

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/39538
IB/81455

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO GENE DA 5 α -
REDUTASE TIPO 2 (SRD5A2) EM PACIENTES COM
PSEUDOHERMAFRODITISMO MASCULINO (PHM)**

LÚCIO FÁBIO CALDAS FERRAZ

Orientadora : Profa. Dra. Christine Hackel

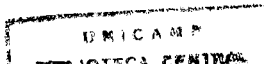
**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas (UNICAMP) para a obtenção
do grau de Mestre em Genética e Biologia
Molecular, área de concentração :
Genética Humana e Médica.**

este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) <i>Lúcio Fábio Caldas Ferraz</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

[Signature]

23/9/99

**CAMPINAS/SP
1999**



UNIDADE	I B
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	F413i
V.	Ex.
TOMBO 50/	39538
PROC.	225199
C	☐ 0 ☒
2002	061100
24-11-99	
CPD	

CM-00137144-2

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA-UNICAMP**

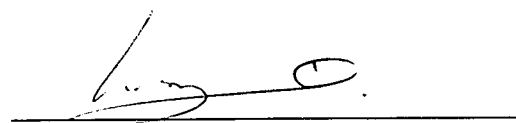
- F413i Ferraz, Lúcio Fábio Caldas**
Investigação molecular do gene da 5 α -redutase tipo 2 (SRD5A2) em pacientes com pseudo-hermafroditismo masculino (PHM)/Lúcio Fábio Caldas Ferraz.-- Campinas, SP: [s.n.], 1999.
140f: ilus.
- Orientadora: Christine Hackel
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
1. Genética molecular. 2. Andrógenos. I. Hackel, Christine.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

LOCAL E DATA : Campinas, 23 de setembro de 1999.

BANCA EXAMINADORA :

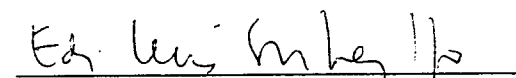
TITULARES :

Profa. Dra. Christine Hackel (orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato



Assinatura

Prof. Dr. Durval Damiani



Assinatura

SUPLENTE :

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo



Assinatura

APROVADA

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Fábio e Antônia Lais,
e irmãos, Fabrício, Júnior e Jéssica,
- fonte de inspiração e conforto,
exemplo de dignidade e amor -
dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus Pai, razão de toda a existência; a Deus Filho, redentor e exemplo de amor ao próximo, e a Deus Espírito Santo, santificador e fonte inspiradora;

Aos meus pais, Fábio e Antônio Lais, e irmãos, Fabrício, Fábio Jr e Jéssica, pelo imensurável apoio, dedicação e amor;

A todos os meus parentes e amigos;

À minha Paulinha, por ter surgido em minha vida, pelo carinho e alegrias que me tem proporcionado;

À Josi, querida amiga, que comigo compartilhou angústias e alegrias no início desta tese;

À Profa. Dra. Christine Hackel, por ter me acolhido como aluno e confiado no meu trabalho, pelos incentivos nos momentos de desânimo, pela dedicação aos alunos, mas sobretudo pela amizade e carinho;

À Profa. Dra. Carmen Bertuzzo, pelo apoio no início de minha formação científica;

À Profa. Dra. Antônio Paula Marques de Faria, por aceitar integrar a pré-banca e a banca de examinadores e pela correção criteriosa;

Ao Prof. Dr. Durval Damiani, por aceitar integrar a pré-banca e a banca de examinadores, enriquecendo as discussões;

À Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato, por ter aceito participar da pré-banca e banca examinadora, mas sobretudo pela amizade e pelo apoio entusiástico na realização dos experimentos;

À Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello, pela amizade e contribuições sugeridas a este trabalho;

À Profa. Dra. Joyce Andersson Duffles de Andrade, ao Prof. Dr. Antônio Sérgio Ramalho e à Profa. Dra. Silvana Bordin, membros da banca examinadora do exame de qualificação, pelas relevantes sugestões oferecidas à realização deste trabalho;

A toda equipe do Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação Sexual do HC-Unicamp, especialmente à Dra. Andréia Trevas Maciel Guerra e ao Prof. Dr. Gil Guerra Jr, por terem auxiliado na triagem dos pacientes avaliados neste trabalho e pelas sugestões oferecidas ao trabalho;

A todos aqueles que fizeram parte da turma da BIO 92, em especial ao Paulo Henrique, Sônia, Hermes, Patrícia, Rogério, Ivy, Henrique, Rodriguinho e, sobretudo, à Maria, esta inseparável amiga e conselheira;

Aos amigos do DGM/Unicamp : Érica, Gisele, Toninho, Juliana, Tereza, Henry, Heliane, Jô e Sônia, pela agradável receptividade no início de minha formação científica;

Aos amigos do grupo de oração Charoline Nilda, Eduardo, Ruth, Alysson, Cléo, Fabinho, Angelita, Kairo, Silvia, Flávia, Andres, Cristiane, Gustavo, Maria Elena, Célio, Valéria, Juan, Pe Toninho, Pe Waltinho e todos os noviços da Casa dos Jesuítas de Campinas, pelos momentos de paz de espírito e reflexão em Deus;

Aos professores e funcionários do CBMEG, em especial à Ritinha, ao Seu Chico, à Heloísa, ao Duarte, à Zildinha, e ao Márcio;

A todos os amigos CBMEGuianos : Sandrinha, Ed, Eneida, Fabinho, Angela, Sibov, Marlene, Lucianinha, Susy, Taíla, Sílvia, Brígida, Celso, Lee, Karen, ...

Aos esportistas do CBMEG : Mano, Ivan, Edson, André, Felipe, de Lucca, Marco Antônio, Márcio, Eduardo, Dilermando e Marcelo, pelos raros momentos de descontração e lazer proporcionados;

Às secretárias Sandra, Tânia, Fabiana, Tereza, Lia, Zaira e Claudinha e ao secretário Carlos, pela alegria com a qual trabalham e pelos trabalhos burocráticos que nos poupam;

À Sandra, Carlos, Paromita, Hamilton, Eduardo, e Manuela que outrora fizeram parte do Laboratório de Genética Humana e agora enveredam por outros caminhos. Em especial à Manuela, por ter me acompanhado na realização deste trabalho;

À grande família do Laboratório de Genética Humana : Daniela, Adelmo, Eliana, Welbe, Camila, Dilermando, Junia, Fred, Isabel, Ivy, Rita, Fernanda, Marcela, Fernanda, Fefama, Marcelo, Sandra, Alexandre, pelo convívio divertido e harmonioso neste últimos anos;

À Mada, nossa quituteira predileta, pelo carinho e amizade, pelo ombro amigo nas horas difíceis, pelos auxílios prestados no laboratório e também pelos momentos de alegria;

Aos amigos Marcelo e Fernanda, pelas horas perdidas em bate-papos descontraídos, pela grande amizade;

Aos irmãos da casa “Siri na Toca e Aranhinha no Buraco” Lucy, Ed, Juliana, Alberto, Stela e Juliano, pelo companheirismo e pela convivência alegre;

Aos pacientes, por colaborarem na realização deste trabalho ao permitirem a análise da doença que os aflige;

À CAPES e FAEP-Unicamp, pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

*No mundo de beleza projetada
Em que os dias vamos passando, pouco
Se nos vem do que temos e sentimos
- No vendaval das lutas que travamos.*

*Quanta luz e afeição suplicativas
Nos se ofertam sedentas de servir ...
Quanto bem – sim – existe no universo
E sob ele as intrigas nossas.*

*Digladiantes seres peregrinos
Seguimos – como cegos que não vêem
E, como surdos que não ouvem algures –.*

*Há gente, muita gente, até de mais
Neste planeta de contrastes tantos
E o homem é, apesar disto, um só.*

Fábio Ferraz

(“O Homem Só”, pág. 41 do livro “Quixabeiras e Quipás”)

***“Homem! por mais que a Idéia desintegres,
Nessas perseguições que não têm pausa,
Jamais, magro homem, saberás a causa
De todos os fenômenos alegres!”***

Augusto dos Anjos

(“As Cismas do Destino”, do livro “Eu e outras poesias”)

*Minha Paulinha,
Como o fogo que tudo consome,
E a vida que tanto expressa beleza...
Assim canto esse amor,
Que arde meu coração
E alegra a minha vida.*

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
I - INTRODUÇÃO.....	1
1 - Diferenciação Sexual Humana.....	1
1.1 - Diferenciação Sexual Masculina.....	3
1.2 - Diferenciação Sexual Feminina.....	8
1.3 - Diferenciação Sexual do Cérebro.....	10
2 - Hormônio DHT e as Enzimas 5α-redutases.....	13
2.1 - Hormônio DHT.....	13
2.2 - Enzimas 5 α -redutases.....	16
2.3 - Isoenzimas.....	18
- <i>Genes SRD5A1 e SRD5A2</i>	18
- <i>Padrão de Expressão</i>	20
- <i>Propriedades Bioquímicas e Farmacológicas</i>	23
- <i>Funções Fisiológicas das 5α-redutases</i>	24
3 - PHM por Deficiência em 5α-redutase Tipo 2.....	27
3.1 - Deficiência em 5 α -redutase Tipo 2.....	28
- <i>Definição</i>	28
- <i>Virilização na puberdade</i>	28
- <i>Diagnósticos clínico/laboratorial e molecular</i>	30
- <i>Mutações no gene SRD5A2</i>	32
✕ - <i>Mulheres homozigotas para o gene SRD5A2 mutante</i>	34
II - OBJETIVOS.....	37
III - CASUÍSTICA.....	39
IV - MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
1 - Extração do DNA Genômico.....	43
2 - Reação em Cadeia da Polimerase.....	45
3 - Análise dos Polimorfismos de Conformação das Fitas Simples de DNA.....	47
- <i>Preparo e eletroforese das amostras</i>	48
- <i>Coloração por impregnação pelo nitrato de prata</i>	49

4 - Clonagem molecular.....	51
- <i>Preparação do inserto</i>	51
- <i>Ligação do inserto ao plasmídio</i>	52
- <i>Transformação de células competentes</i>	53
- <i>Purificação do plasmídio a partir de bactérias transformadas</i>	54
5 - Sequenciamento.....	55
- <i>Marcação radioativa dos “primers” com [γ-^{32}P]-dATP</i>	56
- <i>Reação de sequenciamento</i>	57
- <i>Gel de sequenciamento</i>	57
- <i>Reação de sequenciamento com [α-^{33}P]-ddNTPs</i>	58
- <i>Gel de sequenciamento</i>	59
6 - Análise por Digestão com Enzimas de Restrição.....	60
V - RESULTADOS	61
1 - Mutações Detectadas	61
1.1 - Reação em Cadeia da Polimerase.....	61
1.2 - Análise por SSCP e Sequenciamento.....	61
2 - Análise do Polimorfismo Valina/Leucina no Gene <i>SRD5A2</i>	69
VI - DISCUSSÃO	71
1 - Mutações no Gene <i>SRD5A2</i>	71
1.1 - Mutações Descritas.....	71
1.2 - Mutações Detectadas.....	75
- <i>Mutação Gly196Ser</i>	75
- <i>Mutações Gln126Ser e 418del T</i>	76
- <i>Mutação Gly183Ser</i>	78
- <i>Mutação Ala49Tre</i>	79
- <i>Mutação Arg246Trp</i>	80
1.3 - Polimorfismos no Gene <i>SRD5A2</i>	82
1.4 - Pacientes com Etiologia não Definida.....	85
2 - Relevância do Diagnóstico Molecular	86
2.1 - Diagnóstico Precoces.....	86
2.2 - Diagnóstico Clínico/Hormonal.....	87
2.3 - Diagnóstico Molecular.....	90
VII - CONCLUSÕES	95
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
XI - ANEXOS	115
1 - Protocolo de Avaliação Clínica e Hormonal	115
2 - Classificação da Genitália Externa de acordo com Prader	118
3 - Parecer da Comissão de Ética	119
4 - Artigo Publicado	123
5 - Artigo Aceito Para Publicação	127

ABREVIATURAS

μg - micrograma
 $\beta\text{-gal}$ - enzima β -galactosidase
 μl - microlitro
 μM - micromolar
 pmol - picomol
ATP - Trifosfato de Adenosina
cDNA - DNA complementar
CSGE - do inglês Conformation Sensitive Gel Electrophoresis
D2S352 - marcador molecular do gene *SRD5A2*
DAX1 - do inglês DSS, hipoplasia congênita da Adrenal, ligado ao X
ddNTPs - didesoxinucleotídeos
DGGE - do inglês Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DH5 α - linhagem de bactérias
DHP - 5 α -di-hidroprogesterona
DHT - 5 α -di-hidrotestosterona
DMRT1 e 2 - do inglês Doublesex and MAB-3 Related Transcription factor 1 e 2
DMSO - Dimetil Sulfoxido
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs - Desoxinucleotídeos
DSS - do inglês Dosage Sensitive Sex reversal
DTT - Ditioneitol
EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético
FCM/Unicamp - Faculdade de Ciências Médicas/ Universidade Estadual de Campinas.
FSH - Hormônio Folículo Estimulante
GH - Hormônio do Crescimento
GIEDDS - Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo
HAM - Hormônio Anti-mülleriano
hCG - Gonadotrofina Coriônica
HMG - do inglês High Mobility Group
IL - Interleucinas
Kda - Quilo Daltons
Km - constante de *Michaelis*
LB - meio de cultura Luria-Bertani
LH - Hormônio Luteinizante
M - Molar
mA - mili Amperagem
mg - Miligramas
ml - Mililitros
mM - ~~Micro~~molar *mili mola*
N - Normalidade
NADPH - forma reduzida da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
ng - Nanograma
nm - Nanomolar

ONS - enzima Óxido Nítrico Sintetase
°C - graus Celsius
P - Progesterona
pb - pares de bases
PCR - do inglês Polimerase Chain Reaction
PHM - Pseudo-hermafroditismo Masculino
PVC - Cloreto de Polivinila
q.s.p - Quantidade Suficiente Para
RNA - Ácido Ribonucléico
rpm - Rotações Por Minuto
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
SF1 - do inglês Steroidogenic Factor 1
SNC - Sistema Nervoso Central
snRNPs - do inglês Small Ribonucleoprotein
SOX - do inglês SRY-box homologous genes
SOX9 - gene da família do SOX
SRD - do inglês Steroid Reductase Deficiency
SRD5A1 e 2 - genes que codificam as isoenzimas tipo 1 e tipo 2 das 5 α -redutases
SRD5API - pseudogene dos genes que codificam as 5 α -redutases
SRY - do inglês Sex determining Region, Y gene
SSCP - do inglês Single Strand Conformation Polymorphism
T - Testosterona
TA - Temperatura Ambiente
TBE - Tris-Borato-EDTA
TDF - do inglês Testis Determining Factor
TE - Tris EDTA
TEMED - N,N,N',N' - Tetrametiletilenodiamina
Tris - Tris (hidroximetil) - Aminometano
U - Unidades
V - Voltagem
W - Watt
WT1 - do inglês Wilms Tumor supressor 1
X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β ,D-galactosidase

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.** Reação enzimática de conversão do hormônio T em DHT – **página 17.**
- Figura 2.** Mutações no gene *SRD5A2* – **página 33.**
- Figura 3.** Exons do gene *SRD5A2* – **página 46.**
- Figura 4.** Anelamento dos “*primers*” para amplificação dos exons A₁ e A₂ – **página 47.**
- Figura 5.** Exons A a E do gene *SRD5A2* amplificados na reação PCR – **página 61.**
- Figura 6.** Mutação Gly196Ser em homozigose no paciente nº 1 – **página 62.**
- Figura 7.** Genealogia, análise SSCP e digestão com *Dde* I na família do paciente nº 1 – **página 63.**
- Figura 8.** Mutação Gln126Arg e 418delT no paciente 2. – **página 64.**
- Figura 9.** Mutação Ala49Trp em heterozigose no paciente 4 – **página 65.**
- Figura 10.** Falsos-positivos detectados neste trabalho na análise por SSCP – **página 66.**
- Figura 11.** Mutação Gly183Ser em homozigose no paciente 3 – **página 67.**
- Figura 12.** Mutação Arg246Trp em homozigose no paciente 9 – **página 67.**
- Figura 13.** Mutação Gly196Ser em heterozigose e transição T→C no intron 1 do paciente nº 5 – **página 68.**
- Figura 14.** SSCP do exon A_{total} e esquema da digestão do exon A₂ com *Rsa* I – **página 70.**
- Figura 15.** Mutações detectadas neste trabalho – **página 75.**
- Figure 16.** Deleção 418delT no paciente nº 2 – **página 78.**
- Tabela I.** Achados clínico e laboratorial da deficiência em 5 α -redutase tipo 2 – **página 30.**
- Tabela II.** Dados clínicos/laboratoriais dos 30 pacientes analisados neste trabalho – **página 40.**
- Tabela III.** *Primers* utilizados para a amplificação dos exons A a E do gene *SRD5A2* – **página 45.**
- Tabela IV.** Tempos, temperaturas e números de ciclos nas reações de PCR para cada um dos *primers* – **página 46.**
- Tabela V.** Condições ideais da corrida eletroforética no SSCP – **página 50.**
- Tabela VI.** Coloração do gel pelo nitrato de prata. – **página 50.**
- Tabela VII.** Digestões por enzimas de restrição. – **página 60.**
- Tabela VIII.** Pacientes, com evidência clínica e laboratorial de deficiência em 5 α -redutase, que tiveram todo o gene *SRD5A2* sequenciados – **página 66.**
- Tabela IX.** Mutações e polimorfismos no gene *SRD5A2* em alguns pacientes. – **página 69.**

RESUMO

O pseudohermafroditismo masculino (PHM) por deficiência em 5 α -redutase é uma doença com padrão de herança autossômico recessivo. A enzima 5 α -redutase catalisa a conversão de testosterona (T) para 5 α -di-hidrotestosterona (DHT), numa reação que tem o NADPH como cofator. A deficiência em 5 α -redutase tipo 2 conduz ao PHM uma vez que é nula ou defeituosa a conversão de T para DHT nos tecidos genitais. A DHT é o andrógeno essencial para a diferenciação masculina da genitália externa e para a virilização e estabelecimento dos caracteres sexuais secundários durante a puberdade como o desenvolvimento de pêlos na face e no corpo, crescimento genital e aquisição de comportamento masculino. Outros efeitos do DHT são observados no padrão de calvície do homem, no hirsutismo, no câncer de próstata, no desenvolvimento de acne, na regulação do sistema imune e nos mecanismos de ereção peniana.

