.; Goodfellow, P.N. Sex reversal in a child with a 46,X,Yp+ karyotype: support for the existence of a gene(s), located in distal Xp, involved in testis formation. *Journal of Medical Genetics* 29:226-230, 1992.
- Ogata, T.; Muroya, D.; Matsuo, N.; Hata, J.; Fukushima, Y.; Suzuki, Y. Impaired male sex development in an infant with molecularly defined partial 9p monosomy: implication for a testis forming gene(s) on 9p. *Journal of Medical Genetics* 34:331-334, 1997.
- Ottolenghi, C.; Veitia, R.; Quintana-Murci, L.; Torchard, D.; Scapoli, L.; Souleyreau-Therville, N.; Beckmann, J.; Fellous, M.; McElreavey, K. The region on 9p associated with 46,XY sex reversal contains several transcripts expressed in the urogenital system and a novel doublesex-related domain. *Genomics* 64:170-178, 2000.
- Page, D.C. Sex reversal: deletion mapping the male-determining function of the human Y chromosome. *Cold Spring Harbour Symposium Quant Biology* 51:224-226, 1986.

- Page, D.C. Hypothesis: a Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development* 101 (supplement):151-155, 1987a.
- Page, D.C.; Mosher, R.; Simpson, E.M.; Fisher, E.M.C.; Mardon, G.; Pollack, J.; McGillivray, B.; de la Chapelle, A.; Brown, L.G. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51:1091-1104, 1987b.
- Palmer, M.S.; Sinclair, A.H.; Berta, P.; Ellis, A. Goodfellow, P.N.; Abbas, N.E.; Fellous, M. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 342:937-939, 1989.
- Pelletier, J.; Bruening, W.; Kashtan, C.E.; Mauer, S.M.; Manivel, J.C.; Striegel, J.E.; Houghton, D.C.; Junien, C.; Habib, R.; Fouser, L. Germline mutations in the Wilm's tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital developmental in Denys-Drash syndrome. *Cell* 67:437-447, 1991.
- Pivnick, E.K.; Watchtel, S.; Woods, D.; Simpson, J.L.; Bishop, C.E. Mutations in the conserved domain of SRY are uncommon in XY gonadal dysgenesis. *Human Genetics* 90:308-310, 1992.
- Pontiggia, A.; Rimini, R.; Harley, V.R.; Goodfellow, P.N.; Lovell-Badge, R.; Bianchi, M.E. Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. The European Molecular Biology Organization *Journal (EMBO)* 13:6115-6124, 1994.
- Poulat, F.; Girard, F.; Chevron, M.P.; Gozé, C.; Rebillard, X.; Calas, B.; Lamb, N.; Berta, P. Nuclear localization of the testis determining gene product SRY. *Journal Cell Biology* 128:737-748, 1995.
- Poulat, R.; de Santa-Barbara, P.; Desclozeaux, M.; Soullier, S.; Moniot, B.; Bonneaud, N.; Boizet, B.; Berta, P. The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor

containing PDZ protein interaction domains. *Journal of Biological Chemistry* 272(11):7167-7172, 1997.

Poulat, F.; Desclozeaux, M.; Tuffery, S.; Jay, P.; Boizet, B.; Berta, P. Mutation in the 5'noncoding region of the SRY gene in an XY sex-reversed patient. *Human Mutation* 1 (supplement):S192-S194, 1998.

Prader, A. Der genitalbefund beim pseudohermaphroditismus femininus des kongenitalen adrenogenitalen syndrome. *Helv Paediatr Acta* 9:231-248, 1954.

Pritchard, C.A. e Goodfellow, P.N. Molecular analysis of the Y chromosome: definition of the boundary between the pseudoautosomal region and Y specific sequences and the identification of a candidate sequence for the male determining gene. *Nature, London* 328:273-275, 1987.

Raymond, C.S.; Shamu, C.E.; Shen, M.M.; Seifert, K.J.; Hirsch, B.; Hodgkin, J.; Zarkower, D. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391:691-694, 1998.

Raymond, C.S.; Parker, E.D.; Kettlewell, J.R.; Brown L.G.; Page, D.C.; Kusz, K.; Jaruzelska, J.; Reinberg, Y.; Flejter, W.L.; Bardwell, V.J.; Hirsch, B.; Zarkower, D. A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Human Molecular Genetics* 8:989-996, 1999a.

Raymond, C.S.; Kettlewell, J.R.; Hirsch, R.; Bardwell, V.J.; Zarkower, D. Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Developmental Biology* 215:208-220, 1999b.

- Raymond, C.S.; Murphy, M.W.; O'Sullivan, M.G.; Bardwell, V.J.; Zarkower, D. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes and Development* 14(20):2587-2595, 2000.
- Rey, R.A.; Belville, C.; Nihoul-Fékété, C.; Michel-Calemard, L.; Forest, M.G.; Lahlou, N.; Jaubert, F.; Mowszowicz, I.; David, M.; Saka, N.; Bouvattier, C.; Bertrand, A.M.; Lecointre, G.; Soskin, S.; Cabrol, S.; Crosnier, H.; Léger, J.; Lortat-Jacob, S.; Nicolino, M.; Rabl, W.; Toledo, S.P.A.; Bas, F.; Gompel, A.; Czernichow, P.; Chatelain, P.; Rappaport, R.; Morel, Y.; Josso, N. Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum antimüllerian hormone measurement. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84:627-631, 1999.
- Rossi, P.; Dolci, S.; Albanesi, C.; Grimaldi, P.; Geremia, R. Direct evidence that the mouse sex-determining gene Sry is expressed in the somatic cells of male fetal gonads and in the germ cell line in the adult testis. *Molecular Reprod Development* 34:369-373, 1993.
- Saenger, P. Abnormal sex differentiation. *The Journal of Pediatrics* 104:1-17, 1984.
- Salas-Cortés, L.; Jaubert, F.; Barbaux, S.; Nessmann, C.; Bono, M.R.; Fellous, M.; McElreavey, K.; Roseblatt, M. The human SRY protein is present in fetal and adult Sertoli cells and germ cells. *The International Journal of Developmental Biology* 43:143-140, 1999.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.E. Molecular cloning: a laboratory manual, 2^a ed., Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y., 1989.
- Scherer, G.; Held, M.; Erdel, M.; Meschede, D.; Host, J.; Lesniewicz, R.; Midro, A.T. *Cytogenetics and Cell Genetics* 80(1-4):188-192, 1998.