Duas isoenzimas da 5 α -redutase, cronologicamente identificadas como tipo 1 e tipo 2, foram isoladas. A isoenzima tipo 1, codificada pelo gene *SRD5A1*, é uma proteína hidrofóbica de 259 aminoácidos que tem uma baixa afinidade por substratos esteróides, uma atividade ótima em pH básico e é altamente expressa em tecidos não-genitais. A isoenzima 2, codificada pelo gene *SRD5A2*, é uma proteína hidrofóbica com 254 aminoácidos que tem uma alta afinidade por substratos esteróides, uma atividade ótima em pH ácido e é altamente expressa em tecidos genitais.

Estudos genéticos indicaram que o gene *SRD5A2*, mapeado em 2p23, era o *locus* específico para o PHM por deficiência em 5 α -redutase. Até o momento, mais de 30 mutações nesse gene foram identificadas em pacientes com deficiência em 5 α -redutase. A maioria dos afetados são criados como meninas, mas sofrem processo de virilização na puberdade, caracterizado freqüentemente por mudança da identidade psicossocial com aquisição de orientação sexual masculina, além de descida dos testículos, espessamento da voz, desenvolvimento muscular e aumento do tamanho do falo.

Os objetivos do presente estudo foram introduzir uma metodologia para a detecção de alterações moleculares no gene *SRD5A2* e contribuir para o diagnóstico etiológico de pacientes com PHM. A metodologia proposta baseou-se na amplificação dos 5 exons do gene pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e rastreamento de mutações pela técnica do SSCP (single strand conformation polymorphism). A identificação de mutações nos exons foi realizada por meio do sequenciamento direto ou após clonagem molecular dos fragmentos no vetor pMOSBlue.

Neste estudo foram analisados 30 indivíduos com graus variados de ambigüidade genital. A análise por SSCP permitiu a detecção de 4 mutações em três pacientes : (1) uma transição G→A em homozigose no exon D do paciente nº 1, levando à substituição G196S; (2) as mutações 418delT (deleção do nucleotídeo timina na posição 418) e a transição A→G conduzindo à substituição Q126R em configuração *trans* no exon B do paciente nº 2, e (3) a transição G→A em heterozigose no exon A do paciente nº 4, causando a substituição do aminoácido A49T.

Como a técnica SSCP tem sensibilidade em torno de 70 a 90%, o seqüenciamento direto de todos os exons do gene foi realizado em 4 pacientes, com achados clínicos e hormonais sugestivos de deficiência em 5 α -redutase, que exibiram resultados negativos no SSCP. Desta forma foi detectada a substituição G183S como resultado da mutação G→A em homozigose no exon C do paciente nº 3. Com relação aos outros 3 pacientes, a não detecção de alterações moleculares pode ser atribuída a mutações localizadas em fragmentos do gene não amplificados na PCR, embora outras causas de PHM não tenham sido excluídas.

Dois pacientes tiveram todos os exons seqüenciados antes de qualquer análise prévia por SSCP em virtude da presença de sinais clínicos característicos da deficiência em 5 α -redutase 2. Duas mutações e um polimorfismo foram detectados : uma transição C→T em homozigose no exon E do paciente nº 9, conduzindo à substituição R246W e a substituição G196S em heterozigose no paciente nº 27, que também exibia o polimorfismo T→C em homozigose no 15º nucleotídeo do intron 1.

Nenhuma mutação foi detectada entre os demais pacientes com hipospadia e(ou) outras anomalias genitais pela técnica de PCR-SSCP. Da mesma forma nenhuma mutação foi identificada nas duas irmandades com hipospadia isolada analisada neste estudo. Esses resultados sugerem que mutações no gene *SRD5A2* seriam extremamente raras nos pacientes avaliados neste trabalho que apresentavam hipospadia, tendo ou não recorrência familiar. Entretanto, essa suposição deve ser confirmada após o seqüenciamento de todos os exons do gene *SRD5A2* nesses pacientes.

Apesar das mutações detectadas na análise por SSCP neste estudo, é questionável a aplicação desta triagem inicial de mutações no gene *SRD5A2*. A presença de polimorfismos no exon A dificultou a interpretação dos resultados no método de SSCP. Além disso, alguns falso-negativos foram observados e isto dificultou a análise desses resultados. O tamanho relativamente pequeno do gene *SRD5A2* e as grandes facilidades oferecidas pelo seqüenciamento automático favorecem a análise direta de todos os exons do gene *SRD5A2*.

SUMMARY

Male pseudohermaphroditism due to steroid 5 α -reductase deficiency is an autosomal recessive disorder. The enzyme steroid 5 α -reductase, a NADPH dependent protein, catalyses the conversion of testosterone (T) to dihydrotestosterone (DHT). The steroid 5 α -reductase type 2 deficiency leads to male pseudohermaphroditism due to impairment of the conversion of T to DHT in genital tissues. This androgen is essential for normal development of external genitalia in the male fetus and also mediates most events of male puberty, including maturation of facial and body hair, genital growth and acquisition of male behavior. Other DHT specific effects are observed in male baldness pattern, hirsutism, prostate cancer, development of acne, immune system regulation and on penile erection mechanisms.

Two isozymes of steroid 5 α -reductase, chronologically identified as type 1 and type 2, were isolated. The type 1 isoenzyme, coded by the *SRD5A1* gene, is a hydrophobic protein of 259 amino acids with low affinity for steroid substrates, an optimum activity in basic pH and is expressed at high levels in non-genital tissues. The type 2 isoenzyme, coded by the *SRD5A2* gene, is a hydrophobic protein of 254 aminoacids with higher affinity for steroid substrates, an optimum activity in acid pH and is expressed at high levels in androgen target tissues.

Genetic studies showed that the *SRD5A2* gene, mapped in 2p23, was the specific *locus* for steroid 5 α -reductase 2 deficiency. To date, over 30 different mutations in *SRD5A2* gene have been identified in patients with 5 α -reductase deficiency. The affected individuals are often raised as girls, but at puberty a change to male gender is frequently observed, together with virilization and descent of the testes, deepening of voice, muscular development and increase in phallic size.

The aims of the present study were to introduce a methodology for the detection of molecular defects in the *SRD5A2* gene and contribute to the etiologic diagnosis of patients with male pseudohermaphroditism. The methodology was based on the screening for mutations in the *SRD5A2* gene by PCR-SSCP analysis. The five exons of the gene were amplified by the polymerase chain reaction (PCR), and mutations were screened using single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. The putative mutant segments were sequenced to identify the altered bases, either directly or after cloning into the vector pMOSBlue.

We report here a study of 30 subjects with different degrees of genital ambiguity. SSCP analysis allowed the detection of four mutations in three patients: (1) a homozygous G $\rightarrow$ A transition in exon D leading to a G196S substitution in patient n^o 1; (2) two mutations in *trans*

configuration on exon B in patient n° 2 : one mutation represented by a novel single deletion at nucleotide 418 (418delT) causing a frameshift mutation at codon 140 and the other mutation represented by an A→G transition leading to a Q126R substitution, and (3) an G→A transition in exon A causing the amino acid change A49T in heterozygous condition in patient n° 4.

Since the non-isotopic SSCP technique has a sensitivity of 70-90%, direct DNA sequencing of all exons of the gene was performed in four cases with clinical and hormonal findings suggestive of 5 α -reductase deficiency, in spite of SSCP negatives results. Therefore, one mutation was identified in patient n° 3 : a homozygous G→A transition in exon C resulting in the G183S substitution. Concerning the other three patients, where the diagnosis of 5 α -reductase deficiency was considered, the molecular negative findings may be attributed to mutations which map outside the amplified fragments of the gene, although other causes of male pseudohermaphroditism can not be excluded.

In two additional cases, all exons were sequenced without previous SSCP analysis, since those patients exhibited clinical features suggestive of 5 α -reductase deficiency. Two mutations and one polymorphism were detected : a homozygous C→T transition in exon E leading to R246W substitution in patient n° 9 and a G196S substitution in heterozygous condition in patient n° 27, that also exhibited a polymorphism represented by a homozygous T→C transition at the 15^o nucleotide on the first intron of the gene.

No mutations in *SRD5A2* gene were detected among patients with hypospadias and/or other genital anomalies by the PCR-SSCP techniques. Similarly, no mutations were identified in the two siblings with isolated hypospadias analyzed in this study. Therefore, such results suggest that mutations in *SRD5A2* gene would be extremely rare in the patients with hypospadias, with or without familial recurrence. Nevertheless, this hypothesis must be confirmed through direct sequencing of the *SRD5A2* gene.

In spite of the mutations detected in this study by SSCP analysis, its application as a screening method for the *SRD5A2* gene is questionable. The presence of polymorphisms in exon A may difficult the interpretation of the results of SSCP. Furthermore, some false-negatives shifts were observed, and thus presenting a doubtful results in the SSCP. The small size of gene and the high performance provided by automated sequencing equipment favor the direct analysis of all exons of the *SRD5A2* gene.

I - INTRODUÇÃO

1 - Diferenciação Sexual Humana

O primeiro evento detectável na diferenciação sexual humana ocorre no momento da fertilização com o estabelecimento do sexo cromossômico do zigoto. A determinação cromossômica ocorre quando da fertilização de um óvulo por um espermatozóide contendo um cromossomo X ou um Y. Zigotos com o sexo heterogamético (XY) tendem a gonadogênese masculina e aqueles com o sexo homogamético (XX) tendem a gonadogênese feminina, salvo em algumas situações decorrentes de aberrações estruturais desses cromossomos. Os eventos subsequentes (formação do sexo gonadal e expressão fenotípica do sexo) dependem daquele primeiro evento. Ou seja, de acordo com o sexo genético do embrião tem-se a formação da gônada indiferenciada em testículo ou ovário (processo denominado determinação sexual) e a diferenciação masculina ou feminina dos dutos genitais internos e dos genitais externos (Beiguelman, 1982).

Até aproximadamente o 42º dia de gestação não há distinção quanto a um embrião humano com predestinação ao sexo masculino ou ao sexo feminino. Nesse estágio da embriogênese é distinguível uma gônada indiferenciada ou bipotencial, o que significa dizer que neste estado sexualmente neutro a gonadogênese pode rumar tanto para uma gônada masculina quanto feminina. Ainda neste estágio distinguem-se, até então em um estado primordial (ou não diferenciado), os condutos genitais internos, representados pelos dutos de Wolff e os dutos de Müller, e a genitália externa, composta por um tubérculo genital, saliências labioescrotais e duas pregas genitais ladeando o seio urogenital (Beiguelman, 1982; Moore, 1978).

Por volta da 4ª a 5ª semana após a fertilização tem início a formação da gônada bipotencial (ou primordial) a partir do mesoderma na região ventral mediana do embrião. Nesta, distinguem-se os cordões sexuais primitivos distribuídos numa região cortical e em outra medular, e que cercam as células germinativas primordiais. A propósito, as células germinativas não participam do processo de determinação sexual. A formação gonadal acontece mesmo na ausência destas porque a indução da formação parte de células somáticas da gônada em desenvolvimento, para onde migram as células germinativas. Aos genes *WT1* (do inglês Wilms tumor suppressor locus, localizado em 11p13) e *SF1* (do inglês Steroidogenic factor 1, localizado em 9q33) atribui-se o processo de formação da gônada bipotencial. Os achados de degeneração gonadal em camundongos homozigotos para alelos nulos do gene *SF1* ou do *WT1* enfatizam a importância crucial destes genes na organogênese gonadal (Schafer e Goodfellow, 1996; MacLean *et al.*, 1997).

O gene *WT1* foi originalmente identificado como um oncogene envolvido na etiologia do tumor de Wilms (um câncer renal infantil). Seu papel no desenvolvimento da gônada primordial ganhou força com a constatação de que mutações neste gene (mutações de ponto e deleções) conduzem a quadros sindrômicos associados, invariavelmente, a ambigüidade genital. A expressão peculiar do gene *WT1* nos primórdios do sistema renal e das gônadas, numa fase do desenvolvimento fetal em que não há tecido gonadal formado, reforça a idéia de que o gene *WT1* é essencial no desenvolvimento dessas estruturas (Schafer e Goodfellow, 1996; MacLean *et al.*, 1997; Menke *et al.*, 1998).

O gene *SF1* é um receptor nuclear único que regula a expressão de enzimas envolvidas na esteroidogênese adrenal e gonadal. Nos testículos, a expressão desse gene nas células de Sertoli parece relacioná-lo à produção do hormônio anti-mülleriano. A expressão desse gene num estágio anterior à organogênese gonadal, quando não há síntese de esteróides, sugere que o *SF1* possa ter um papel na formação da gônada indiferenciada,

além de regular a expressão de enzimas esteroidogênicas que convertem colesterol em vários produtos esteróides, inclusive hormônios sexuais (MacLean *et al.*, 1997).

Uma vez constituída a gônada em seu estado bipotencial (não diferenciado), a diferenciação desta em gônada feminina ou masculina depende do sexo cromossômico do embrião e, conseqüentemente dos determinantes gênicos necessários. A gonadogênese masculina requer a presença de um cromossomo Y, mais precisamente do *locus* gênico assim denominado fator determinante de testículo (sigla **TDF** - do inglês **T**estis **D**etermining **F**actor), cujo gene posteriormente isolado, gene *SRY* (do inglês **S**ex determining **R**egion, **Y** gene), está localizado no braço curto do cromossomo Y e parece ser a principal chave na diferenciação testicular, apesar de novas evidências apontarem o envolvimento também de genes autossômicos e ligados ao X. Em contrapartida, a gonadogênese feminina é desencadeada quando da ausência de expressão do gene *SRY* e quando da expressão, em dose dupla, de pelo menos um *locus* gênico ligado ao cromossomo X (McElreavy *et al.*, 1995; Schafer e Goodfellow, 1996; MacLean *et al.*, 1997; Vilain e McCabe, 1998).

O evento subsequente da diferenciação sexual humana (a expressão fenotípica do sexo) dependerá da gônada formada (se masculina ou feminina) pois em cada situação hormônios distintos serão produzidos e agirão, de maneira também distinta, nos primórdios genitais internos e externos para a diferenciação ao sexo masculino ou ao sexo feminino.

1.1-Diferenciação Sexual Masculina

Uma vez formado o testículo fetal, este é capaz de sintetizar testosterona e outros hormônios necessários ao terceiro evento do desenvolvimento sexual que é a expressão fenotípica do sexo masculino (Schafer e Goodfellow, 1996).

A determinação testicular a partir da gônada bissexual inicia-se na 7ª semana da vida fetal e o gene *SRY* tem papel fundamental como desencadeador da cascata de eventos genéticos que conduzirão à diferenciação sexual masculina normal. A expressão deste gene começa 1 dia antes do início da determinação morfológica da gônada e esta expressão se estende por 2 dias durante o período crítico da determinação (MacLean *et al.*, 1997). O produto codificado por este gene é um fator de transcrição com um domínio de ligação ao DNA homólogo às seqüências encontradas em proteínas nucleares do grupo de alta mobilidade (sigla **HMG** - do inglês **h**igh **m**obility **g**roup). Esta seqüência de 80 aminoácidos é chamada HMGbox. Além de responsável pela ligação ao DNA, a seqüência HMGbox parece favorecer o dobramento do DNA alvo, permitindo a interação da proteína *SRY* com outros fatores de transcrição e com seqüências de DNA que regulam a expressão de outros genes envolvidos no processo de determinação sexual (McElreavy *et al.*, 1995; Vilain e McCabe, 1998).

Um outro gene essencial para a formação testicular é o gene *SOX9*, pertencente a uma família de genes (família **SOX** - do inglês **SRY-box** homologous genes) que apresentam uma seqüência com mais de 60% de homologia com o HMGbox do *SRY*. Mutações no *SOX9*, localizado no braço longo do cromossomo 17, podem causar a displasia camptomélica (uma síndrome com predomínio de anomalias esqueléticas) sendo que os afetados 46,XY apresentam, na sua maioria, sexo reverso. Experimentos de hibridização *in situ* mostram a expressão do *SOX9* nos ossos em desenvolvimento e nos testículos fetais. No tecido gonadal os genes *SRY* e *SOX9* têm expressão temporal simultânea. Assim como o *SRY*, o *SOX9* provavelmente funciona como um fator de transcrição, ligando-se (ao menos *in vitro*) às mesmas seqüências de DNA alvo do gene *SRY*. As interações entre as duas proteínas ainda são incertas. Presume-se que o *SOX9* potencialize a ação do *SRY*. Além dessa possível interação, o *SOX9* deve de alguma maneira regular as atividades funcionais das células mesenquimais pois estas células são necessárias tanto para a formação testicular

(quando migram até o mesonefro) como também no desenvolvimento esquelético (com a diferenciação dos condrócitos). Mutações no gene *SOX9* afetam justamente estas duas etapas da organogênese, a gonadal e a óssea (McElreavy *et al.*, 1995; MacLean *et al.*, 1997).

Além do *SOX9* e do *SRY*, outros genes estão envolvidos com a formação testicular. Monossomias parciais do segmento terminal do braço curto do cromossomo 9 e do braço longo do cromossomo 10 podem causar reversão sexual em indivíduos 46,XY (Schafer e Goodfellow, 1996; MacLean *et al.*, 1997). Isto sugere que estas regiões contenham genes necessários ao desenvolvimento testicular. Recentemente foram isolados os genes *DMRT1* e *DMRT2* na posição 9p24.3. Há evidências suficientes que atestam a participação desses genes no desenvolvimento sexual em mamíferos (Raymond *et al.*, 1999).

Uma vez formada a gônada masculina, a primeira transformação observada é o surgimento de células de Sertoli na região medular dos cordões sexuais primitivos (a região cortical degenera). As células de Sertoli e as células sexuais primitivas (espermatogônias) alinham-se em cordões celulares que formarão mais tarde os túbulos seminíferos, túbulos retos e rede testis. No tecido intersticial começam a proliferar, a partir de células somáticas mesenquimais, as células de Leydig. A proliferação e diferenciação destas células depende do hormônio luteinizante (LH). Imediatamente após a sua formação, as células de Leydig começam a produzir os hormônios androgênicos (Beiguelman, 1992; ¹Toublanc, 1988; Larsen, 1993).

A primeira substância secretada pelas células de Sertoli é o hormônio anti-mülleriano (HAM), a partir da 7ª semana. O gene do HAM está localizado no braço curto do cromossomo 19 e codifica uma glicoproteína de 140 KDa composta de 2 subunidades

¹Toublanc, 1988; Larsen, 1993 *apud* Guerra Jr e Maciel-Guerra, 1997.

idênticas. A expressão do *HAM* é modulada pelo fator esteroidogênico 1 (*SFI*). Nas células de Sertoli, o *SFI* e o *HAM* são expressos conjuntamente e ambos os transcritos podem ser detectados durante a regressão dos dutos de Müller. No camundongo, a expressão do gene *HAM* requer um elemento regulatório conservado que é exatamente o sítio de ligação do receptor nuclear do *SFI* (Shen *et al.*, 1994). Nachtigal *et al* (1998) propõem uma interação *SFI/WT1* na ativação do gene *HAM*. O hormônio anti-mülleriano induz a regressão dos dutos Müller que, na versão feminina da diferenciação, dão origem ao útero, à porção superior da vagina e às trompas. O *HAM* apresenta uma ação local e não por via circulatória. Ou seja, mediado por seu receptor específico o hormônio se difunde célula a célula, provocando a autólise das células dos dutos de Müller através de enzimas lisossômicas. Os dutos de Müller são sensíveis ao *HAM* apenas até a 8ª semana. Após este período, se o *HAM* não agir sobre os dutos de Müller, estes sofrerão uma diferenciação feminina, mesmo na presença do *HAM*. Uma vez desencadeado o processo, ele não mais é interrompido mesmo com a retirada dos testículos (Beiguelman, 1982; ²Josso, 1992; Wilkie *et al.*, 1993; Imbeaud *et al.*, 1996). O hormônio anti-mülleriano também induz a formação de estruturas testiculares (como túbulos seminíferos) em ovário de ratos, sugerindo que além de induzir a regressão dos dutos de Müller este hormônio também influencia a formação testicular (³Vigier *et al.*, 1987).

A diferenciação sexual masculina propriamente dita (isto é, a masculinização dos primórdios dos genitais internos e externos) tem início a partir da produção, pelas células de Leydig entre a 8ª e a 9ª semana, dos hormônios androgênicos. Na via de síntese destes hormônios participam várias enzimas esteroidogênicas que são reguladas pela proteína *SFI*, cuja expressão é detectada nas células de Leydig. Dentre os hormônios androgênicos, a testosterona (T) é fundamental para a virilização dos genitais internos e da genitália externa.

²Josso, 1992; Wilkie *et al.*, 1993; Imbeaud *et al.*, 1996 *apud* Guerra Jr e Maciel-Guerra, 1997.

³Vigier *et al.*, 1987 *apud* McElreavey *et al.*, 1995.

A testosterona promove a virilização dos dutos de Wolff o que resulta na formação de estruturas da genitália interna masculina como epidídimo, ducto ejaculatório, vesícula seminal e vasos deferentes. A testosterona também é responsável pelo processo de espermatogênese e na regulação da produção de gonadotrofinas (Russell *et al.*, 1994).

Em um passo alternativo, a testosterona é convertida, pela ação da enzima 5 α -redutase, em 5 α -di-hidrotestosterona (DHT) que promoverá a virilização da genitália externa. Compõem os rudimentos genitais externos o tubérculo genital, as saliências lábio-escrotais e duas pregas genitais que ladeiam o seio urogenital. Sob ação da DHT, cada qual dará origem aos componentes que formarão a genitália externa masculina, sendo eles o pênis, a uretra e o escroto. O alongamento das pregas genitais formará o corpo do pênis, na extremidade do qual encontra-se a glândula do pênis desenvolvida a partir do tubérculo genital. A porção prostática e a membranosa da uretra são formadas a partir do seio urogenital com a fusão das pregas genitais, que ladeiam esta abertura, no sentido distal em direção à glândula do pênis no qual surge então a abertura da uretra peniana quando a ectoderme da glândula sofre invaginação. As saliências lábio-escrotais se desenvolvem e se fundem para originar o escroto. Este, porém, apenas alojará as gônadas masculinas por volta da 32ª semana de gestação com a descida dos testículos para o escroto (Moore, 1978; Beiguelman, 1982; ⁴Toublanc, 1988; Larsen, 1993).

A DHT atua também na formação dos caracteres sexuais secundários no homem durante a puberdade, incluindo crescimento genital, surgimento de acne, progressão temporal da calvície e desenvolvimento dos pelos sexuais (no corpo e na face). O hormônio DHT é imprescindível no desenvolvimento da próstata e outros tecidos genitais como epidídimo e vesícula seminal (Russell *et al.*, 1994; Mahony *et al.*, 1998).

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

1.2-Diferenciação Sexual Feminina

A diferenciação sexual feminina tem início na 10^a semana de gestação com a diferenciação ovariana a partir do desenvolvimento da região cortical dos cordões sexuais primitivos (a região medular degenera).

Ao contrário dos embriões com predestinação masculina, a diferenciação feminina normal é desencadeada passivamente e sem a necessidade da ação de hormônios sexuais. O desenvolvimento dos dutos de Müller e a feminização dos rudimentos genitais externos não dependem dos ovários, mas sim da ausência de hormônios androgênicos já que não existe tecido testicular. Os dutos de Wolff degeneram na ausência de testosterona e permanecem na mulher sob a forma de estruturas vestigiais. Os dutos de Müller se desenvolvem passivamente já que não sofreram regressão pela ação do HAM. A partir destes dutos são formados o útero, as trompas e a porção superior da vagina. Os rudimentos da genitália externa diferenciam-se, na ausência do hormônio DHT e também de maneira passiva, no trato genital externo da mulher. O tubérculo genital origina a glândula do clitóris, os pequenos lábios são formados a partir das pregas genitais e os grandes lábios a partir das saliências labio-escrotales. A porção inferior da vagina é formada a partir do seio urogenital (Moore, 1978; Beiguelman, 1982; ⁵Toublanc, 1988; Larsen, 1993).

A presença de dois cromossomos X íntegros é condição imprescindível para a diferenciação e manutenção dos ovários. Caso contrário, os folículos ovarianos degeneram e a gônada torna-se disgenética; isto é, uma gônada com tecido conjuntivo e sem células da linhagem germinativa (⁶Tsafriri *et al.*, 1976).

⁵Toublanc, 1988; Larsen, 1993 *apud* Guerra Jr e Maciel-Guerra, 1997

⁶Tsafriri *et al.*, 1976 *apud* Beiguelman, 1982.

A existência de um *locus* gênico envolvido com a gonadogênese feminina foi postulada após terem sido constatados indivíduos 46,XY que apresentavam sexo reverso, apesar de possuírem o gene *SRY* intacto. Estes indivíduos tinham uma duplicação de uma região do braço curto do cromossomo X. Estabeleceu-se que determinados *loci* gênicos envolvidos com a reversão sexual em indivíduos 46,XY são sensíveis quanto à dosagem de expressão. Pelos menos um desses *loci* foi identificado no cromossomo X em Xp21.2-p21.3 e é denominado *locus* DSS (do inglês **D**osage **s**ensitive **s**ex reversal). Aqueles indivíduos acima citados possuem, portanto, duas cópias ativas deste *locus* por causa da duplicação parcial do cromossomo X. Nos testículos, a expressão do DSS parece estar reprimida e a presença de uma cópia extra pode reverter esta repressão, interrompendo a diferenciação dos testículos mesmo na presença de um gene *SRY*. Apesar disto, o DSS não é essencial para o desenvolvimento testicular pois indivíduos com deleção total desse *locus* possuem genitália externa masculina normal (McElreavy *et al.*, 1995; MacLean *et al.*, 1997).

O gene *DAX1* (**D**SS, hipoplasia congênita da **a**drenal, gene ligado ao **X**), que foi primeiramente identificado em portadores de hipoplasia congênita da adrenal, está mapeado no *locus* DSS. Apesar de não haver comprovação, algumas evidências confirmam que o gene *DAX1* pode ser um dos genes que causam reversão sexual com cariótipo 46,XY. Estudos em camundongo indicam que a diferenciação sexual feminina depende da expressão em dose dupla do gene *DAX1*, o que impediria o desenvolvimento dos testículos nas fêmeas. Isto é proposto porque o *DAX1* é capaz de interferir nas interações entre os genes *SF1* e *WT1*, tendo, portanto, um potencial de reprimir genes macho-específicos. Interações entre os genes *SF1* e *WT1* são fundamentais para a ativação de genes específicos para a diferenciação sexual masculina (Nachtigal *et al.*, 1998).

1.3-Diferenciação Sexual do Cérebro

As ações dos esteróides no SNC (Sistema Nervoso Central) já são conhecidas e estudadas desde longa data. Os efeitos neurais dos esteróides variam de acordo com a estrutura nervosa considerada, do estágio de desenvolvimento do SNC e do tipo celular e espécie animal considerados. Os resultados mais expressivos quanto ao papel destes hormônios no desenvolvimento e diferenciação do cérebro foram obtidos principalmente com os estudos em rato (Poletti *et al.*, 1990; Celotti *et al.*, 1991; Negri-Cesi *et al.*, 1996; Celotti *et al.*, 1997; Poletti *et al.*, 1997; Melcangi *et al.*, 1998; Poletti *et al.*, 1998a). A equivalência destes resultados ao organismo humano começará a ser desvendada com os estudos envolvendo tecido cerebral humano.

Os hormônios esteróides participam do controle de muitas funções desempenhadas pelo cérebro durante os períodos fetal e neonatal (quando agem com uma função de organização) e também durante a fase adulta (quando agem como ativadores ou inibidores de muitas funções fisiológicas). A concentração de esteróides no SNC depende não só da produção periférica mas também da síntese local de neuro-esteróides, que são moléculas sintetizadas no cérebro e nos nervos periféricos. Os esteróides são metabolizados no cérebro pelas mesmas enzimas envolvidas na produção destes compostos em outros tecidos (Negri-Cesi *et al.*, 1996; Celotti *et al.*, 1997).

Os hormônios esteróides secretados pelas gônadas (principalmente a testosterona e seus metabólitos) são os principais, senão únicos, desencadeadores da diferenciação sexual do SNC, num processo denominado *imprinting* do cérebro pela testosterona. Estes hormônios exercem importante influência durante a vida fetal e neonatal para o desenvolvimento e função do cérebro (Negri-Cesi *et al.*, 1996). Assim como na diferenciação dos genitais femininos, a diferenciação sexual do cérebro ocorre de maneira

natural e passiva para o padrão feminino, aparentemente sem a intervenção de nenhum hormônio sexual. A diferenciação em direção ao sexo masculino depende dos andrógenos produzidos pelo testículo fetal, principalmente a testosterona. Este hormônio é fundamental para a masculinização do centro hipotalâmico, estrutura do cérebro que regula o padrão de secreção de gonadotrofinas e do hormônio de crescimento e que controla o comportamento sexual masculino ou feminino (Poletti *et al.*, 1998b).

Os andrógenos executam muitas ações no cérebro, principalmente durante o período do desenvolvimento, e este efeito é alcançado não apenas na forma original em que são secretados pelas gônadas, mas também na forma de seus metabólitos ativos (estrógenos e DHT). Ou seja, exercem seus efeitos após a conversão, pela aromatase, em estrógenos e após a conversão, pela 5α -redutase, em DHT. Esses metabólitos são capazes de modificar o número de ramificações dos neurônios motores e influenciam na plasticidade e conexões sinápticas dos neurônios hipotalâmicos, todos estes efeitos mediados pelo receptor de andrógenos. Aliás, os receptores para os hormônios sexuais apresentam uma distribuição generalizada no SNC e o número de receptores de andrógenos é mais elevado no cérebro do macho do que da fêmea com picos de concentração no centro hipotalâmico, o que reforça a idéia da influência dos andrógenos (sobretudo T) na masculinização do cérebro (Lu *et al.*, 1998).

A testosterona e seus metabólitos são fundamentais no processo de diferenciação sexual do cérebro rumo ao padrão masculino: o estradiol, obtido com a aromatização de T via aromatase, é o principal efector da diferenciação para o padrão masculino e a DHT, obtido com a 5α -redução da T, parece ser importante para a organização de populações específicas de neurônios. A DHT é produzida em altas concentrações no hipotálamo, amígdalas e medula espinhal (regiões ricas em receptores de andrógenos) e está envolvida no processo de diferenciação destas regiões específicas do cérebro. A DHT é necessária,

durante a vida peri- e pós-natal, na indução da masculinização dos núcleos espinhais sexualmente dimórficos do bulbo cavernoso presentes na porção lombar da medula espinhal. Entretanto, o efeito mais pronunciado da DHT como moduladora da diferenciação sexual do cérebro é sua atuação como um agente morfogenético: a capacidade de estimular o desenvolvimento dos neurônios hipotalâmicos que expressam a aromatase e assim influenciando a formação de redes de conexões neurais sexo-específicas, como o sistema de aromatase hipotalâmica. Nestas células hipotalâmicas específicas a enzima aromatase neuronal converte testosterona em estradiol. Este estrógeno é o efetor final do processo de diferenciação do cérebro para o sexo masculino, processo este que envolve uma organização endócrina e comportamental que inclui regulação dimórfica de gonadotrofina, secreção de GH e controle dos comportamentos sexual e agressivo (Celotti *et al.*, 1991; Negri-Cesi *et al.*, 1996; Celotti *et al.*, 1997; Poletti *et al.*, 1998b).

2 - Hormônio DHT e as Enzimas 5 α -redutases

2.1-Hormônio DHT

Embora estudos preliminares postulassem que a DHT fosse um metabólico inativo da testosterona, algumas evidências posteriores indicavam que, na verdade, o hormônio DHT tinha um papel fundamental no desenvolvimento sexual masculino. Os tecidos-alvo dos andrógenos continham atividade enzimática de 5 α -redutase e o núcleo das células daqueles tecidos mostravam acúmulo de DHT, o produto da redução de testosterona (Russell e Wilson, 1994). Porém a evidência mais sugestiva do papel fisiológico da DHT foi a descoberta de que uma rara desordem da diferenciação sexual masculina, originalmente denominada hipospadia pseudovaginal perineoescrotal (Optiz *et al.*, 1972), era causada por deficiência na atividade da enzima 5 α -redutase e, conseqüentemente, ausência de formação de 5 α -di-hidrotestosterona (Imperato-McGuinley *et al.*, 1974; Walsh *et al.*, 1974 e Peterson *et al.*, 1977). Mais tarde esta doença passou a ser denominada deficiência em 5 α -redutase, sendo que os indivíduos afetados apresentam graus variados de ambigüidade genital uma vez que a DHT é fundamental para o estabelecimento da genitália masculina.

Para desempenharem suas funções fisiológicas, a 5 α -di-hidrotestosterona e seu precursor, a testosterona, ligam-se ao mesmo receptor no núcleo das células-alvo, apesar desses andrógenos possuírem papéis fisiológicos distintos (Russell *et al.*, 1994). Todos os efeitos da DHT (e também da T) sejam eles na virilização da genitália externa ou em outros processos dependentes de andrógenos são mediados pelo receptor de andrógenos. Este receptor é uma proteína que apresenta 3 sítios funcionais em sua estrutura : o domínio de ativação da transcrição dos genes-alvo, o domínio de ligação ao DNA e o domínio de ligação ao hormônio (Wilson, 1992 e Brinkmann *et al.*, 1996). O complexo receptor-

hormônio formado age na regulação da transcrição de genes por meio da ligação deste complexo aos sítios regulatórios dentro ou adjacentes aos genes sob seu controle (Wilson, 1992). Porém, a intensidade de interação do receptor com os hormônios T e DHT não é equivalente. Esta diferença na ligação ao receptor é devida ao fato de que a dissociação do complexo T-receptor é 5 vezes mais rápida que a DHT e a DHT tem afinidade pelo receptor 4 vezes maior. A fraca interação da testosterona com o receptor de andrógenos pode ser compensada, em termos de atividade deste hormônio, através do aumento de sua concentração nos tecidos-alvo. Em altas concentrações, a T interage com o receptor de maneira semelhante à interação da DHT e o complexo T-receptor formado apresenta uma estabilidade comparada àquela constatada com a DHT. É importante salientar este fato pois a ação da T em altas concentrações pode explicar por que em indivíduos com deficiência em 5 α -redutase há uma virilização mais intensa durante a puberdade do que durante a embriogênese (Grino *et al.*, 1990).