- Schimitt-Ney, M.; Thiele, H.; Kalwaber, P.; Bardoni, B.; Cisternino, M.; Scherer, G. Two novel SRY missense mutations reducing DNA binding identified in XY females and their mosaic fathers. *American Journal of Human Genetics*, 56:862-869, 1995.
- Schneider-Gadicke, A.; Beer-Romero, P.; Brown, L.G. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell* 57:1247-1258, 1989.
- Scolfaro, M.R.; Cardinalli, I.A.; Stuchi-Perez, E.G.; de-Mello, M.P.; Assumpção, J.G.; Baptista, M.T.M.; Silva, J.M.B.; Maciel-Guerra, A.T.; Guerra-Jr, G. Morphometry and histology of gonads from 13 children with dysgenetic male pseudohermaphroditism. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 125:652-656, 2001.
- Shen, W.H.; Moore, C.C.D.; Ikeda, Y.; Parker, K.L.; Holly, A.I. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77:651-661, 1994.
- Sinclair, A.H.; Poster, J.W.; Spencer, J.A. Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials. *Nature* 336:780-783, 1988.
- 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* 346:240-244, 1990.
- Spurdle, A.B.; Shankman, S.; Ramsay, M. XX True hermaphroditism in Southern African blacks: exclusion of SRY sequences and uniparental disomy of the X chromosome. *American Journal of Medical Genetics* 55:53-56, 1995.
- Stevanovic, M.; Lovell-Badge, R.; Collignon, J.; Goodfellow, P.N. SOX-3 is an X-linked gene related to SRY. *Human Molecular Genetics* 2(12):2013-2018, 1993.

- Su, H. e Lau, Y.F.C. Identification of the transcriptional unit. structural organisation, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *American Journal of Human Genetic* 52:24-38, 1993.
- Südbeck, P. e Scherer, G. Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *Journal of Biological Chemistry* 272:27848-27852, 1997.
- Sugawara, T.; Holt, J.A.; Kiriakidou, M.; StraussIII, J.F. Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry* 35:9052-9059, 1996.
- Swain, A.; Zanaria, E.; Hacker, A.; Lovell-Badge, R.; Camerino, G. Mouse Dax-1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal hypothalamus function. *Nature Genetics* 12:404-409, 1996.
- Swain, A.; Narvaez, V.; Burgoyne, P.; Camerino, G.; Lovell-Badge, R. Dax1 antagonizes SRY action in mammalian sex determination. *Nature* 391:761767, 1998.
- Tajima, T.; Nakae, J.; Shinohara, N.; Fujieda, K. A novel mutation localised in the 3' non-HMG box region of the SRY gene in 46,XY gonads dysgenesis. *Human Molecular Genetics* 3:1187-1189, 1994.
- Tommerup, N.; Schempp, W.; Mienecke, P.; Pedersen, S.; Bolund, L.; Brandt, C.; Goodpasture, C.; Guldberg, P.; Held, K.R.; Reinwein, H. Assignment of an autosomal sex reversal locus (SRA1) and campomelic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3-q25.1. *Nature Genetics* 4:170-174, 1993.
- Vainio, S.; Heikkilä, M.; Kispert, A.; Chin, N.; McMahon, A.P. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397:405-409, 1999.

- Veitia, R.A.; Feelous, M.; McElreavey, K. Conservation of Y chromosome-specific sequences immediately 5' to the testis determining gene in primates. *Gene* 199:63-70, 1997a.
- Veitia, R.; Ion, A.; Barbaux, S.; Jobling, M.A.; Souleyreau, N.; Ennis, K.; Ostrer, H.; Tosi, M.; Meo, T.; Chibani, J.; Fellous, M.; McElreavey, K. Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype. *Human Genetics* 99:648-652, 1997b.
- Veitia, R.A.; Nunes, M.; Brauner, R.; Doco-Fenzy, M.; Joanny-Flinois, O.; Jaubert, F.; Lortat-Jacob, S. Deletions of distal 9p associated with 46,XY male to female sex reversal: definition of the breakpoints at 9p23.3-p24.1. *Genomics* 41:271-274, 1997c.
- Veitia, R.A.; Nunes, M.; Quintana-Murci, L.; Rappaport, R.; Thibaud, E.; Jaubert, F.; Fellous, M.; McElreavey, K.; Gonçalves, J.; Silva, M.; Rodrigues, J.C.; Caspurro, M.; Boieiro, F.; Marques, R.; Lavinha, J. Swyer syndrome and 46,XY partial gonadal dysgenesis associated with 9p deletions in the absence of monosomy-9p syndrome. *American Journal of Human Genetics* 63:901-905, 1998.
- Veitia, R.A.; Salas-Cortés, L.; Ottolenghi, C.; Pilhoux, E.; Cotinot, C.; Fellous, M. Testis determination in mammals: more questions than answers. *Molecular and Cellular Endocrinology* 179:3-16, 2001.
- Vernaud, G.; Page, D.C.; Simmler, M.C.; Brown, L.; Royer, F.; Noel, B.; Botstein, D.; de la Chapelle, A.; Weissenbach, J.A. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Journal of Human Genetics* 38:109-124, 1986.
- Verp, M.S. e Simpson, J.L. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 25:191-218, 1987.