A virilização dos dutos de Wolff ocorre como um resultado da alta concentração de testosterona cuja ação local é mais proeminente que sua ação sistêmica. Isto é, a T age como um fator parácrino e não via corrente sangüínea. Nos tecidos urogenitais distantes da síntese de testosterona, como o tubérculo genital, a quantidade do hormônio testosterona normalmente presente na corrente sangüínea não é suficiente para promover a virilização destas estruturas. Faz-se necessária, para a masculinização daquelas regiões distantes, a amplificação da ação androgênica o que é obtido pela conversão *in situ* da testosterona em 5 α -di-hidrotestosterona nos genitais externos (Grino *et al.*, 1990). A amplificação do sinal é evidente : mesmo quando é mínima a produção de DHT, este hormônio desempenha sua ação androgênica. Isto ocorre por que a DHT é um andrógeno com potência 50 vezes maior que a apresentada pelo hormônio testosterona. Portanto, a conversão de T em DHT amplifica o sinal androgênico e isto ocorre por 3 motivos básicos : 1º, com a conversão aumenta-se a interação entre hormônio e receptor; 2º, o complexo DHT-receptor apresenta

um “*turnover*” mais lento e é mais estável, pelo menos *in vitro*, e 3º, a DHT é mais efetiva que a T em estabilizar o receptor de andrógenos nas condições estruturais que transformam o receptor numa conformação adequada para a ligação aos sítios alvos de DNA.

Além de essencial para a formação do fenótipo masculino durante a embriogênese, a DHT é fundamental para o crescimento e manutenção de outros tecidos genitais dependentes de andrógenos como a próstata, o epidídimo e as vesículas seminais. Indivíduos deficientes na síntese de DHT (sem atividade da enzima 5 α -redutase) apresentam próstata rudimentar ou ausente e vesículas seminais de tamanho reduzido.

É coerente supor que a DHT tem papel importante na maturação de gametas masculinos. O epidídimo é o local de estocagem e amadurecimento dos espermatozóides, tornando-os aptos a fertilizar ovócitos e produzir proles viáveis. A manutenção das funções deste órgão é controlada por andrógenos como a T e especialmente a DHT (Viger *et al.*, 1991). Além disso, a DHT parece regular o volume do sêmen e sua viscosidade já que este hormônio age no desenvolvimento e funcionamento da próstata e vesículas seminais (Cai *et al.*, 1994). As secreções da próstata e das vesículas seminais contribuem em 80% do volume do sêmen ejaculado. Consequentemente, os afetados pela deficiência de síntese de DHT possuem sêmen em baixo volume e altamente viscoso embora possa conter gametas normais (Katz *et al.*, 1997).

Outras atividades fisiológicas da DHT são constatadas na recessão temporal dos cabelos, na produção das glândulas sebáceas, na regulação da resposta imune e mesmo nos processos de ereção do pênis. Macrófagos expressam 5 α -redutase e são capazes de metabolizar T em DHT. Este hormônio parece ter importância na regulação da produção *in vivo* de linfocinas, reduzindo a produção de interleucinas 4 (IL-4), IL-5 e γ -interferon (Araneo *et al.*, 1991). A DHT também possui importância fisiológica considerável no

processo de ereção peniana por que este andrógeno reverte a falha na atividade da enzima óxido nítrico sintetase (ONS). Esta enzima é responsável pela síntese do óxido nítrico, um dos principais mediadores da ereção peniana. A falha enzimática da ONS está relacionada à diminuição do nível de T e da atividade de 5 α -redutase. Além disso, a DHT é o andrógeno responsável pelo crescimento peniano e a conversão de T em DHT decai consideravelmente com a idade, o que coincide com a falha na ereção com o envelhecimento. Resta saber, no entanto, qual isoforma da ONS deve estar sujeita à regulação por andrógenos no pênis e se os efeitos dos andrógenos sobre o mecanismo de ereção são mediados pelo eixo hipotálamo-hipofisário, ou por meio do sistema nervoso central (Lugg *et al.*, 1995).

Além de controlar a diferenciação e crescimento do tecido genital, a DHT controla também a expressão do gene da 5 α -redutase. Ou seja, a DHT regula sua própria taxa de síntese de uma maneira positiva. Como num mecanismo de “*feed forward*”, a expressão do gene que codifica a enzima 5 α -redutase é regulada positivamente pelo próprio produto de conversão catalisado por essa enzima (George *et al.*, 1991).

2.2-Enzimas 5 α -redutases

As enzimas 5 α -redutases compreendem uma pequena família de isoenzimas que participam do metabolismo de hormônios esteróides. Estas enzimas, localizadas na membrana nuclear e no retículo endoplasmático, agem sobre substratos esteróides tais como glicocorticóides, progesteronas, mineralocorticóides e andrógenos; ou seja, virtualmente todos os hormônios esteróides desde que apresentem a configuração 3-ceto, $\Delta^{4,5}$. A Figura 1 esquematiza a reação catalisada pelas 5 α -redutases. Estas enzimas utilizam como cofator o NADPH para a redução de duplas ligações (ligação $\Delta^{4,5}$) com a adição de hidrogênio no carbono 5 (5 α -) do anel A de substratos esteróides. O NADPH é o primeiro substrato a se

ligar na 5 α -redutase (antes da T) e o NADP⁺ é o último a deixar a enzima (Levy *et al.*, 1990). Esta sequência de eventos parece ter uma importância cinética importante para a 5 α -redutase. Segundo Wigley *et al.* (1994), a ligação do NADPH parece estabilizar a enzima dentro da célula. Há portanto uma regulação do “turnover” da 5 α -redutase pelos níveis intracelulares do cofator NADPH.

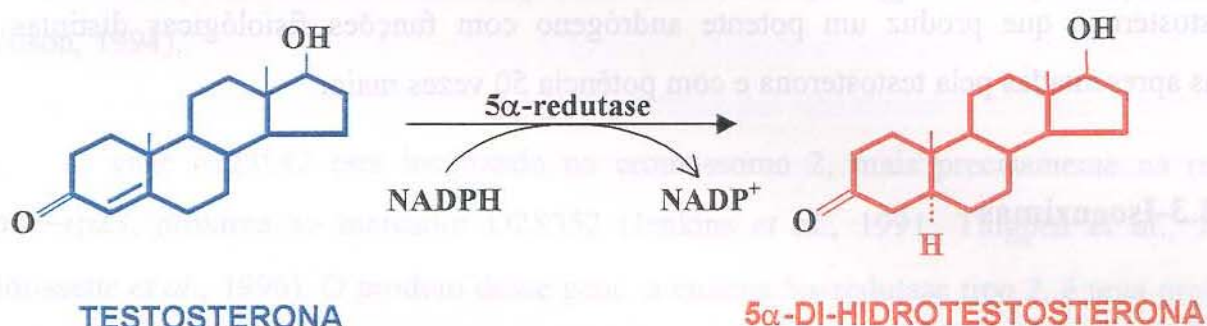


Figura 1. Reação enzimática de conversão do hormônio Testosterona em 5 α -di-hidrotestosterona catalisada pela 5 α -redutase.

As enzimas 5 α -redutases participam do catabolismo e anabolismo de substratos esteróides. Com uma função catabólica, estas enzimas agem na inativação e excreção dos hormônios esteróides. As enzimas 5 α -redutase e 3 α e 3 β hidroxí-esteróide desidrogenase agem em conjunto para regular a concentração intracelular de esteróides. Como num processo metabólico acoplado, os substratos esteróides são inicialmente 5 α -reduzidos e em seguida 3 α -hidroxilados. Ou seja, nesta via metabólica a primeira etapa é a 5 α -redução do anel A dos substratos esteróides (progesterona, testosterona e corticosterona, em ordem decrescente de afinidade). A 5 α -redução inicial torna os grupos 3-ceto mais susceptíveis à hidroxilação pelas 3 α e 3 β hidroxí-esteróides desidrogenases. Com a hidroxilação na

posição 3 (no carbono 3) há uma redução na afinidade de ligação dos esteróides aos receptores intracelulares, tornando-os mais hidrofílicos e favorecendo a excreção desses esteróides reduzidos.

Entretanto, as 5 α -redutases possuem um outro papel não menos importante : estas enzimas também potencializam a atividade dos hormônios esteróides. Esta função anabólica da 5 α -redutase pode ser exemplificada pela redução de testosterona em 5 α -dihidrotestosterona que produz um potente andrógeno com funções fisiológicas distintas daquelas apresentadas pela testosterona e com potência 50 vezes maior.

2.3-Isoenzimas

Genes SRD5A1 e SRD5A2

Informações sobre as propriedades bioquímicas, farmacológicas e fisiológicas da 5 α -redutase eram limitadas pela localização intra-membrana desta enzima hidrofóbica e pela perda de atividade enzimática durante o processo de solubilização da proteína em tecidos genitais *in vivo*. A expressão de RNA mensageiro de fígado de rato em ovócitos de *Xenopus laevis* permitiu o isolamento de clones de cDNA correspondentes à 5 α -redutase de esteróides. Esse cDNA isolado de rato foi utilizado posteriormente como sonda para o rastreamento de uma biblioteca de cDNA de próstata humana, permitindo assim a caracterização de dois genes que codificam duas isoenzimas da 5 α -redutase : gene 5 α -redutase tipo 1 (símbolo *SRD5A1*) e gene 5 α -redutase tipo 2 (*SRD5A2*), assim denominados de acordo com a ordem cronológica em que foram descobertos (Andersson *et al.*, 1989; Andersson e Russell, 1990). Os genes *SRD5A1* e *SRD5A2* apresentam um mesmo arcabouço genético composto por 5 exons e 4 introns e sítios de “splicing” idênticos; a similaridade entre as seqüências nucleotídicas é de 47% (Jenkins *et al.*, 1991; Thigpen *et al.*, 1992; Russell e Wilson, 1994; Russell *et al.*, 1994). Ambas as isoenzimas são proteínas de

membrana, o que pode ser confirmado pela distribuição de muitos aminoácidos hidrofóbicos (Andersson e Russell, 1990; Jenkins *et al.*, 1992; Labrie *et al.*, 1992).

A isoenzima tipo 1 é uma proteína de 259 aminoácidos cujo gene (*SRD5A1*) está localizado na porção distal do braço curto do cromossomo 5, na posição p15.5. Três polimorfismos foram identificados nos exons 1, 2 e 3, correspondendo a mutações silenciosas nos códons 30, 116 e 160 (Jenkins *et al.*, 1991; Thigpen *et al.*, 1992; Russell e Wilson, 1994).

O gene *SRD5A2* está localizado no cromossomo 2, mais precisamente na região 2p22→p23, próxima ao marcador D2S352 (Jenkins *et al.*, 1991; Thigpen *et al.*, 1992; Morissette *et al.*, 1996). O produto desse gene, a enzima 5 α -redutase tipo 2, é uma proteína de 254 aminoácidos. Três polimorfismos foram inicialmente identificados no gene *SRD5A2*. No primeiro polimorfismo, a transversão G para C no códon 89 do exon A pode levar à substituição do aminoácido Valina (GTA) pela Leucina (CTA). O segundo polimorfismo envolve a variação de T/C nos primeiros nucleotídeos do intron 1 próximos à junção exon A/intron 1. No terceiro polimorfismo, a região não traduzida 3' do exon E pode apresentar ou não repetições dinucleotídicas TA. O alelo sem repetição TA é mais freqüente e os alelos variantes (com 9 ou 18 cópias do dinucleotídeo) apresentam freqüências muito baixas (Russell e Wilson, 1994 e Vilchis *et al.*, 1997a). A caracterização desses polimorfismos contribuiu para a realização de estudos de segregação de alelos em famílias que apresentam anomalias que envolvem deficiência na ação de 5 α -di-hidrotestosterona (Forti *et al.*, 1996).

Além desses dois genes que codificam proteínas funcionais existe também um pseudogene não funcional (pseudogene *SRD5A1*) localizado no braço longo do cromossomo X (região Xq24-qter). Este fato, aliado à semelhança entre os genes *SRD5A1* e *SRD5A2* quanto à estrutura genética (5 exons/4 introns), faz supor que um evento de

duplicação de DNA num gene ancestral seguido de divergência quanto às funções fisiológicas levaram ao surgimento de dois genes/duas isoenzimas funcionais, além do pseudogene não funcional (Jenkins *et al.*, 1991; Thigpen *et al.*, 1992; Russell e Wilson, 1994; Russell *et al.*, 1994).

Padrão de expressão

De modo geral, as isoenzimas tipo 1 e tipo 2 são expressas em quase toda a extensão do corpo humano. Entretanto cada qual apresenta um padrão de expressão preferencial, do ponto de vista da intensidade da expressão e do tecido envolvido. A isoenzima tipo 1 é preferencialmente expressa na pele e no fígado, tendo pouca importância fisiológica nos tecidos genitais (Aumüller *et al.*, 1996). A tipo 2 é expressa principalmente nos tecidos genitais (dependentes de andrógenos) como o testículo, a próstata, vesícula seminal e epidídimo. Porém esta expressão não está restrita apenas à estes tecidos; ao contrário, a isoforma tipo 2 está presente em muitos tecidos e células, tanto em homens quanto em mulheres (Eicheler *et al.*, 1994; Silver *et al.*, 1994a).

Durante a fase embrionária, o tubérculo genital expressa as isoenzimas tipo 1 nas células epiteliais e a tipo 2 nas células mesenquimais, que são as células cruciais para a formação da genitália externa masculina (Tian *et al.*, 1997). Nos tecidos genitais, apesar da tipo 2 ser a isoenzima mais abundante, algumas estruturas como a próstata, a vesícula seminal, os testículos e o epidídimo expressam também a tipo 1, mesmo que em baixas concentrações (Russell *et al.*, 1994; Aumüller *et al.*, 1996). Outros tecidos também expressam as duas isoenzimas da 5 α -redutase como por exemplo o tecido nervoso, a pele e couro cabeludo, o fígado e as adrenais (Eicheler *et al.*, 1994). Normington e Russell (1992) acreditam que o padrão de expressão tecido-específico dos 2 genes da 5 α -redutase deve ser regulado pelas respectivas regiões promotoras e são consequência de diferentes combinações de elementos com ação em cis, além de fatores de transcrição tecido-

específicos. Há ainda diferenças quanto à regulação da atividade destas isoenzimas no fígado, próstata, epidídimo e tecido nervoso que são atribuídas às diferenças na regulação do nível de RNAm estável traduzido. O hipotálamo, por exemplo, tem maior quantidade de RNAm da isoenzima tipo 1 do que a pele porém neste tecido a atividade enzimática é 1400 vezes maior (Viger *et al.*, 1991; Thigpen *et al.*, 1993).

Na próstata, a enzima tipo 2 é a mais importante enzima na fisiologia (e também patofisiologia) da próstata. Há um padrão específico de expressão dependendo do tipo celular : a tipo 1 está confinada às células epiteliais e a tipo 2 está localizada nas células basais e no epitélio secretório da próstata (Berman e Russell, 1993; Aumüller *et al.*, 1996; Eicheler *et al.*, 1994; Silver *et al.*, 1994b).

No epidídimo, a isoenzima tipo 2 é ativamente expressa nas células basais e considerando o epidídimo como um todo, há um gradiente de expressão desta isoforma ao longo do órgão : quanto mais próximo do testículo maior a sua expressão e esta expressão cai gradativamente na direção distal ao epidídimo (Berman e Russell, 1993; Mahony *et al.*, 1998).

No fígado, os genes *SRD5A1* e *SRD5A2* começam a ser expressos a partir do nascimento até o fim da vida; porém a tipo 1 é a isoenzima mais abundante. Na pele apenas a tipo 2 é expressa durante a vida fetal. Em seguida há um pico de expressão das isoenzimas tipo 1 e 2 no couro cabeludo e na pele durante os 3 primeiros anos de vida. Um outro pico ocorre na puberdade e se estende até o resto da vida, mas desta vez apenas a tipo 1 é expressa (Thigpen *et al.*, 1993).

O SNC expressa as 2 isoenzimas e ambas estão presentes em membranas celulares (Melcangi *et al.*, 1998). A 5 α -redutase tipo 1 tem maior expressão em estruturas e células

ricas em mielina, com elevada atividade enzimática associada às membranas mielinicas. A 5 α -redutase 2 expressa-se principalmente no córtex cerebral e nos neurônios do centro hipotalâmico. Na medula espinhal, ambas as isoenzimas são detectadas : a tipo 1 provavelmente devido à elevada quantidade de estruturas mielinizadas e a isoenzima 2 com expressão restrita aos neurônios motores (Poletti *et al.*, 1990; Poletti *et al.*, 1997).

A tipo 1 é a isoforma mais abundante no tecido nervoso, sendo expressa constitutivamente em todos os estágios do desenvolvimento do SNC e detectada até mesmo em amostras *post-mortem* (Poletti *et al.*, 1998a). Em ratos a isoenzima 1 é expressa e mantém atividade em várias regiões do SNC, durante o período gestacional até a fase adulta. Não há dimorfismo sexual quanto à expressão (Melcangi *et al.*, 1998; Poletti *et al.*, 1998b).

No SNC, a expressão da isoforma tipo 2 é induzida, ou modulada, pelo nível de andrógenos (T e DHT) circulantes e é mediada por receptores de andrógenos. Esta expressão varia conforme a idade, sendo máxima no período peri-natal. Estudos realizados em ratos indicam que a isoenzima 2 começa a ser expressa no 18º dia de gestação com pico no 2º dia pós-natal e começa a decair gradualmente até atingir baixos níveis no adulto. Este padrão de expressão da 5 α -redutase 2 no cérebro coincide com o padrão de secreção de T pelo testículo fetal (Melcangi *et al.*, 1998; Poletti *et al.*, 1998a,b).