- Vidal, V.P.; Chaboissier, M.C.; Rooij, D.G.; Schedl, A. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nature Genetics* 28(3):216-217, 2001.
- Vilain, E.; Fellous, M.; McElreavey, K. Characterization and sequence of the 5'flanking region of the human testis-determining factor SRY. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 3:128-134, 1992.
- Voutilainen, R. Differentiation of the fetal gonad. *Hormone Research* 38 (supplement):66-71, 1992.
- Wachtel, S.S.; Koo, S.; Boyse, E.A. Evolutionary conservation of H-Y antigen. *Nature* 254:270-272, 1975.
- Wagner, T.; Wirth, J.; Meyer, J.; Zabel, B.; Held, M.; Zimmer, J.; Parasantes, J.; Bricarelli, F.D.; Keutel, J.; Wolf, U.; Tommerup, N.; Schempp, W.; Scherer, G. Autosomal sex reversal and Campomelic Dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79:1111-1120, 1994.
- Wilkie, A.O.M.; Campbell, F.M.; Daubeney, P; Grant, D.B.; Daniels, R.J.; Mullarkey, M.; Affara, N.A.; Fitchett, M.; Huson, S.M. Complete and partial XY sex reversal associated with terminal deletion of .10q: report of 2 cases and literature review. *American Journal of Medical Genetics* 46:597-600, 1993.
- Yu, R.N.; Ito, M.; Saunders, T.L.; Camper, S.A.; Jameson, J.L. Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nature Genetics* 20:353-357, 1998.
- Zanaria, E.; Muscatelli, F.; Bardoni, B.; Strom, T.M.; Guioli, S.; Guo, W.; Lalli, E.; Moser, C.; Walker, A.P.; McCabe, E.R.B.; Meitinger, T.; Monaco, A.P.; Sassone-Corsi, P.; Camerino, G. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372:635-641, 1994.

ANEXO 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

In fact, some authors consider DMP a variant of mixed gonadal dysgenesis,^{4,8–9} which is defined as the coexistence of a streak gonad and a dysgenetic testis in a patient with a 45,X/46,XY karyotype.^{1,8,10} In order to rule out the presence of Denys-Drash syndrome, which occurs as a consequence of mutations at the *WT1* gene on chromosome 11, patients with DMP must be examined periodically for the presence of Wilms tumor and nephropathy with progressive renal failure.¹¹

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

Accepted for publication January 3, 2001.

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

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

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

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

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

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

† According to the classification of Quigley et al.²¹

‡ Total testosterone level after hCG stimulation test.

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

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

¶ Basal total testosterone level.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

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

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

Routine hormonal determination was performed by radioimmunoassay and included basal levels of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), androstenedione, and dehydroepiandrosterone. Total testosterone levels were determined before and 24 hours after the last of a series of 3 daily intramuscular injections of 2000 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) (Profasi hp, Serono Lab, São Paulo, Brazil). An increase in testosterone level of more than 4.9 nmol/L (1.4 ng/mL) was considered normal. When testosterone levels did not increase, determination of serum β-hCG was performed to confirm that it was really used. Serum AMH levels were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay, using antibodies against human recombinant AMH,¹² in the laboratory of the Unité de Recherches sur l'Endocrinologie du Développement (INSERM), Montrouge, France. In one patient (patient 4), who was less than 6 months of age, testosterone levels were assayed only in baseline blood samples, because, at this age, testosterone values in normal children are elevated. All patients had low AMH levels as compared with the normal values published by Rey et al.⁵ They also had decreased testosterone levels either at baseline or after hCG stimulation, with no accumulation of testosterone precursors. All patients had a predominance of FSH over LH, despite the fact

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

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

Methods

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

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

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

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

RESULTS

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

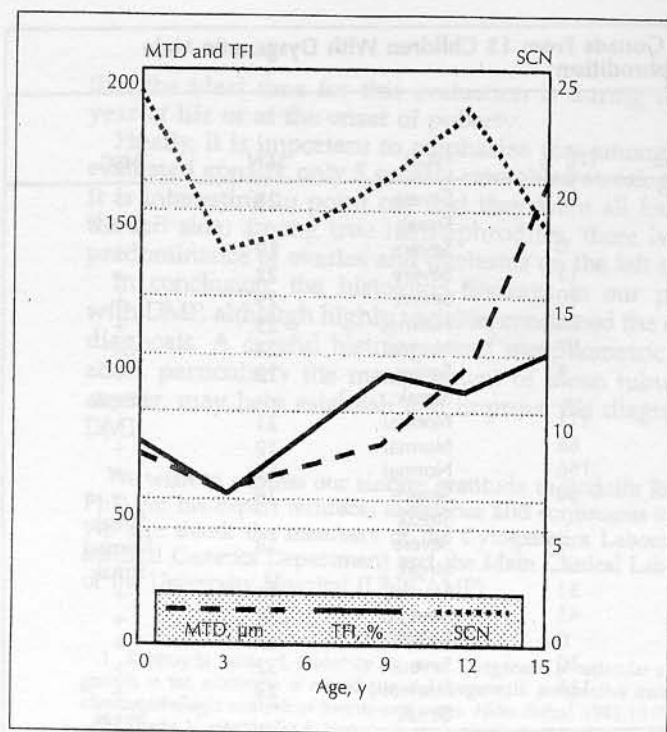


Figure 1. Changes in the mean tubular diameter (MTD), tubular fertility index (TFI), and Sertoli cell number (SCN) profiles from birth to puberty (adapted from Nistal and Paniagua¹³).

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

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

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

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

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

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

COMMENT

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

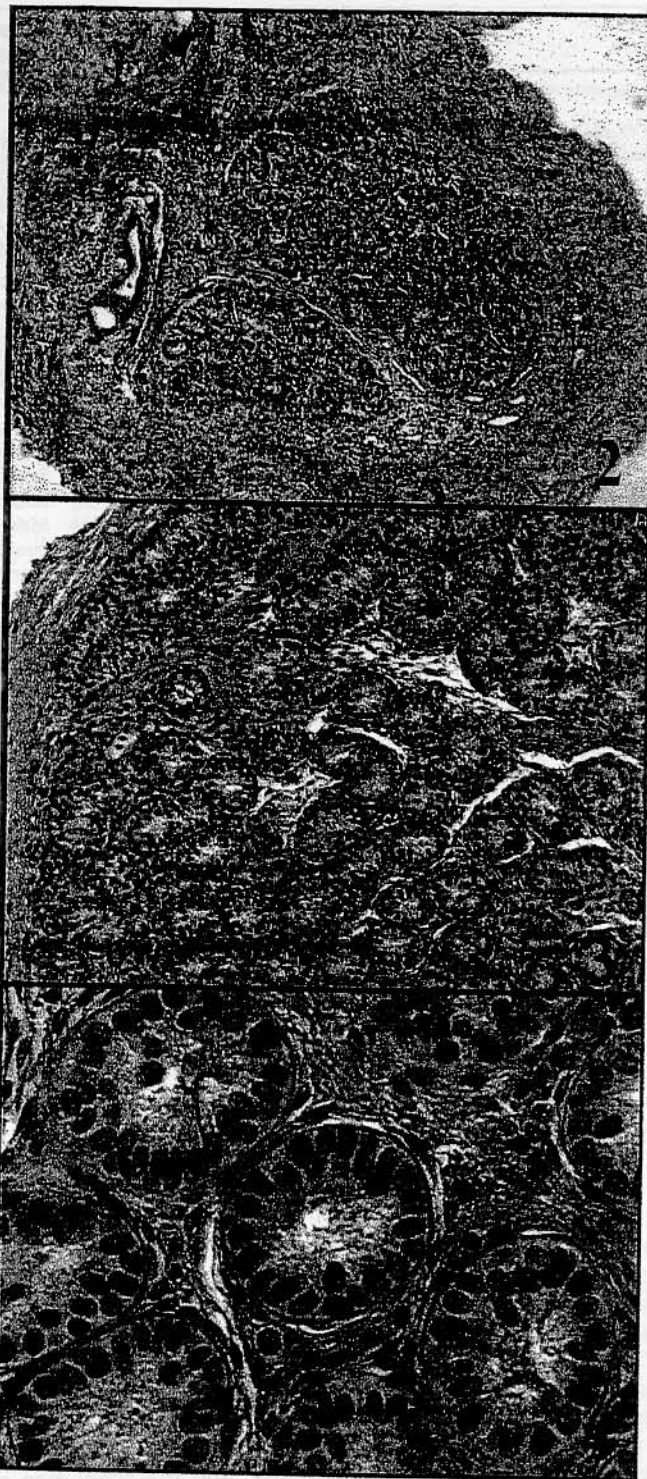


Figure 2. Tissue from patient 4. An area of left gonad (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 75$).

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

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

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

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

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

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

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

† Age at which gonadal biopsy was performed.

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

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

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

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

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

Germ cells may be counted by several methods. The most common method is calculating the TFI, which reflects the percentage of tubular profiles containing germ cells. In neonates, 68% of tubular profiles contain at least one germ cell. From birth to 3 years, this value decreases to 50%, followed by a progressive increase to 100% at puberty (Figure 1).¹³ A more complete determination of germ cell number can be obtained by calculating the total number of germ cell per testis, but this approach requires morphometric assessment of the intratubular volume and careful clinical measurement of the 3 axes of the testis.¹⁶ The TFI was altered in 11 of the 17 testes that we evaluated. Among the 6 patients with dysgenetic testes and normal TFIs, 5 had a decreased and 1 had a normal mean tubular diameter. Therefore, our data suggest that mean tubular diameter is a better indicator of testicular dysgenesis than TFI.

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

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

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

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

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

References

1. Robboy SJ, Miller T, Donahoe PK, et al. Dysgenesis of testicular and streak gonads in the syndrome of mixed gonadal dysgenesis: perspective derived from clinicopathologic analysis of twenty-one cases. *Hum Pathol.* 1982;13:700-716.
2. Troche V, Hernandez E. Neoplasia arising in dysgenetic gonads. *Obstet Gynecol Surv.* 1986;41:74-79.
3. Krasna IH, Lee ML, Smilow P, Sciorra L, Eierman L. Risk of malignancy in bilateral streak gonads: the role of the Y chromosome. *J Pediatr Surg.* 1992;27:1376-1380.
4. Rohatgi M, Gupta DK, Menon PS, Verma IC, Mathur M. Mixed gonadal dysgenesis and dysgenetic male pseudohermaphroditism—a critical analysis. *Indian J Pediatr.* 1992;59:487-500.
5. Rey RA, Belville C, Nhoul-Fékété C, et al. Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum antimüllerian hormone measurement. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:627-631.
6. Stuchi-Perez EG, Lukas-Croisier C, Castro M, et al. Evaluation of the tubular

and interstitial functions of the testis in 46,XY patients with ambiguous genitalia. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000;13:605-612.