Propõe-se a existência de uma terceira isoenzima da 5 α -redutase, sendo esta cérebro-específica. Os dados que levam à esta proposição vieram do estudo de extratos de neurônios e outras células nervosas e da suposição de que fatores produzidos por estas células e presentes no meio de cultura são capazes de modificar o metabolismo de testosterona (T) e progesterona (P). Estes estudos mostram que fatores presentes no meio de cultura de células C6 (glioma murino) e de células 1321N1 (astrocitoma humano) são capazes de diminuir a formação apenas de DHP (5 α -di-hidroprogesterona, produto da 5 α -redução da P) e não da

DHT. Este efeito inibitório apenas no metabolismo da progesterona (e não da T) contradiz a idéia de uma única enzima 5 α -redutase que converta P e T. Entretanto, este efeito inibitório restrito ao metabolismo de P pode ser explicado pela maior afinidade da 5 α -redutase pela P do que pela T. Ou seja, se há este efeito inibitório, o mesmo seria mais pronunciado e imediato no caso da conversão da P, que é o substrato preferencial da 5 α -redutase. Contudo, a evidência que reforçaria a presença de uma terceira isoforma da 5 α -redutase é que células pluripotenciais do SNC, quando induzidas a diferenciar-se em células da glia, adquirem a habilidade de transformar P em DHP quatro dias antes da habilidade de conversão de T em DHT. Esta característica não pode ser explicada quando se considera uma única enzima 5 α -redutase que converta tanto T quanto P (Melcangi *et al.*, 1998).

Propriedades Bioquímicas e Farmacológicas

Os estudos dos mecanismos cinéticos e bioquímicos foram realizados sobretudo em sistemas microssomais contendo 5 α -redutase. Ambas as isoenzimas tipo 1 e tipo 2 são capazes de realizar a 5 α -redução dos esteróides com a configuração 3-ceto, $\Delta^{4,5}$. Porém exibem propriedades cinéticas/bioquímicas e farmacológicas distintas, que irão ditar o papel que cada 5 α -redutase desempenhará no metabolismo dos andrógenos. Estas diferenças estão restritas basicamente à afinidade por substratos esteróides, ao pH ótimo de atividade plena da enzima e às respostas de cada isoenzima frente a inibidores da 5 α -redutase.

A isoenzima tipo 1 apresenta baixa afinidade por substratos esteróides e o pH ótimo de atividade desta enzima varia de 5 a 8. Apesar desta pouca afinidade por substratos esteróides, a isoenzima tipo 1 possui uma capacidade de conversão dos substratos muito mais alta que a tipo 2. Em ratos, a isoenzima tipo 2 tem afinidade por substratos esteróides (principalmente T) de 15 a 20 vezes maior que a tipo 1, embora em humanos esta diferença não seja tão evidente. O pH ótimo para atividade da isoenzima tipo 2 é ácido (pH 5,5), mas

existem indicações de que dentro da célula a sua atividade máxima ocorre em pH neutro (Russell e Wilson, 1994; Wigley *et al.*, 1994; Russell *et al.*, 1996). Como mostrado por Thigpen *et al.* (1993), a isoenzima tipo 2 tem 50 vezes mais afinidade por testosterona em pH neutro do que em pH ácido.

As isoenzimas tipo 1 e 2 apresentam respostas diferentes aos inibidores do grupo da finasterida. Estes inibidores são amplamente usados no tratamento do câncer de próstata e da hiperplasia benigna da próstata, situações em que a atividade elevada de 5 α -redutase induz o crescimento daquela glândula (Stoner *et al.*, 1994). Os estudos com os inibidores também são importantes para estabelecer as relações função enzimática/estrutura da proteína (Russell *et al.*, 1994).

Funções fisiológicas das 5 α -redutases tipo 1 e tipo 2

As características peculiares a cada isoforma indicam que as 2 enzimas desempenham funções fisiológicas distintas no metabolismo de hormônios esteróides : a tipo 1 basicamente com uma função catabólica e a tipo 2 com função anabólica, sobretudo nos tecidos genitais, onde é preferencialmente expressa (Thigpen *et al.*, 1993; Normington e Russell, 1994; Russell *et al.*, 1994).

Atribui-se à 5 α -redutase 1 uma função catabólica no metabolismo de esteróides, facilitando a excreção e protegendo as células de quantidades nocivas de hormônios esteróides. Isto é proposto já que esta isoforma é expressa constitutivamente; está presente em todas as fases do desenvolvimento; é capaz de metabolizar mais ativamente andrógenos, progesterona e corticóides e é altamente expressa em tecidos como o hepático, sabidamente um órgão depurador (Thigpen *et al.*, 1993). Em adição a isso, segundo Aumüller *et al.* (1996) a isoenzima 1 é largamente expressa nas células de Kupffer. Estas células

fagocitárias do fígado fazem parte do sistema mononuclear fagocitário e contém em seu interior enzimas necessárias para a digestão intracelular das substâncias fagocitadas.

No SNC, a isoforma tipo 1 exerce outros papéis fisiológicos além de sua importância no catabolismo de esteróides. Sua alta concentração nas membranas mielínicas dos axônios sugere que a 5 α -redutase 1 seja um componente do sistema de proteção do SNC, exercido pela membrana mielínica. Os corticóides, p. ex., são extremamente danosos ao cérebro pois induzem a apoptose de neurônios do hipocampo e a 5 α -redutase 1 seria capaz de transformar cortisol e corticosterona em compostos menos danosos, protegendo assim o SNC. Por outro lado, alguns achados levantam a hipótese da ação da 5 α -redutase 1 durante o processo de mielinização: nos oligodendrócitos (células formadoras de mielina) é intensa a atividade de 5 α -redutase 1. Além disso, o pico de atividade enzimática e de expressão do gene da 5 α -redutase 1 coincide com o período em que o processo de mielinização se inicia. Contudo, até o momento não há relato de nenhuma anomalia ou quadro sindrômico atribuído exclusivamente à deficiência enzimática da 5 α -redutase tipo 1. Porém, sugere-se o papel desta isoenzima em processos dependentes de andrógenos como a produção de sebo e a calvície humana.

Quanto à recessão temporal dos cabelos há muitas controvérsias. Nos deficientes em 5 α -redutase tipo 2 esta característica é em geral pouco evidente, o que é uma manifestação indireta de que a síntese de DHT pode contribuir para a perda de cabelo, bem como que a isoenzima 2 é um fator iniciador do desenvolvimento do padrão de calvície (Thigpen *et al.*, 1993). Entretanto, apesar de não haver evidência de expressão anormal com o padrão de calvície, a 5 α -redutase tipo 1 é a única isoforma que começa a ser expressa no couro cabeludo durante a puberdade e esta expressão se estende ao longo da fase adulta. Porém, não há diferenças qualitativas quanto ao padrão de expressão da tipo 1 entre indivíduos

calvos ou não e ela é detectada em toda a extensão da calvície, em regiões contendo ou não folículos capilares (Thigpen *et al.*, 1993). Reforçando tudo isso, Ellis *et al.* (1998) estudando a distribuição dos polimorfismos nos genes *SRD5A1* e *SRD5A2* em homens calvos e não-calvos de várias faixas etárias, descartaram a sua influência na predisposição à calvície e reforçam a etiologia poligênica na perda dos cabelos. Por outro lado, o hirsutismo e a acne são duas manifestações claramente associadas ao reaparecimento da expressão da tipo 1 na pele durante a puberdade (Thigpen *et al.*, 1993). A isoenzima tipo 1 é expressa nas glândulas sebáceas da pele e esta isoenzima parece direcionar a produção de sebo, já que em indivíduos deficientes em 5 α -redutase tipo 2 esta produção é normal (Thigpen *et al.*, 1993; Russell & Wilson, 1994). Um outro papel fisiológico da isoenzima tipo 1 durante a puberdade tem sido proposto: a virilização dos indivíduos afetados. Esta é uma característica peculiar da deficiência em 5 α -redutase tipo 2 e será melhor detalhada posteriormente.

A isoenzima tipo 2 parece ter função fisiológica apenas nos tecidos dependentes de andrógenos como próstata, vesícula seminal e epidídimo. Estes órgãos dependem da DHT para o crescimento e manutenção no indivíduo adulto. Ainda não é bem conhecida a função desta isoenzima em outros tecidos não genitais que expressam esta isoforma. Estes outros tecidos parecem não estar afetados quando não há atividade enzimática da isoenzima 2 (Thigpen *et al.*, 1993). Contudo, a expressão da 5 α -redutase 2 no SNC faz supor que esta isoenzima seja crucial para a diferenciação sexual do cérebro. A 5 α -redutase 2 é expressa em regiões e em um período críticos da diferenciação sexual do cérebro, quando é elevado o nível de andrógenos e de seu receptor (Lu *et al.*, 1998; Melcangi *et al.*, 1998; Poletti *et al.*, 1998a).

Diante destas características distintas, o papel da isoenzima tipo 2 na etiologia de PHM por deficiência em 5 α -redutase foi evidenciado. A 5 α -redutase tipo 2 é

preferencialmente expressa em tecidos genitais (próstata e rudimentos genitais externos) e apresenta elevada afinidade por hormônios esteróides (baixo Km por testosterona). Estudos de segregação de alelos polimórficos dos genes *SRD5A1* e *SRD5A2* confirmaram este último gene na deficiência em 5 α -redutase e excluíram a isoenzima tipo 1. Porém, o que de fato estabeleceu que a deficiência em 5 α -redutase como causa de PHM envolvia o gene *SRD5A2* foi a identificação de mutações (pontuais ou deleção) neste gene nos pacientes afetados, na ausência de mutações no gene *SRD5A1* (Jenkins *et al.*, 1992 e Russell e Wilson, 1994).

3 - PHM por Deficiência em 5 α -redutase Tipo 2

O pseudo-hermafroditismo masculino (PHM) pode ser genericamente definido como sendo a deficiência ou ausência de virilização dos genitais externos e, eventualmente, internos em indivíduos do sexo masculino (cariótipo 46,XY) com estruturas gonadais masculinas. Os distúrbios que conduzem ao PHM apresentam como causas básicas e mais freqüentes as deficiências na função testicular (deficiências no receptor de LH e na síntese do HAM e seu receptor, defeitos nas vias de síntese de testosterona) e as síndromes de resistência aos andrógenos (Wilson, 1992). Este último grupo reúne as síndromes de insensibilidade completa ou parcial ao receptor de andrógenos e a deficiência em 5 α -redutase tipo 2, objeto de estudo desta tese.

3.1-Deficiência em 5 alfa redutase tipo 2

Definição

A deficiência em 5 α -redutase é uma doença com padrão de herança autossômico recessivo que resulta numa forma específica de PHM no qual a conversão de testosterona em 5 α -di-hidrotestosterona está comprometida por que é nula ou defeituosa a atividade da enzima 5 α -redutase tipo 2 em razão de mutações no gene *SRD5A2* (Andersson *et al.*, 1991; Thigpen *et al.*, 1992; Russell *et al.*, 1994). Os afetados são indivíduos 46,XY que ao nascimento apresentam ambigüidade da genitália externa, virilização na puberdade (porém com pouca pilificação relacionada à diferenciação dos caracteres sexuais secundários), pouca recessão temporal do cabelo e acne (Thigpen *et al.*, 1993). A maioria dos afetados são inférteis por apresentarem azoospermia ou oligospermia como consequência da não descida dos testículos para a bolsa escrotal (Katz *et al.*, 1997). A heterogeneidade da manifestação fenotípica é tal que os indivíduos afetados exibem uma genitália externa que pode variar de um fenótipo com estruturas quase femininas (pacientes com hipospadia pseudovaginal períneoescrotal) a um fenótipo masculino sem qualquer sinal clínico grave característico desta condição (pacientes com hipospadia e/ou micropênis) (Sinnecker *et al.*, 1996 e Gad *et al.*, 1997).

Virilização na puberdade

Apesar da aparente pouca importância da 5 α -redutase tipo 1 no pseudo-hermafroditismo por deficiência em 5 α -redutase tipo 2, essa isoenzima desempenha uma função fisiológica discreta neste tipo de PHM. Uma das características da deficiência em 5 α -redutase tipo 2 é a virilização da genitália externa durante a puberdade. Nesse processo ocorre crescimento fálico, pigmentação do escroto (que se torna mais rugoso), descida dos testículos e, enfim, desenvolvimento corporal do tipo masculino com espessamento da voz e

aumento da massa muscular (Imperato-McGinley *et al.*, 1979b; Forti *et al.*, 1996; Katz *et al.*, 1997). Considera-se que tais características possam ser decorrentes : a) da atividade residual da enzima mutante; b) da própria ação de testosterona que, em elevadas concentrações séricas, pode mimetizar os efeitos da DHT e c) da 5 α -redutase tipo 1. Dois fatos reforçam o papel da isoenzima 1 nesta virilização. Primeiro, durante toda a vida (desde o nascimento) o fígado expressa esta isoenzima. Segundo, a expressão da 5 α -redutase tipo 1 na pele e no couro cabeludo aumenta na puberdade e se mantém até o final da vida. De acordo com Thigpen *et al.* (1993) a pele, o tecido hepático e o couro cabeludo juntos totalizam mais de 25% da massa corporal de um indivíduo e dessa forma a produção de 5 α -di-hidrotestosterona nestes tecidos pela isoenzima tipo 1 poderia estar influenciando a virilização da genitália externa na puberdade. Se assim o for, a DHT produzida nestes tecidos estaria agindo via uma ação endócrina e não mais parácrina como ocorre nos tecidos genitais.

Concomitantemente à virilização da genitália externa, os afetados padecem também de indefinição do sexo psicossocial durante a puberdade. Na grande maioria das vezes os pacientes são criados como meninas desde o nascimento. No entanto, freqüentemente adquirem uma identificação psicossocial masculina, inclusive com a aquisição de preferências sexuais femininas. Este processo de mudança começa durante a puberdade e nos períodos que a antecedem (Imperato-McGinley *et al.*, 1979a; Imperato-McGinley *et al.*, 1979b). Normalmente, o sexo de criação, o *imprinting* da testosterona sobre o cérebro e a ação da testosterona durante a puberdade atuam em conjunto determinando a identidade masculina. Entretanto, segundo Imperato-McGinley *et al.* (1979ab) a ação dos andrógenos (principalmente T) no cérebro tem mais efeito na aquisição de uma identidade psicossocial masculina do que o próprio sexo de criação. Esta ação obedece períodos críticos : *in utero* e nos períodos neonatais agiriam como indutores da identidade psicossocial masculina e

durante a puberdade agiriam como ativadores. Neste contexto, fica evidenciado porque, não raramente, os deficientes em 5 α -redutase passam por uma mudança na identificação sexual.

Diagnósticos clínico/laboratorial e molecular

O diagnóstico de PHM em decorrência de deficiência em 5 α -redutase torna-se extremamente complexo em função da amplitude de fenótipos que caracteriza esta doença. As alterações anatômicas variam desde falha parcial até total na virilização. Os achados mais comuns são aplasia de próstata, falo pequeno e testículos presentes no canal inguinal, grandes lábios ou escroto. A Tabela I resume os achados clínicos e laboratoriais da deficiência em 5 α -redutase tipo 2 (Opitz *et al.*, 1972; Imperato-McGinley *et al.*, 1974; Peterson *et al.*, 1977; Balducci *et al.*, 1996; Al-Attia *et al.*, 1997).

Tabela I. Achados clínicos e laboratoriais da deficiência em 5 α -redutase tipo 2.

Diagnóstico da Deficiência em 5 α -redutase tipo 2
- Indivíduos 46,XY com ambigüidade genital - Agenesia de próstata - Virilização na puberdade (sem ginecomastia) - Nível plasmático de T normal para o padrão masculino - Diminuição do nível plasmático de DHT - Razão T/DHT elevada - Diminuição dos metabólitos 5α-reduzidos - Diminuição da atividade de 5α-redutase 2 <i>in vitro</i> em pele genital - Padrão de herança autossômico recessivo

A identificação de indivíduos afetados pode ser feita por dosagens hormonais. Os exames laboratoriais mais freqüentemente utilizados são as dosagens séricas de testosterona e 5 α -di-hidrotestosterona pré e pós estímulo com hCG (gonadotrofina coriônica), o cálculo

da razão testosterona/5 α -di-hidrotestosterona, a dosagem urinária de metabólitos 5 α -reduzidos e a quantificação da atividade de 5 α -redutase em cultura de fibroblastos de pele da região genital. A gonadotrofina coriônica estimula as células de Leydig a produzirem andrógenos e, em especial, a testosterona. Sendo assim, após administração de hCG em afetados a concentração sérica de testosterona mostra-se elevada; contudo não há aumento correspondente da concentração sérica de DHT (como esperado neste tipo de deficiência enzimática). O cálculo da razão entre as concentrações séricas de T e DHT pode indicar suspeita de deficiência em 5 α -redutase, embora alguns estudos tenham relatado a ausência de correlação entre a gravidade dos defeitos na masculinização e a razão T/DHT (Sinnecker *et al.*, 1996). A dosagem urinária de esteróides 5 α -reduzidos provou ser uma alternativa adicional no diagnóstico da anomalia em questão já que a excreção desses metabólitos é mínima em deficientes em 5 α -redutase (Imperato-McGinley *et al.*, 1985; Hochberg *et al.*, 1996). E, afim de se quantificar a atividade enzimática de 5 α -redutase (se nula, residual ou normal), a cultura de fibroblastos obtidos de biópsia de pele genital tem auxiliado na triagem de portadores desta anomalia.