7. Chang HJ, Clark RD, Bachman H. The phenotype of 45,X/46,XY mosaicism: an analysis of 92 prenatally diagnosed cases. *Am J Hum Genet.* 1990;46:156-167.
8. Rajfer J, Walsh PC. Mixed gonadal dysgenesis: dysgenetic male pseudohermaphroditism. In: Josso N, ed. *The Intersex Child: Pediatric and Adolescent Endocrinology.* Basel, Switzerland: S. Karger; 1981:105-115.
9. Borer JC, Nitti VW, Glassberg KI. Mixed gonadal dysgenesis and dysgenetic male pseudohermaphroditism. *J Urol.* 1995;153:1267-1273.
10. Donahoe PK, Crawford JD, Hendren WH. Mixed gonadal dysgenesis: pathogenesis and management. *J Pediatr Surg.* 1979;14:287-300.
11. Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, et al. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell.* 1991;67:437-447.
12. Carré-Eusebe D, Imbeaud S, Harbison M, New MI, Josso N, Picard JY. Variants of the anti-Müllerian hormone gene in a compound heterozygote with the persistent Müllerian duct syndrome and his family. *Hum Genet.* 1992;90:389-394.
13. Nistal M, Paniagua R. Non-neoplastic diseases of the testis. In: Bostwick DG, Eble JN, eds. *Urologic Surgical Pathology.* St Louis, Mo: Mosby; 1996:458-565.
14. Lennox B, Ahmad KN, Mack WS. A method for determining the relative total length of the tubules in the testis. *J Pathol.* 1970;102:229-238.
15. Jimenez R, Sanchez A, Burgos M, Dias de la Guardia RC. Puzzling out the genetics of mammalian sex determination. *Trends Genet.* 1996;12:164-166.
16. Müller J, Skakkebaek NF. Quantification of germ cells and seminiferous tubules by stereological examination of testicles from 50 boys who suffered from sudden death. *Int J Androl.* 1983;6:143-156.
17. Cortes D, Müller J, Skakkebaek NE. Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl.* 1987;10:589-596.
18. Nistal M, Abaurrea MA, Paniagua R. Morphological and histometric study on the human Sertoli cell from birth to the onset of puberty. *J Anat.* 1982;14:351-363.
19. Van Niekerk WA, Retief AE. The gonads of human true hermaphrodites. *Hum Genet.* 1981;58:117-122.
20. Guerra G Jr, De Mello MP, Assumpção JG, et al. True hermaphrodites in the southeastern region of Brazil: a different cytogenetic and gonadal profile. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 1998;11:519-524.
21. Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev.* 1995;16:271-321.

ANEXO 2

True Hermaphrodites in the Southeastern Region of Brazil: A Different Cytogenetic and Gonadal Profile

Gil Guerra Jr¹, Maricilda Palandi de Mello², Juliana Godoy Assumpção², André Moreno Morcillo¹, Sofia Helena Valente de Lemos Marini¹, Maria Tereza Matias Baptista¹, Roberto Benedito Paiva E. Silva², Antonia Paula Marques-de-Faria² and Andréa Trevas Maciel-Guerra²

¹Endocrinology Unit, Department of Pediatrics and ²Department of Medical Genetics
Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Sex ambiguity may be due to several disorders of gonadal differentiation, including true hermaphroditism (TH), as well as male and female pseudohermaphroditism. Although TH is a rare cause of intersex in Europe and North America, in Africa it presents one of the highest frequencies. The 46,XX karyotype has been found in the majority of the reported patients (70.6%), and aberrations in the sex chromosomes have been observed in about 22% of the cases. The 46,XY karyotype has been described as less frequent. Herein we describe ten cases of TH which have been diagnosed over the last 7 years, six lateral TH, two unilateral TH, and two cases of ovotestes with absent contralateral gonad. From a total of 18 gonads analyzed, there were 8 testes, 6 ovaries and 4 ovotestes. Nine subjects had originally a male sex assignment, and in three cases this was reverted to female. Four cases had a 46,XY karyotype. Additional sex chromosome aberrations had been found in four different cases [two 46,XX/46,XY, one 45,X/47,XYY, one 46,X,del(Yq)]. A 46,XX karyotype was found in only two individuals, and both were SRY negative. Our preliminary data, especially on the constitution of chromosomes and gonads, indicate marked differences from those in the literature.

KEY WORDS

ambiguous genitalia, intersex, ovotestis, SRY gene, true hermaphroditism

INTRODUCTION

True hermaphroditism (TH) is defined as the coexistence of ovarian (containing follicles) and testicular tissues (with distinct seminiferous tubules) in the same patient. It is usually associated with variable degrees of sexual ambiguity /1/.

Cytogenetic studies performed in these patients reveal both male and female karyotypes, and both numerical and structural aberrations of sex chromosomes. The 46,XX karyotype has been described as the most frequent (70.6%), particularly in Africa (96.9%) and among individuals of black origin (almost 100%) /2,3/. A small proportion of patients presenting 46,XX TH has been found to be positive for Y-DNA sequences including SRY /4-6/. Sex chromosome aberrations have been observed in about 22% of the cases. Reported data show the 46,XY karyotype as being less frequent in certain regions (about 7%, equally distributed among Asia, Europe and North America) /3/. Nevertheless, in Japan it represents the commonest karyotype /7/. The reason for this geographical distribution is unknown.