Contudo, apesar da deficiência em 5 α -redutase apresentar um quadro endócrino bem estabelecido, os parâmetros das dosagens séricas e urinárias são extremamente variáveis e somente podem ser conclusivos na definição de casos mais gravemente afetados, nos quais a função enzimática se acha fortemente inibida (Thigpen *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1993). Essas dosagens não são suficientes para diagnosticar formas mais discretas nas quais a atividade da enzima é diminuída mas não nula, bem como para o diagnóstico diferencial da etiologia do pseudo-hermafroditismo masculino em pacientes pré-púberes. A identificação de deficientes em 5 α -redutase por análises moleculares pode ser, segundo Hiort *et al.* (1996a,b), uma abordagem alternativa para o diagnóstico diferencial desta anomalia dentre as outras causas de PHM, sobretudo em pacientes pré-púberes. Estas análises moleculares

passaram a ser amplamente difundidas a partir do momento em que a clonagem do gene que codifica a 5 α -redutase permitiu a identificação de mutações neste gene (Andersson e Russell, 1990; Labrie *et al.*, 1992).

Mutações no gene SRD5A2

A deficiência na atividade de 5 α -redutase tipo 2 pode ser decorrente de : 1-) formação de enzima não funcional (como resultado de deleções, códons de parada prematuros, mutações nos sítios de “splicing”), 2-) formação de enzima com estabilidade reduzida ou 3-) formação de enzima com afinidade diminuída pelo NADPH ou pela testosterona (Wilson *et al.*, 1993). Existem ainda mutações que levam a substituições de aminoácidos que afetam o pH ótimo de atividade enzimática. Esta amplitude de causas justifica a heterogeneidade fenotípica que é própria da doença.

A caracterização das mutações possibilitou a identificação de 2 domínios funcionais na enzima 5 α -redutase tipo 2 : um domínio de ligação ao cofator NADPH e um domínio de ligação ao substrato esteróide (hormônio testosterona). As mutações que afetam a ligação à T estão mapeadas nas extremidades amino e carboxi-terminal do gene (nos exons A e E). As mutações que afetam a ligação da isoenzima tipo 2 ao NADPH são mais numerosas e estão mapeadas principalmente nos exons C e D (Russell *et al.*, 1996; Russell e Wilson, 1994; Wigley *et al.*, 1994 e Vilchis *et al.*, 1997a).

Quase 40 mutações diferentes já foram descritas : 30 mutações de ponto com substituição de aminoácido, 1 mutação que afeta o mecanismo de “splicing” (exon D/intron 4), 2 mutações que criam códons de terminação prematuros, 1 mutação que abole o códon de parada normal e 5 deleções, uma delas envolvendo o gene inteiro (Thigpen *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1993; Boudon *et al.*, 1995a,b; Griffin *et al.*, 1995; Hiort *et al.*, 1996a; Russell

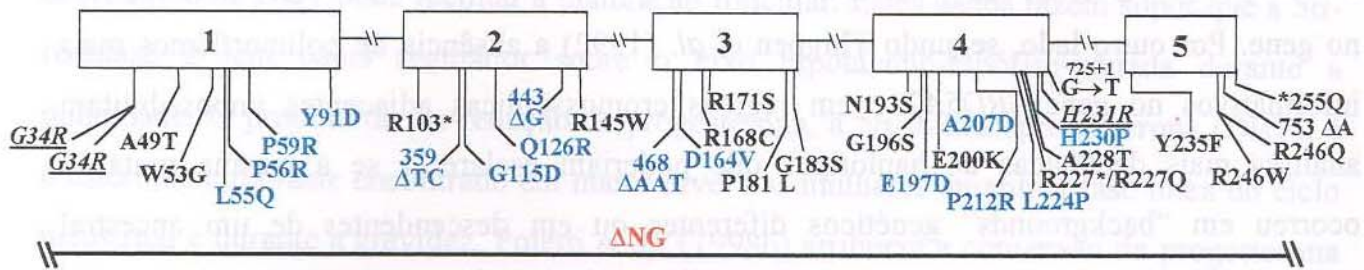


Figura 2. Mutações no gene *SRD5A2*. Estão indicadas aquelas que inativam completamente a enzima (em azul) e aquelas que conduzem à falha enzimática (em preto). Entre estas últimas, são mostradas as mutações que afetam a afinidade de ligação da enzima ao substrato testosterona (em itálico e sublinhadas) e aquelas que afetam a afinidade de ligação ao cofator NADPH (demais mutações). A deleção de todo o gene está representada por ΔNG . Os aminoácidos envolvidos na substituição são indicados conforme a abreviação de uma letra e o número representa o resíduo na proteína. Deleções são representadas pelo símbolo Δ , indicando a posição e o nucleotídeo envolvido. Mutações que criam códons de parada prematuros estão representados por asterisco.

et al., 1996; Alber *et al.*, 1997; Anwar *et al.*, 1997; Can *et al.*, 1998; Nordenskjöld *et al.*, 1998). A Figura 2 esquematiza todas as mutações no gene *SRD5A2* até então descritas.

Segundo Thigpen *et al.* (1992) e Russell *et al.* (1994, 1996) aproximadamente 65% dos indivíduos afetados são homozigotos e 35% são heterozigotos compostos. Esta alta frequência de heterozigotos compostos tem sugerido que a frequência de portadores na população em geral pode ser alta (o que explicaria a homozigose de determinada mutação em afetados não consangüíneos). Os mesmos autores propõem que esta alta taxa de heterozigotos compostos numa doença rara e com padrão de herança autossômico recessivo pode ser explicada se considerarmos que o gene é altamente mutável (com regiões preferenciais para eventos de mutação, os “hot spots”) ou que há alguma vantagem seletiva para os indivíduos portadores, apesar de não haver, até o momento, nenhuma evidência neste sentido. A propósito, a recorrência de mutações idênticas em grupos étnicos diferentes

e oriundas de regiões geográficas distintas tem sugerido a existência de regiões “hot spots” no gene. Por outro lado, segundo Thigpen *et al.* (1992) a ausência de polimorfismos mais informativos no gene *SRD5A2* e em regiões cromossômicas adjacentes impossibilitam análises mais detalhadas de haplótipos que poderiam esclarecer se a mesma mutação ocorreu em “backgrounds” genéticos diferentes ou em descendentes de um ancestral comum. Na situação inversa, mutações similares dentro do mesmo grupo étnico são atribuídas ao efeito de fundação; isto é, a existência de um ancestral comum entre as famílias afetadas (Wilson *et al.*, 1993; Cai *et al.*, 1996; Forti *et al.*, 1996; Canto *et al.*, 1997 e Vilchis *et al.*, 1997b).

Mulheres com deficiência em 5 α -redutase tipo 2

A deficiência em 5 α -redutase tipo 2 é uma anomalia autossômica. A expressão fenotípica desta deficiência é variável conforme o sexo, ao contrário do PHM que é uma condição limitada ao sexo masculino. Mulheres homozigotas para alelos mutantes do gene *SRD5A2* são férteis e possuem desenvolvimento sexual normal (Can *et al.*, 1998; Katz *et al.*, 1995; Milewich *et al.*, 1995).

O padrão de distribuição de pêlos nestas mulheres é típico dos deficientes em DHT. Ou seja, a DHT está associada ao padrão normal de pilificação em mulheres com alelos normais, enquanto naquelas com alelos mutantes os pêlos em braços e pernas estão ausentes e os pêlos pubianos e axilares são esparsos (Katz *et al.*, 1995; Hochberg *et al.*, 1996).

Não há comprometimento da fertilidade nas mulheres homozigotas para o alelo mutante, apesar de apresentarem atraso da menarca (Katz *et al.*, 1995). Ao contrário, os ciclos ovarianos são regulares, porém com mais de 1 folículo maduro por ciclo menstrual. A DHT regula a maturação dos folículos ovarianos inibindo a indução dos receptores LH pelo FSH nas células granulosas dos folículos ovarianos em desenvolvimento. Dessa forma, o

decréscimo de DHT pode facilitar a maturação folicular. Estes dados fazem supor que a 5 α -redutase 2 tem papel regulador sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônada durante a puberdade. O produto da 5 α -redução da progesterona, a 5 α -di-hidroprogesterona (DHP), é o esteróide circulante encontrado em maior nível nas mulheres durante a fase lútea do ciclo menstrual e durante a gravidez. Poletti *et al.* (1998b) atribuem a conversão de progesterona à isoenzima tipo 2. Segundo esses autores, durante a gravidez e nos períodos que antecedem o parto, a enzima 5 α -redutase 2 é expressa em grandes quantidades no SNC do feto e na placenta. Como o nível plasmático de progesterona é elevado, há uma razão para isto: a progesterona serve como substrato na produção de compostos anestésicos e a isoenzima tipo 2 parece ser responsável pelo estado de sedação que ocasionalmente é notado durante a gravidez.

Contrariamente ao esperado em mulheres deficientes em 5 α -redutase tipo 2, os níveis de DHP continuam elevados. Isto sugere atividade ou da isoenzima tipo 1 ou de outra isoenzima da 5 α -redutase, ainda não detectada (Milewich *et al.*, 1995).

OBJETIVOS

II - OBJETIVOS

O presente trabalho teve como metas a serem alcançadas :

- 1º - Identificar as alterações moleculares no gene *SRD5A2* em pacientes com diagnóstico clínico e(ou) laboratorial de PHM por deficiência em 5 α -redutase tipo 2, e
- 2º - Pesquisar a existência de alterações moleculares no gene *SRD5A2* em pacientes pré-púberes com PHM de etiologia não definida.

III - CASUÍSTICA

Os pacientes foram avaliados no ambulatório do GIEDDS, sendo encaminhados para investigação molecular após concordarem (eles ou seus responsáveis) em participar voluntariamente do estudo. Na maioria dos casos, esses pacientes também participaram do protocolo de investigação hormonal estabelecido pelo GIEDDS, sob a coordenação do Dr. Gil Guerra Júnior. Além da anamnese e do exame físico, os exames laboratoriais compreenderam a análise do cariótipo, os exames anatomopatológicos e exames hormonais e exames por imagem (ultra-sonografia, genitografia, etc) quando indicados (vide anexo I, pág. 115).

Os estudos citogenéticos foram realizados no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Genética Médica da FCM/UNICAMP. Todos os pacientes apresentaram cariótipo 46,XY.

Os dados relativos aos 30 pacientes com PHM analisados nesse trabalho estão sumariados na Tabela II. Em seis casos os achados hormonais indicavam a existência de deficiência em 5 α -redutase 2 (pacientes n^{os} 1, 3, 6, 8, 13, 18 e 29). Outros três pacientes apresentavam diagnóstico clínico sugestivo de 5 α -redutase 2 (pacientes n^{os} 2, 9 e 27). Os demais pacientes não apresentavam uma etiologia pré-definida no início desse estudo, pois naquela ocasião os testes hormonais ainda não se achavam disponíveis.

CASUÍSTICA

Tabela II. Idade, desenvolvimento puberal, sexo social, presença de consangüinidade ou recorrência familiar, características da genitália externa e localização das gônadas e relação T/DHT dos 30 pacientes com PHM e cariótipo 46,XY analisados neste trabalho. (dados fornecidos pelo GIEDDS).

PACIENTE Nº	IDADE (*)	Sexo Social	RF	GE	Gônadas	RAZÃO T/DHT
1	16a M1P3	F	+	III	D: CI E: SLE	82
2	18a M1P4	M ¹	-	III	SLE	15
3	20a M1P3	M ¹	-	III	SLE	106
4	4a e 2m	F	-	III	SLE	25
5	8a M1P1	F	+(²)	III	Ø	NR
6	2a	M	+(²)	III	SLE	51
7	5a	F	-	III	SLE	20
8	10m	M ¹	+	IV	CI	87
9	14a M1P5	F	-	I	CI	65
10	1a	M	-	III	SLE	15
11	5a e 6m	M	-	IV	SLE	5
12	5a e 3m	M	+(²)	IV	SLE	14
13	3a e 4m	M	+(²)	IV	SLE	50
14	7a G3P3	M	-	IV	SLE	14
15	4a e 10m	M	-	III	SLE	20
16	3a e 9m	M	-	IV	SLE	21
17	5a	M	-	IV	SLE	18
18	4a e 1m	M	+(²)	IV	D: CI E: SLE	65
19	6a e 1m	M	+(²)	IV	CI	14
20	8a e 7m G1P1	M	-	IV	D: CI E: SLE	43
21	3a e 8m	M	-	V	SLE	27
22	3a e 9m	M	-	IV	D: CI E: SLE	5
23	10a e 1m G1P1	M	-	IV	CI	5
24	7a e 9m	M	-	III	D: SLE E: CI	14
25	5a e 8m	M	-	IV	SLE	5
26	5a e 4m	M	-	IV	SLE	6
27	1m	M	-	III	SLE	25
28	5m	M	-	IV	SLE	16
29	1m	M	-	IV	SLE	95
30	16a G3P3	M	-	IV	SLE	38

CASUÍSTICA

- **Idade** em anos (a) e meses (m).
- (*) **Desenvolvimento puberal** de acordo com Marshall e Tanner (1969) :
 - M₁** = mamas em fase pré-adolescência (elevação das papilas);
 - G₁** = genitália em fase pré-adolescência (infantil);
 - G₃** = aumento do escroto, dos testículos e do pênis (em toda a sua extensão);
 - P₁** = pêlos pubianos em fase pré-adolescência (não há pelugem);
 - P₃** = pêlos mais escuros, ásperos, sobre o púbis;
 - P₄** = pelugem do tipo adulto, mas a área coberta é menor que no adulto;
 - P₅** = pelugem tipo adulto, cobrindo todo o púbis e a virilha.
- **M** = masculino; **F** = feminino; ¹ = quando ocorreu mudança do sexo civil.
- **RF** = história de casos semelhantes na família; ² = pares de irmãos afetados (5 e 6, 12 e 13 e 18 e 19).
- **GE** = classificação da genitália externa de acordo com Prader, 1954 (vide anexo II, pág. 114).
- **D** = lado direito; **E** = lado esquerdo.
- **CI** = canal inguinal; **SLE** = saliência labioescrotal; **Ø** = gonadectomia bilateral
- **+** = presente; **-** = ausente; **NR** = não realizado.

VI - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Extração do DNA Genômico

A extração do DNA genômico foi feita a partir de leucócitos obtidos em 10 a 15ml de sangue periférico coletado com EDTA 10%, conforme o método descrito por Woodhead *et al.* (1986), com algumas modificações.

Ao sangue total adicionou-se 35ml de solução A que promove a lise de hemácias. Esta **solução A** é composta de : Triton 100X a 1%, $MgCl_2$ a 5mM, sacarose a 0,32M (109,5g de sacarose ultra pura/litro) e Tris-HCl a 10mM em pH 8,0. Após homogeneização a mistura foi mantida em gelo por 30 minutos. Em seguida centrifugou-se esta mistura a 2.000rpm por 10 minutos a 4°C. O “*pellet*” (aglomerado de células e restos celulares formado com o processo de centrifugação) foi novamente ressuspensão em 20ml da solução A. Após agitação por inversão o tubo contendo a amostra foi centrifugado novamente a 2.500rpm por 15 minutos em temperatura ambiente (TA), desprezando-se o sobrenadante. Esta etapa foi realizada quantas vezes fossem necessárias até que o “*pellet*” estivesse limpo (livre dos restos de hemácias lisadas).

Dando sequência à extração, o “*pellet*” limpo foi ressuspensão em 1ml de solução B e 250µl de solução C. A **solução B** contém : Na_2EDTA a 20mM, NaCl a 20mM e Tris-HCl a 20mM em pH 8,0; a **solução C** (preparada apenas no momento do uso) é composta de : 50% da solução B, 50% de SDS 10% e 1mg de Proteinase K (Boehring Mannheim GmbH, Mannheim, Germany). Incubou-se os tubos em banho-maria a 37°C durante a noite. Após o período de incubação, procedeu-se à purificação do DNA genômico com o reagente “70% *Phenol/Water/Chloroform*” da Applied Biosystems. O fenol permite a remoção de peptídeos

e proteínas de soluções aquosas. Acrescentou-se às amostras a mesma proporção (volume:volume) de fenol; após homogeneização por inversão lenta dos tubos, estes foram centrifugados a 2.500rpm por 10 minutos em TA. Em seguida, coletou-se o sobrenadante num novo tubo, descartando-se o precipitado. Esta etapa de extração com fenol foi repetida uma vez mais. À fase aquosa coletada acrescentou-se igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (na proporção 24:1). Novamente os tubos foram centrifugados a 2.500rpm por 10 minutos em TA e a fase aquosa coletada. Esta extração com clorofórmio/álcool isoamílico foi repetida uma vez mais.

A partir do sobrenadante colhido o DNA foi precipitado adicionando-se 0,1 volume de acetato de sódio 3M em pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto. O precipitado de DNA foi obtido após inversão lenta dos tubos. Com o auxílio de um bastão o DNA foi coletado e em seguida lavado com etanol 70% para a retirada do excesso de sal. Dependendo do volume de DNA precipitado ressuspende-se em 200 a 500µl de solução tampão Tris-EDTA (ou TE) 1x. O **TE 10x** é constituído de Tris-HCl a 10mM (em pH 8,0) e EDTA a 1mM (também em pH 8,0). Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente durante a noite para que o DNA entrasse em solução. A concentração final de DNA foi estimada por leitura de absorção óptica a 260nm em espectrofotômetro e sua integridade foi verificada em gel de agarose 0,8% após eletroforese em tampão Tris-Borato-EDTA, ou TBE, 1x (**TBE 10x** é composto de Tris-Base a 0,089M, Ácido Bórico a 0,089M e EDTA a 0,002M e em pH 8,0) e intercalação do DNA com brometo de etídio para a visualização em transluminador sob luz ultravioleta. O **brometo de etídio** utilizado (na concentração 0,5µg/ml) foi feito a partir de 5µl da solução estoque (a 10mg/ml) diluída em 100ml de água Milli Q.

2 - Reação em Cadeia da Polimerase

O gene *SRD5A2* compõe-se de 5 exons que são amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR - do inglês polymerase chain reaction). Para esta reação foram sintetizados iniciadores de acordo com Katz *et al.* (1995) e Hiort *et al.* (1996). Os iniciadores ou “*primers*” são oligonucleotídeos sintéticos a partir do qual os desoxinucleotídeos (dNTPs) são incorporados e tem início a transcrição do DNA respeitando-se a complementaridade de bases (A-T/C-G e vice-versa), conforme Saiki *et al.* (1989). A Tabela III descreve as seqüências dos oligonucleotídeos construídos assim como a posição de anelamento e o tamanho (em pares de bases) dos fragmentos amplificados por cada par de “*primers*” (*sense* e *anti-sense*). A Figura 3 esquematiza os exons do gene

Tabela III. Iniciadores (“*primers*”) para amplificação dos exons A a E do gene da 5 α -redutase tipo 2 (segundo Katz *et al.*, 1995 e Hiort *et al.*, 1996).

Exon	Tamanho do produto de PCR	Iniciadores	Posição ¹	Seqüência (5'→3')
A_{total}	369 pb	Sense	714-736	GCAGCGGCCACCGGCGAGGAACA
		Anti-sense	1061-1082	TGGACGCCGGGAGCAGGGCAGT
A₁	260 pb	Sense	713-732	GGCAGCGGCCACCGGCGAGG
		Anti-sense	953-972	CGAAGAGGGAGAGGGGGCTGC
A₂	151 pb	Sense	913-932	AGCTGCCTTCCTTCGCGGTG
		Anti-sense	1043-1063	AGTGCCTGCACTGGGCGCC
B	243 pb	Sense	1188-1211	CAGTGAATCCTAACCTTTCCTCCC
		Anti-sense	1408-1430	TTGTTAGCTGGGAAGTAGGTGAG
C	203 pb	Sense	1529-1550	AAGCACCACAATCTGGACACAT
		Anti-sense	1709-1731	CTCCAGGGAAGAGTGAGAGTCTG
D	238 pb	Sense	1857-1880	CAATGATTGACCTTCCGATTCTTC
		Anti-sense	2071-2094	GTTTGGAGAAGAAGAAAGCTACGT
E	171 pb	Sense	2192-2215	TCAGCCACTGCTCCATTATATTTA
		Anti-sense	2337-2215	TTGACAGTTTTTCATCAGCATTGTGG

A numeração indica a posição dos nucleotídios de acordo com a seqüência descrita em Labrie *et al.* (1992).

SRD5A2 e os locais de anelamento dos “*primers*” nos introns e regiões não traduzidas do gene.

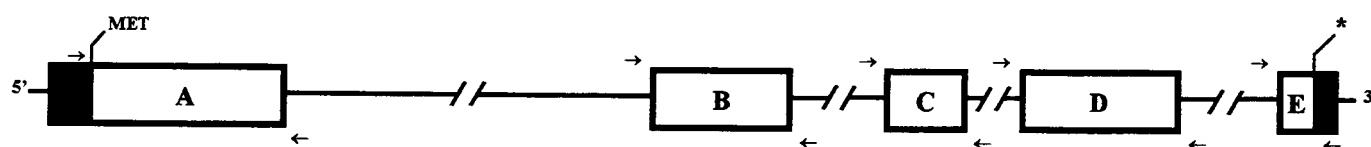


Figura 3. Exons do gene *SRD5A2* (boxes) e os sítios de anelamento dos pares de “*primers*” utilizados para amplificação de cada exon. Os códons de início da tradução (em met) e de parada (em *) também estão indicados assim como o tamanho aproximado dos introns (linhas). Os boxes em negrito mostram as regiões não traduzidas a 5’ e 3’ do gene.

A reação de PCR foi realizada num volume final de 100µl contendo de 200 a 500ng de DNA genômico, 20pmol de cada “*primer*”, 200µM de cada dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 2,5 unidades de enzima *Taq* DNA Polimerase (Gibco BRL®) e tampão de reação para a enzima (Gibco BRL®). Depois de uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos seguiram-se 35 ciclos compostos das seguintes temperatura e duração : desnaturação a 94°C por 90 segundos, anelamento dos “*primers*” a 60-68°C (ver Tabela IV) por 90 segundos e

Tabela IV. Tempos, temperaturas e números de ciclos nas reações de PCR para cada um dos iniciadores.

Exons	Etapa Inicial		35 Ciclos						Etapa final	
	Desnaturação		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão	
	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)
A_{total}	5	95	1	95	1	68	1	72	1	72
A₁						66				
A₂						65				
B						63				
C						60				
D						63				
E						60				

incorporação de nucleotídeos ou extensão a 72°C (atividade ótima da enzima *Taq* DNA Polimerase) por 90 segundos.

Para facilitar o rastreamento e sequenciamento de mutações no exon A (369 pares de bases), este exon passou a ser amplificado em duas reações PCR separadas. O fragmento amplificado A₁ abrange a extremidade 5' do exon A_{total} e o fragmento A₂ a extremidade 3'. Ambos os pares de “*primers*” utilizados amplificam sequências nucleotídicas internas ao exon A que são compartilhadas pelos fragmentos A₁ e A₂. A Figura 4 esquematiza os locais de anelamento dos “*primers*” para amplificação destes fragmentos.



Figura 4. Posições de anelamento dos “*primers*” *sense* e *anti-sense* para amplificação dos fragmentos A₁ e A₂. Os pares de “*primers*” do exon A₁ estão indicados por setas vazias e os pares do exon A₂ estão indicados por setas cheias.

3 - Análise dos Polimorfismos de Conformação das Fitas Simples de DNA

Para a detecção de possíveis mutações pontuais os exons amplificados foram rastreados através da análise dos polimorfismos de conformação das fitas simples de DNA pelo método SSCP (do inglês - *single strand conformation polymorphism*). Neste método, inicialmente descrito por Orita *et al.* (1989), os fragmentos de DNA dupla fita são desnaturados e as fitas simples são separadas em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes. Nestas condições cada fita simples assume uma conformação estrutural

dependendo das interações internas e pareamento de bases de sua própria sequência nucleotídica. Padrões de migração específicas para cada fita simples são visualizados, dependendo da temperatura da corrida e da concentração do gel.

A análise por SSCP foi realizada no equipamento semi-automático PhastSystemTM (Pharmacia - Biotech) que congrega as subunidades para a corrida de eletroforese e para a coloração do gel por impregnação pelo nitrato prata. Além da praticidade do sistema (rapidez na obtenção dos resultados e a desnecessidade do uso de isótopos radioativos), o PhastSystemTM proporciona condições eletroforéticas ideais incluindo temperatura da corrida precisamente controlada, garantindo resultados de SSCP reproduzíveis e reduzindo mobilidades eletroforéticas variáveis freqüentemente detectadas na técnica convencional. A eletroforese neste sistema inclui ainda géis homogêneos de poliacrilamida pré-moldados nas concentrações 12,5 e 20% e tampões de corrida dos tipos SDS (Tricina a 0,20M; Tris a 0,20M; SDS 0,55%; pH 8,1) e Nativo (L-Alanina a 0,88M; Tris a 0,25M; pH 8,8). O emprego do tampão Nativo implica necessariamente em uma corrida prévia, antes da aplicação da amostra, para que haja uma estabilização do tampão já que este é originalmente empregado em eletroforese de proteínas.

Preparo e eletroforese das amostras

Alíquotas de 3µl dos produtos da reação de PCR são misturados em 3µl de uma solução desnaturante composta de 95% de formamida, 0,05% de azul de bromofenol e EDTA 20mM em pH 8,0. Esta proporção 1:1 de solução desnaturante/PCR pode variar de acordo com a concentração do fragmento (estimada em gel de agarose). Recomenda-se que o produto da PCR tenha uma concentração de 100ng/µl. A mistura é então desnaturada a 95°C por 5 minutos e em seguida incubada em gelo até o momento da aplicação da amostra no gel.

O método SSCP é mais sensível na detecção de alterações moleculares em fragmentos de PCR de até 350 pares de bases, a partir do qual perde-se muito em confiabilidade dos resultados obtidos. Inicialmente o exon A do gene *SRD5A2* foi amplificado num tamanho final de 369 pares de bases (ver Tabela III, pág. 44). Buscando-se aumentar a eficácia da técnica SSCP na triagem do exon A, duas estratégias foram seguidas : o exon A_{total} passou a ser amplificado em duas etapas (duas reações PCR) proporcionando fragmentos da PCR A₁ e A₂ de tamanhos ideais para a SSCP (conforme Tabela III, pág. 44). A outra alternativa foi a digestão do exon A_{total} com a enzima *Bam* HI, originando fragmentos de 225 e 144 pares de bases. A descrição da reação de digestão com a enzima *Bam* HI esta relatada no item B.6 sobre análises de digestão por enzimas de restrição.

As condições de eletroforese ideais para cada exon foram padronizadas levando-se em conta : a temperatura da corrida, o tampão, a concentração do gel e o tempo de corrida (expresso em Volts/hora). As condições consideradas ótimas para cada exon estão descritas na Tabela V.

Coloração por impregnação pelo nitrato de prata

Decorrido o tempo da corrida de eletroforese, os géis são corados pelo nitrato de prata no próprio equipamento PhastSystemTM. As etapas do processo de coloração estão descritas na tabela VI bem como a duração e temperatura de cada etapa e as soluções utilizadas.

Tabela V. Condições ideais da corrida eletroforética padronizada no equipamento de SSCP.

EXON	CONCENTRAÇÃO DO GEL	TAMPÃO	CONDIÇÕES DA CORRIDA	
			Temperatura	Tempo de corrida
A _{total} (digerido)	20%	Nativo	4°C	250Vh
A ₁	12,5%	SDS	10°C	230 Vh
A ₂	20%	Nativo	15°C	230 Vh
B	12,5%	SDS	10°C	150 Vh
	20%	Nativo	4°C	300 Vh
C	12,5%	SDS	20°C	200Vh
D	12,5%	SDS	10°C	150 Vh
	20%	Nativo	4°C	250 Vh
E	12,5%	SDS	15°C	150 Vh
	20%	Nativo	4°C	250 Vh

Outros parâmetros da corrida: Voltagem em 250V, Amperagem em 5mA e Potência em 2W.

Tabela VI. Coloração do gel pelo nitrato de prata.

ETAPA	SOLUÇÃO	TEMPERATURA	TEMPO
Fixação do gel	Etanol 10% e ácido acético 0,5%	40°C	1,5 minutos
Impregnação pelo Nitrato de prata	0,2% de nitrato de prata, etanol 10% e ácido acético 0,5%	40°C	12 minutos
Lavagem do gel (2x)	Água Milli Q	20°C	0,2 minutos
Revelação	3% de NaOH e 100µl de formaldeído (a 37%)	20°C	10 minutos
Interrupção da reação	Etanol 10% e ácido acético 0,5%	40°C	3,5 minutos
Preservação do gel	Glicerol 10%	40°C	5 minutos

4 - Clonagem Molecular

Os pacientes 2, 27 e 29 tiveram os respectivos exons B, A e D clonados e, subsequentemente, sequenciados para uma melhor definição das sequências nucleotídicas destes exons e para que fosse possível o sequenciamento alelo-específico. Para a clonagem molecular foi utilizado o kit “pMOSBlue blunt-ended cloning kit” da Amersham Pharmacia Biotech. Este kit permite a clonagem rápida e eficiente de fragmentos amplificados na PCR, sendo eles com extremidades abruptas ou coesivas e apesar de possuírem as extremidades 5’ desfosforilados. As etapas do processo de clonagem molecular dos exons A, B e D estão listadas abaixo:

Preparação do inserto

Inicialmente os fragmentos amplificados pela PCR foram purificados para a eliminação do excesso de “*primers*”, do tampão utilizado na reação de PCR e de possíveis fragmentos inespecíficos amplificados. Para obter apenas o produto da PCR, a amostra foi separada num gel de agarose 2% e visualizada no transluminador após intercalação com brometo de etídio. Logo abaixo da banda correspondente ao amplificado fez-se uma perfuração no gel de agarose, inserindo-se no local um pequeno bloco de agarose com ponto de fusão baixo (em torno de 60°C). Este gel de agarose especial, com grau de pureza elevado e denominado “*low melting*”, impede a desnaturação do DNA durante o processo de purificação do mesmo a partir do gel, o que permite e facilita a extração da banda de PCR. Prosseguiu-se à eletroforese até que o fragmento atingisse o bloco de agarose “*low melting*”, monitorando-se esta transferência com um transluminador manual, uma vez que o gel já estava corado com brometo de etídio. Em seguida, incubou-se o bloco de gel contendo a banda de PCR em 100µl de tampão TE (1x) a 65°C por 5 minutos. A purificação do DNA foi então finalizada com fenol e clorofórmio seguindo-se à precipitação com etanol absoluto e acetato de sódio 3M.

A purificação de bandas em gel de agarose também foi feita usando-se o kit : “ConcertTM rapid gel extraction system” da GibcoBRL - Life Technologies, conforme o protocolo fornecido pelo fabricante.

Após a purificação do DNA amplificado, estimou-se a concentração do produto de PCR purificado diretamente em gel de agarose. Esta quantificação foi realizada para que fosse possível calcular a quantidade de inserto a ser utilizada na reação de ligação ao vetor (plasmídio). Procurou-se manter a proporção 50ng de vetor para 125ng de inserto (ou 1:2,5 de vetor/inserto).

Os fragmentos amplificados na PCR possuem as extremidades 5’ desfosforiladas por que nos “*primers*” incorporados (e que correspondem à extremidade 5’ do DNA) esta fosforilação não existe. Para efetuar a ligação do fragmento de PCR ao vetor, a enzima DNA ligase necessita da presença dos grupamentos fosfatos na extremidade 5’ do DNA amplificado. Dessa forma, para viabilizar a etapa seguinte da clonagem (ligação do inserto ao plasmídio) foi necessário restabelecer a fosforilação do DNA. O kit utilizado para esta clonagem molecular continha todos reagentes necessários para a conversão do produto de PCR num fragmento com extremidades abruptas e fosforiladas. A reação combinada de fosforilação e “polimento” da PCR consistiu em : 125ng do inserto, 1µl de DTT a 100mM, 1µl de mix contendo a enzima Fosfoquinase, 1µl de tampão desta enzima e água destilada (q.s.p. um volume final de 10µl). Esta reação foi incubada a 22°C por 40 minutos e depois a 75°C por 10 minutos para a inativação da enzima. Imediatamente após este intervalo manteve-se a reação em banho de gelo por 2 minutos.

Ligação do inserto ao plasmídio

Todo o produto resultante da reação da fosfoquinase (volume final de 10µl) foi usado na reação de ligação do inserto ao plasmídio. Considerando-se que havia na reação de

fosfoquinase 125ng de inserto, acrescentou-se 50ng do vetor e 4 unidades de T4 DNA ligase. Esta reação foi incubada a 16°C durante toda a noite.

Transformação de células competentes

Foram utilizadas bactérias da linhagem DH5α descritas por Hanahan (1983). O protocolo para a obtenção de células DH5α competentes foi baseado segundo o descrito por Nishimura *et al.*, 1990. No estado de competência, as bactérias tornam-se aptas a adquirirem seqüências de DNA exógeno, inclusive DNA plasmidial. O processo de captura e incorporação de DNA exógeno é denominado de transformação bacteriana. A aquisição do plasmídio contendo o inserto pelas células DH5α foi desencadeada após choque térmico. Em 100μl de células DH5α competentes foi acrescentado 3μl da reação de ligação. Estas células foram mantidas em banho de gelo por 30 minutos e imediatamente após promoveu-se a transformação através de um choque térmico a exatos 43°C por 1 minuto e 30 segundos. Passado este período, retornou-se as amostras ao banho de gelo por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 ml de meio LB (meio composto de bactotripton 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1% diluídos em água destilada e com pH 7,5 ajustado com NaOH a 10N). O meio LB continha ainda o antibiótico ampicilina na concentração 50μg/ml para selecionar apenas as bactérias transformadas pois somente o plasmídio contém informação que confere a resistência a este antibiótico. As amostras foram mantidas em agitador a 200-300rpm por 1 hora e 30 minutos e a 37°C. Depois de deixar crescendo durante este período, 100μl de células supostamente transformadas foram plaqueados em placas de Petri e deixadas em estufa a 37°C durante a noite. As placas de Petri continham meio LB sólido composto por 15% de ágar bacteriológico diluídos em meio LB líquido com pH 7,5 (ajustado a com NaOH 10N) ao qual foi adicionado o antibiótico ampicilina. Antes de plaquear as células transformadas, às placas com meio LB sólido acrescentou-se 14μl de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β,D-galactosidase) na concentração 50mg/ml. O X-gal é um substrato para a

enzima β -galactosidase (β -gal) e o produto desta reação com a β -gal é um composto azulado e de fácil percepção nas colônias proliferadas na placa de Petri. A coloração branca nas colônias indica que o inserto interrompeu o gene da β -galactosidase. Este gene trata-se, portanto, de um gene-repórter e esta estratégia permite a identificação de colônias de bactérias que possuem ou não o fragmento inserido. As colônias azuis são compostas de bactérias com a β -gal ativa e, portanto, sem o fragmento clonado no plasmídio.

Purificação do plasmídio a partir de bactérias transformadas

Apenas as colônias brancas foram selecionadas para a extração do plasmídio. Uma colônia branca de cada vez foi coletada usando-se alça de platina. Esta colônia isolada foi semeada em 5ml de meio LB líquido onde permaneceu por uma noite em estufa a 37°C, para que houvesse a proliferação das bactérias. Em seguida, procedeu-se à extração dos plasmídios.