Ovotestis has been the gonad most commonly found in TH, followed by ovary and, less frequently, testis. TH can be classified as lateral (an ovary and a testis, 40% of the cases), unilateral (an ovary or a testis and an ovotestis, 30%) or bilateral (two ovotestes, 20%) /3,8/.

Testes and ovotestes have been frequently found on the right side, and ovaries on the left side /3,8/.

Reprint address:

Dr. Andréa Trevas Maciel-Guerra
Departamento de Genética Médica
FCM, UNICAMP
CP 6111, Campinas, SP, Brazil

According to Mittwoch /9/, this distribution reflects normal gonadal development in which testes are more advanced than ovaries in fetuses of similar crown-rump length, and right gonads tend to develop faster than those on the left side.

TH is a rare cause of intersex in Europe and North America, but in Africa it is one of the most frequent /2,3/. Only 24 cases of TH in South America have been reported in the literature during the last 17 years (1980-1997) /3,10,11/.

The aim of this paper is to report on the clinical and laboratory data, as well as the sex of rearing in nine additional cases of TH from the southeastern region of Brazil, which were followed from 1990 to 1997. We also include a case reported previously by our group /11/.

PATIENTS AND METHODS

Over the last 7 years, we have evaluated 163 referred patients with sexual ambiguity (based on the criteria established by Danish /12/) at the Intersex Service of the University Hospital of the State University of Campinas (Brazil). There were 10 cases (6.1%) of TH, all of them with a histological diagnosis of testicular and ovarian tissues, seminiferous tubules defining testicular tissue and ovarian follicles defining ovarian tissue. From those cases, we retrospectively obtained the following data:

- age
- initial and final sex assignment
- racial group
- family history of consanguinity and sex ambiguity
- length of the phallus
- site of the urethral opening
- classification of the external genitalia according to the criteria originally described by Prader /13/ for cases of congenital adrenal hyperplasia, using a scale ranging from grades I to V (from the more feminized to the more virilized)
- presence of a urogenital sinus, along with any Müllerian and Wolffian derivatives
- gonadal position, histology and occurrence of tumors
- at the first consultation, basal levels of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating

hormone (FSH) and free testosterone were measured by radioimmunoassay. Prepubertal patients were subjected to a hCG test (2000 units i.m. given daily for three days, and free testosterone was measured 24 hours after the last injection). Testosterone increment greater than 1.0 pg/ml was considered normal

- karyotype (carried out on peripheral blood lymphocytes using conventional banding techniques)
- molecular studies on Y-specific sequences (through PCR amplification and Southern blot for several Yp and Yq-specific loci: SRY, ZFY, 50f2, TSPY, DYZ3, pY6BS65, and 6 STS: 78, 81, 86, 151, 117 and 143).

RESULTS

The mean age at diagnosis was 6 years and 6 months (ranging from 2 months to 19 years and 11 months). From a total of ten patients, nine were white (or at least lacking Negroid features) and only one was black (#10). Family history of sex ambiguity was found in two instances: in case 1, paternal uncle and first cousin, and in case 6, a maternal first cousin, but unfortunately those were not available for physical or laboratory examinations. No consanguinity was registered. Male was the initial sex assignment in nine cases, and in three of them it was possible to change the sex of rearing to female. The results of endocrine evaluation are shown in Table 1. Cytogenetic analysis showed that four individuals had 46,XY karyotype, two were chimeras (46,XX/46,XY), one was mosaic (45,X/47,XYY), two were 46,XX, and one was 46,X,+mar. Both 46,XX patients were SRY negative, while the 46,X,+mar was SRY positive without mutations in the conserved HMG-box region (Table 1). A search for other Y-specific sequences showed positive amplifications for all STS tested but one which happens to be the most distal locus investigated. This result indicated that the marker is a Y chromosome lacking the distal sequences from region 6, according to the Vergnaud deletion map, near to the heterochromatin boundary.

Ambiguous genitalia were the main claim in all patients who sought medical attention (Prader III to V). The mean length of the phallus was 3.1 cm

TRUE HERMAPHRODITES

TABLE 1

Age, sex assignment, hormonal, cytogenetic and molecular findings of ten patients with TH

Case	Age	Sex assignment		LH μ IU/ml	FSH μ IU/ml	Free testosterone (pg/ml)		karyotype (SRY study)
		initial	final			basal	after hCG	
1*	6y4m	M	M	1.6	12.0	<0.1	<0.1	46,XY
2	1y7m	M	F	0.4	2.8	<0.1	0.3	46,XY
3*	10y8m	F	F	7.0	16.5	<0.1	<0.1	45,X/47,XYY
4	7y9m	M	M	0.4	5.6	<0.1	0.3	46,XX (SRY-)
5 [11]	12y1m	M	M	3.7	5.8	0.8	-	46,XX/46,XY
6	1y11m	M	F	0.5	3.7	<0.1	0.45	46,XY
7#	19y11m	M	M	7.0	4.7	6.2	-	46,XX/46,XY
8#	1y9m	M	M	0.2	1.6	<0.1	0.5	46,X,del(Yq)
9#	3y	M	F	1.5	2.6	<0.1	0.4	46,XY
10	2m	M	M	6.5	4.8	<0.1	0.5	46,XX (SRY-)

y = years; m=months; M=male; F=female; (-)not performed; *bilateral gonadectomy and #oophorectomy before the first consultation at our service

Normal values: basal LH: prepubertal: 0.6 - 1.7 and pubertal: 0.8 - 8.7

basal FSH: prepubertal: 0.6 - 3.4 and pubertal: 0.6 - 4.9

basal free testosterone: prepubertal: < 0.1 - 0.7 and adult male: 2.2 - 18.0

TABLE 2

Data on the external and internal genitalia and the Prader grade of ten patient with TH

Case	Phallus in cm (percentile/age)	Urethral opening	Urogenital sinus	Prader grade	Uterus	Tube	Vas deferens
1	4 (< 10)	PS	-	IV	R	R	L
2	2 (< 10)	PER	+	III	NL	BL	-
3	2 (< 10)	PER	+	III	L	L	-
4	3 (< 10)	PER	+	III	L	L	-
5 [11]	4 (< 10)	PS	-	IV	-	-	BL
6	3 (10)	PER	+	III	L	L	-
7	4 (< 10)	PS	-	IV	L	L	R
8	3 (10)	PS	+	IV	L	L	-
9	3 (< 10)	PER	+	III	R	R	L
10	3 (10)	PEN	-	V	-	L	BL

PS=peniscrotal; PER=perineal; PEN=penile; L=left; R=right; BL=bilateral; NL=normal

(range 2-4 cm) and all of them were at or below the 10th percentile for age, according to Schonfeld /14/. The urethral opening was perineal in five patients, peniscrotal in four, and penile in one.

A urogenital sinus, confirmed by a retrograde contrast study, was present in six patients. Examination of the internal genitalia by laparoscopy or laparotomy revealed that most of the patients had a uterus (8/10), though frequently unicornate (7/8), and all but one had a tube(s), most of them unilateral (8/9). A vas deferens was found in five patients, bilateral in two (Table 2).

Among 20 expected gonads, two were macro- and microscopically absent. There was a predominance of testis (8), followed by ovary (6), and ovotestis (4). Only one individual presented bilateral gonadoblastoma which arose from both ovary and testis. Lateral and unilateral TH was found in six and two patients, respectively. Patients 4 and 5 both presented an ovotestis on the left side and an absent gonad on the right side. All four palpable gonads inside the labiscrotal folds were testes, and all six ovaries were pelvic. Two ovotestes were pelvic, and two were palpable in the inguinal region. There were also two pelvic testes, and two were palpable in the inguinal region. Most testes (6/8) were on the right side and most ovaries on the left (4/6). All of the ovotestes were on the left side (Table 3).

DISCUSSION

For all cases of sex ambiguity, the age of the patient is crucial for the decision concerning sex assignment and for an adequate work up. Particularly in TH, there is a tendency towards the female sex of rearing, as the ovarian tissue is more functional than the testicular tissue, and most patients have Müllerian derivatives, and surgical procedures to give the external genitalia a female appearance are more successful.

Unfortunately, half of our patients were more than 3 years old at the time of their first visit to the clinic, and in the majority of cases (9/10) the patient had a male sex assignment. It was only possible to change the sex of rearing in five patients, and three of them were reassigned as females. The male sex assignment was maintained in two instances: one due to a medical decision

(#10) and the other following the decision of the parents (#8).

Among 283 TH cases described by Krob *et al.* in the literature, 91 were blacks or of black mixed origin, 85 from Africa /3/. As expected for a highly mixed population, Brazil has a great number of people of black origin. Despite the high TH frequency among black people, there was only one black child with 46,XX TH in our sample.

The external genitalia were clearly ambiguous in half of the patients, and virilized in the others (four patients with Prader grade IV and one patient with grade V). The length of the phallus was ≥ 3 cm in eight patients. This fact, in addition to the degree of virilization, accounted for the predominance of male registrations and also for its maintenance in patient #10, who had Prader grade V genitalia and a 3 cm phallus. Examination of the internal genitalia revealed that most patients had a uterus and all but one had tube(s). Vas deferens was found in five patients.

In our sample, two of the 20 expected gonads were macro- or microscopically absent. The absence of one gonad in these two patients was confirmed 3 months after surgical removal of the ovotestis due to elevation of FSH and total absence of testosterone production after β hCG stimulation. The absence of Müllerian derivatives on the same side in both cases, and the presence of vas deferens in patient 5, can indicate that there was testicular tissue in these gonads in the early embryonic period with subsequent regression. Among the other 18 gonads, there was a predominance of testes, followed by ovaries, and ovotestes. As expected, the hormonal study of eight patients whose gonads had not been previously removed revealed that the testicular tissue did not function normally.

It is difficult to rule out the existence of an ovotestis when the gonad is accessed by biopsy; however, this bias is unavoidable since gonadectomy is not always necessary, particularly when the gonads are palpable. The position of the ovotestis depends on the amount of testicular tissue present: the more the testicular tissue, the greater the probability that the gonad will descend to the labiscrotal folds and the greater the possibility of misdiagnosis of ovarian tissue /3/.

TABLE 3

Gonadal position, histology and occurrence of tumors in ten patients with TH

Case	Gonadal position		Gonadal histology				Tumor
	Right	Left	Testis	Ovary	Ovotestis	Absent	
1	P	I	L	R	-	-	+ ¹
2	P	P	R	L	-	-	-
3	P	P	R	-	L	-	-
4	-	P	-	-	L	R	-
5 [11]	-	I	-	-	L	R	-
6	LS	P	R	L	-	-	-
7	LS	P	R	L	-	-	-
8	LS	P	R	L	-	-	-
9	P	LS	L	R	-	-	-
10	I	I	R	-	L	-	-

P=pelvic; I=inguinal; LS=labiscrotal; L=left; R=right; +¹ bilateral gonadoblastoma

As expected, most testes were on the right side and most ovaries on the left. In the sample as a whole the predominance of the testes was accompanied by a reduction in the frequency of ovotestes, which also tended to be more "feminized" (all on the left side and none in the labiscrotal fold).

According to Niekerk and Retief /8/ and Krob *et al.* /3/, the frequency of gonadal tumors in individuals with TH ranges from 2.6 to 4.6% and there seems to be no relationship between gonadal tumor development and the type of gonads or the karyotype. In our sample, there was a single case with bilateral gonadoblastoma which had arisen from both ovary and testis in a 46,XY boy who was less than 7 years old.

Eight of our patients had a Y chromosome. The presence of this chromosome is usually associated with the occurrence of testes and lateral TH /3,8/. Indeed, this was the case in our sample. Therefore, it appears that a 46,XX chromosomal constitution in TH increases the probability of the occurrence of both tissues in the same gonad, while a 46,XY composition tends to prevent such a structural organization.

It is not yet possible to establish whether this singular chromosomal constitution in our TH patients reflects the specific situation in Brazil or in South America as a whole. We are aware of the data on 16 TH patients from the University of São Paulo (Pediatrics Institute); eight of them had a 46,XX karyotype, and only one had a 46,XY karyotype /10/. These apparently contrasting results might be due to a higher incidence of black patients (9/16) in that sample.

The unexpected cytogenetic and gonadal findings observed in our sample are even more striking because of the difficulty normally associated with the diagnosis of 46,XY TH. Palpable gonad(s) in 46,XX subjects with sexual ambiguity indicate TH, or, in rare instances, 46,XX male, therefore a histopathological study is mandatory. Those 46,XX individuals without palpable gonads who do not have congenital adrenal hyperplasia also require more intensive investigation. The gonads of patients with sex chromosome aberrations are usually evaluated histologically. However, a 46,XY TH can be misdiagnosed as a male pseudohermaphrodite in bilateral and unilateral (ovotestis +

testis) forms even nowadays, because there are no definite clinical, endocrinological or molecular markers for this disease.

Thus, our data are different from those in the literature, and further study will be necessary to confirm them. The etiology of most TH remains a puzzling matter to all who study anomalies of sex differentiation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Izilda A. Cardinalli who performed the histological studies, and Irene K. Barcellos who performed the genitographies. We are also grateful to the Main Clinical Laboratory of the University Hospital where the hormonal levels were determined and to the pediatric surgical staff for the biopsies, laparoscopies and laparotomies, as well as the nurses and social workers who contributed to this study. We are indebted to the Cytogenetics Laboratory of the Department of Medical Genetics (UNICAMP) for karyotyping.

REFERENCES

1. Conte FA, Grumbach MM. Disorders of sex differentiation. In: Wilson JD, Foster DW, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1992; 853-951.
2. Aaronson IA. True hermaphroditism. A review of 41 cases with observations on testicular histology and function. *Br J Urol* 1985; 57: 775-779.
3. Krob G, Braun A, Kuhnle U. True hermaphroditism: geographical distribution, clinical findings, chromosomes and gonadal histology. *Eur J Pediatr* 1994; 153: 2-10.
4. Berkovitz GD, Fechner PY, Marcantonio SM, Bland G, Stetten G, Goodfellow PN, Smith KD, Migeon CJ. The role of sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in the etiology of 46,XX true hermaphroditism. *Hum Genet* 1992; 88: 411-416.
5. Nakagome Y, Seki S, Fukutani K, Nagafuchi S, Nakahori Y, Tamura T. PCR detection of distal Yp sequences in an XX true hermaphrodite. *Am J Med Genet* 1991; 41: 112-114.
6. Pereira ET, Almeida JC, Gunha AC, Patton M, Taylor R, Jeffery S. Use of probes for ZFY, SRY, and the Y pseudoautosomal boundary in XX males, XX true hermaphrodites, and an XY female. *J Med Genet* 1991; 28: 591-595.
7. Fukuda M, Kohdaira T, Sakuramoto T, Oshima H, Yamada K. 46,XX true hermaphroditism: a case report with a review of 37 cases reported in Japan. *Hinyokika Kiyo* 1985; 29: 451-457.
8. van Niekerk WA, Retief AE. The gonads of human true hermaphrodites. *Hum Genet* 1981; 58: 117-122.
9. Mittwoch U. Males, females and hermaphrodites. *Ann Hum Genet* 1985; 50: 103-121.
10. Damiani D, Fellous, M, McElreavey K, Barbaux, S, Barreto ESA, Dichtchekian V, Setian N. True hermaphroditism: clinical and molecular studies in 16 cases. *Eur J Endocrinol* 1997; 136: 201-204.
11. Maciel-Guerra AT, Lopes VLGS, Cardinalli IA, Viguetti NL, Marques-de-Faria AP, Baptista MTM, Guerra G Jr. Coexistence of ovotestis and testicular regression in a boy with 46,XX/46,XY chimerism and sex ambiguity. *Braz J Genet* 1996; 19: 165-168.
12. Danish RK. Intersex problems in the neonate. *Indian J Pediatr* 1982; 49: 555-575.
13. Prader A. Der Genitalbefund beim pseudohermaphroditismus femininus des kongenitalen adrenogenitalen Syndrome. *Helv Paediatr Acta* 1954; 9: 231-248.
14. Schonfeld WA. Primary and secondary characteristics, with biometric study of penis and testes *Am J Dis Child* 1943; 65: 535-549.