Cerca de 1,4ml do meio LB contendo as bactérias foram transferidas para tubo eppendorf de 1,5ml. Os tubos foram centrifugados a 14.000rpm por 45 segundos e o sobrenadante descartado. Adicionou-se mais 1,4ml de meio LB contendo as bactérias e repetiu-se a centrifugação (14.000rpm por 45 segundos) para descarte do sobrenadante. O “*pellet*” formado (precipitado contendo as células bacterianas) foi ressuspenso em 300 μ l da solução P₁ em um vortex até que todo o “*pellet*” estivesse homogeneizado. A solução P₁ compõe-se de Tris-HCl a 50mM (pH 8,0), EDTA a 10mM (pH 8,0) e RNase a 100 μ g/ml. Depois adicionou-se 300 μ l de solução P₂ composta de NaOH a 200mM e SDS 1%. Os tubos foram agitados gentilmente por inversão e deixados por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 300 μ l da solução P₃ (constituída de acetato de potássio 3M em pH 5,5) e os tubos foram agitados até a formação de um precipitado branco. As amostras foram

centrifugadas a 14.000rpm por 10 minutos. Cuidadosamente foram coletados de 700 a 800µl do sobrenadante o qual foi transferido para um tubo novo. Evitou-se a coleta do precipitado formado na superfície do sobrenadante. Ao sobrenadante coletado foram acrescentados 400µl de álcool isopropílico. Centrifugou-se os tubos por 14.000rpm por 10 minutos e à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 a 700µl de etanol 70%. Após cuidadosa inversão os tubos foram novamente centrifugados a 14.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e aguardou-se até que “*pellet*” estivesse seco. Finalmente os plasmídios purificados foram ressuspensos em 20µl de TE 1x. A presença do inserto foi verificada através de uma eletroforese em gel de agarose 2% e após digestões enzimáticas que excisam do plasmídio o fragmento inserido.

5 - Seqüenciamento

O seqüenciamento do DNA foi realizado para a identificação de mutações nos exons do gene *SRD5A2*. Foram seqüenciados fragmentos de PCR que apresentaram bandas de migração anômala nos géis de SSCP assim como os fragmentos de PCR que foram clonados. Alguns pacientes tiveram todos os exons seqüenciados (apresentando ou não alteração na análise por SSCP).

Para o seqüenciamento foram utilizados dois kits : “*ThermosequenaseTM Cycle Sequencing kit*” e “*ThermosequenaseTM Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing kit*”, ambos da Amersham. Os 2 kits baseiam-se no método de seqüenciamento por incorporação de nucleotídeos terminadores da reação em cadeia da polimerase. Estes didesoxinucleotídeos terminadores ou ddNTPs (ddGTP, ddATP, ddTTP e ddCTP) uma vez

incorporados na fita em síntese interrompem o processo de incorporação de outros nucleotídeos.

Independente do kit empregado, as reações foram precedidas de um pré-tratamento do produto de PCR a ser sequenciado. Neste pré-tratamento inicial cerca de 10µl de reação de PCR foram misturados com 2µl de Exonuclease I (100U/µl) e 2µl de Fosfatase Alcalina de camarão (20U/µl), sendo assim incubados a 37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos (para a inativação das enzimas). Neste tratamento são eliminados DNA em fitas simples (“*primers*”, fragmentos inespecíficos) e nucleotídeos não incorporados durante a reação de PCR. Outra característica em comum é que a reação de seqüenciamento para os dois kits consistiu de 40 ciclos cada qual com uma etapa de desnaturação a 95°C por 30 segundos, uma etapa de anelamento dos “*primers*” por 30 segundos (a temperatura de anelamento é correspondente ao “*primer*” utilizado) e uma etapa de extensão a 72°C por 1 minuto. Para evitar evaporações durante esta reação, uma gota de óleo foi adicionada em cada tubo. No final, 4 µl de “*stop solution*” foram adicionados para interromper a reação. Antes da aplicação no gel de seqüenciamento as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e apenas 3µl de cada tubo foram aplicadas no gel de seqüenciamento e submetidas a uma corrida eletroforética nas condições de 1700V, 50W e 20mA. O tempo de corrida foi estipulado de acordo com o tamanho do fragmento que estava sendo sequenciado.

O protocolo utilizado para o kit “*ThermosequenaseTM Cycle Sequencing kit*” (seguindo indicações do fabricante, porém com padronizações específicas para cada fragmento amplificado) é descrito a seguir.

Marcação radioativa dos “primers” (sense e anti-sense) com [γ -³²P]-dATP

A reação de marcação de cada “*primer*” foi realizada da seguinte maneira : em um tubo eppendorff adicionou-se 3µl de água Milli Q estéril, 0,6µl de tampão 10x específico da

enzima, 0,5µl do “*primer*” (*sense* ou *anti-sense*) a 20pmol, 1µl de [γ - ^{32} P]-dATP e 1µl de T4 Polinucleotídeo Quinase (10 U/µl). Esta reação foi incubada a 37°C por 15 minutos e a 95°C por 5 minutos (para inativação da enzima). A enzima T4 Polinucleotídeo Quinase catalisa a transferência do fosfato gama do ATP para extremidades 5’ dos “*primers*”. No caso desta reação, a enzima transfere o fosfato gama do ATP marcado com ^{32} P.

Reação de seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada em dois tubos diferentes; isto é, uma reação de seqüenciamento para cada um dos “*primers*” marcados. Dos 14µl totais de PCR pré-tratado, 7µl foram utilizados neste kit : metade para a reação com o “*primer*” *sense* e a outra metade para a reação com o “*primer*” *anti-sense*. A estes 3,5µl de PCR pré-tratados foram adicionados 9µl de água Milli Q estéril, 1µl de “*primer*” marcado previamente com [γ - ^{32} P]-dATP, 2µl da enzima *Thermosequenase* (4 U/µl) e 2µl de tampão 10x para a enzima. A partir do volume final de 17,5µl da mistura distribuiu-se 4µl em 4 tubos contendo 2,5µl de cada ddNTPs. Uma gota de óleo foi adicionada e os tubos foram submetidos aos 40 ciclos da reação de seqüenciamento. Após a reação, 4µl de “*stop solution*” foram adicionados para interromper a reação.

Gel de seqüenciamento

Para o seqüenciamento foram utilizados géis de poliacrilamida a 6% com a seguinte composição : 28,5g de acrilamida, 1,5g de bisacrilamida, 50ml de tampão TBE 10x; 240g de uréia; e água destilada (em q.s.p. um volume final de 500ml). A polimerização do gel foi desencadeada após serem adicionados na mistura 800µl de persulfato de amônio 10% e 40µl de TEMED. Esta solução foi vertida num aparato montado entre duas placas de vidro (com as dimensões 60cmx24cm e 55cmx21cm) emparelhadas, tendo entre elas espaçadores com gradiente de espessura. As placas foram previamente lavadas com detergente, acetona e

etanol absoluto. Para facilitar a separação das placas ao término da corrida, cada uma delas foi devidamente tratada. Na placa maior foram distribuídos 5ml de uma substância repelente à base de silicone (“Repel-Silane”). A placa menor foi tratada com uma mistura contendo 2,5ml de etanol absoluto, 87,5µl de ácido acético e 17µl de “Bind-Silane”. Este composto, ao contrário do anterior, promove a aderência do gel na placa. Antes da aplicação das amostras, realizou-se uma pré-corrida em tampão TBE 1x para um aquecimento prévio do gel. Após o tempo necessário da corrida de eletroforese todo o sistema é desmontado, separando-se as placas. O gel aderido à placa menor é fixado em uma mistura de metanol 10% e ácido acético 10% por 15 minutos. Em seguida a placa (com o gel aderido) é lavada em água corrente e mantida em estufa durante a noite a 42°C para secagem. O gel é exposto à um filme sensível (Kodak Biomax) por aproximadamente 3 dias à temperatura ambiente.

O kit “*Thermosequenase*TM Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing kit” distingue-se do kit anterior por que neste caso são utilizados didesoxinucleotídeos 5'-trifosfato (ddNTPs) que além de serem terminadores da reação estão marcados radioativamente com α -³³P. Não há portanto uma marcação prévia dos “*primers*”. As etapas seguintes, conforme o protocolo do kit, estão descritas abaixo.

Reação de seqüenciamento com [α -³³P]-ddNTPs

Os 14µl de PCR pré-tratados foram divididos em dois tubos, um para a reação com o “*primer*” *sense* e outro para a reação com o “*primer*” *anti-sense*. Em cada tubo são adicionados 8,0µl de água MilliQ estéril, 1µl de “*primer*” (*sense* ou *anti-sense*, na concentração 2 pmol), 2µl da enzima *Thermosequenase* (4U/µl) e 2µl de tampão 10X da enzima, totalizando 20µl. Desta mistura são retiradas alíquotas de 4,5µl e adicionadas

em quatro tubos, cada um deles contendo 2 μ l de um mix de dNTPs normais (7,5 μ M/ μ l) e 0,5 μ l (0,3 μ M/ μ l) de cada um dos ddNTPs marcados com α -³³P. Adicionou-se uma gota de óleo em cada tubo para evitar evaporações. A reação de seqüenciamento consistiu de 40 ciclos nas condições especificadas anteriormente. Ao final, 4 μ l de “*stop solution*” foram colocados para interromper a reação.

Gel de seqüenciamento

O gel utilizado é de poliacrilamida a 6%, composto por 9ml de solução estoque de acrilamida a 40% contendo 3% de bisacrilamida, 6ml de tampão TBE 10X, 25,2g de uréia e água destilada para um volume final de 60ml. Para a polimerização, é adicionado 800 μ l de persulfato de amônio 10% e 40 μ l de TEMED. A solução foi vertida num aparato montado entre duas placas de vidro (com as dimensões 42cmx33,5cm e 39,5cmx33,5cm) emparelhadas e tendo entre elas espaçadores sem gradiente de espessura. As placas foram previamente lavadas com detergente, acetona e etanol absoluto e somente a placa maior sofreu um tratamento com 5ml de “Repel-Silane”. Uma pré-corrida foi realizada antes da aplicação das amostras e decorrido o tempo necessário da corrida de eletroforese as placas foram desmontadas. Em função do “Repel-Silane” a placa maior separou-se sem dificuldades do gel o qual permaneceu na placa menor (apesar desta não conter “Bind-Silane”). Da placa menor o gel foi transferido para um papel de filtro nas mesmas dimensões da placa. O papel de filtro é lançado sobre o gel na placa. A porosidade deste papel e sua qualidade de absorvente por capilaridade promovem a aderência do gel ao papel. Esta transferência apenas é possível por que a placa pequena não contém o “Bind-Silane”. Em seguida o papel foi envolto em filme de PVC para embalagem e deixou-se secando por 1 hora a 80° C num ambiente a vácuo. Após a secagem do papel, este é exposto à um filme sensível (Kodak Biomax) durante a noite à -70°C e com intensificador.

6 - Análise de digestão por enzimas de restrição

Digestões enzimáticas foram realizadas em 5 ocasiões : para a definição de polimorfismo no exon A (enzima *Rsa* I), para a confirmação de mutações pontuais (enzima *Dde* I), para aumentar a eficiência de triagem no SSCP (enzima *Bam*H I) e para a excisão dos fragmentos clonados nos plasmídios (enzimas *Eco*R I e *Hind* III).

De maneira geral as digestões enzimáticas foram realizadas em reações contendo a enzima de restrição, o tampão de enzima e água desionizada em quantidade suficiente para o volume final desejado para a reação. A temperatura e duração de cada reação também foram específicos para cada enzima, isto é, nas condições ótimas de atividade da enzima em questão. Na Tabela VII estão representadas as enzimas e respectivas condições das reações de digestão realizadas neste trabalho.

Tabela VII. Digestões por enzimas de restrição.

ENZIMA ¹	FINALIDADE	CONDIÇÕES DA REAÇÃO ENZIMÁTICA				
		[] DNA	[] ENZIMA	TAMPÃO ³	° C	DURAÇÃO
<i>Rsa</i> I	Definir o polimorfismo Valina e/ou Leucina no códon 89 do exon A.	1µg PCR ²	1U/µg de DNA	REACT 1	37	4 horas
<i>Dde</i> I	Confirmação da mutação pontual Gly196Ser no exon D.	1µg PCR ²		REACT 2	37	2 horas
<i>Bam</i> H I	Digestão do exon A _{total} para aumentar a eficiência no SSCP.	1µg PCR ²		REACT 3	37	2 horas
<i>Eco</i> R I e <i>Hind</i> III	Excisão dos fragmentos de PCR inseridos no plasmídio pMOSBlue.	1µg de plasmídio ²		REACT 2	37	2 horas

1. Enzimas da Amersham Life Science, Inc.

2. Quantidade (em µl) suficiente para que fosse possível a visualização dos produtos digeridos em gel de agarose 1%.

3. Linha de tampões "Gibco BRL React[®] Buffer" da Life Technologies.

V - RESULTADOS

1 - Mutações Detectadas

1.1 - Reação em Cadeia da Polimerase

Todos os 5 exons do gene *SRD5A2* foram amplificados pela PCR e de acordo com o tamanho previsto para cada um deles, conforme descrito na tabela II. A Figura 5 mostra a amplificação dos exons A_{total} , A_1 , A_2 , B, C, D e E testados numa corrida de eletroforese em gel de agarose 1%.

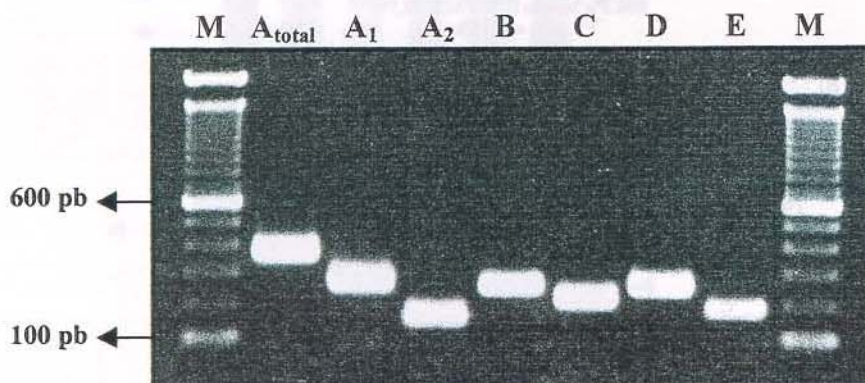


Figura 5. Exons A a E do gene *SRD5A2* amplificados na reação PCR. O exon A foi amplificado na sua totalidade (A_{total}) ou em dois fragmentos (A_1 e A_2). (M- marcador de peso molecular de 100pb-Gibco BRL®).

1.2 - Análise por SSCP e Seqüenciamento

Pela análise por SSCP foram identificados padrões anormais de migração das bandas em eletroforese os quais foram seqüenciados. Desta forma, identificou-se 4 mutações de ponto nos pacientes 1, 2 e 4 (exons D, B e A, respectivamente).

A Figura 6 ilustra o caso do paciente nº 1 que possui identificação psicossocial feminina e é filho de primos em 3º grau. O resultado da análise SSCP (Figura 6a) apresentou um padrão de eletroforese anormal para o exon D. O seqüenciamento deste exon revelou uma mutação pontual (transição G→A) no códon 196 em homozigose (Figura 6b), com substituição do aminoácido Glicina para Serina (mutação Gly196Ser). Esta mutação cria um sítio para a enzima de restrição *Dde* I. O padrão de digestão do exon D por esta enzima confirmou a mutação Gly196Ser.

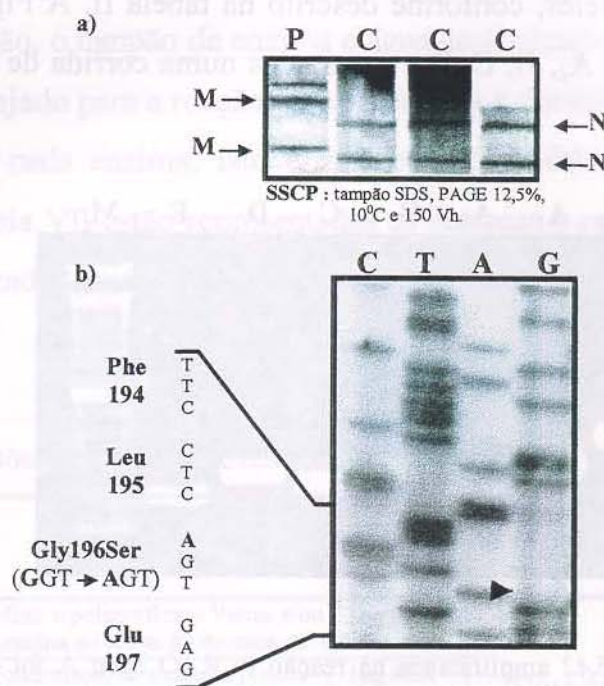


Figura 6. Mutação Gly196Ser em homozigose no exon D do paciente 1. Em a) padrão anormal de migração do exon D no SSCP e em b) seqüenciamento (seta mostrando a transição G→A). (P- paciente; C- controle normal; N- normal; M- mutante).

Estendendo-se a análise por digestão pela enzima *Dde* I foi possível constatar a presença ou a ausência dos alelos mutantes nos pais e irmãos do afetado (Figura 7a). A análise por SSCP (Figura 7b) e por digestão com a enzima de restrição (Figura 7c) de todos

os membros da família revelaram que ambos os pais são, de fato, heterozigotos para a mutação, assim como o irmão mais velho. A irmã é homozigota para o alelo mutante e o irmão mais novo é homozigoto para o alelo normal. Com exceção do afetado, todos os membros da família são assintomáticos. A irmã é pré-púbere, razão pela qual a expressão fenotípica da deficiência em 5 α -redutase 2 ainda não se manifestou nela.

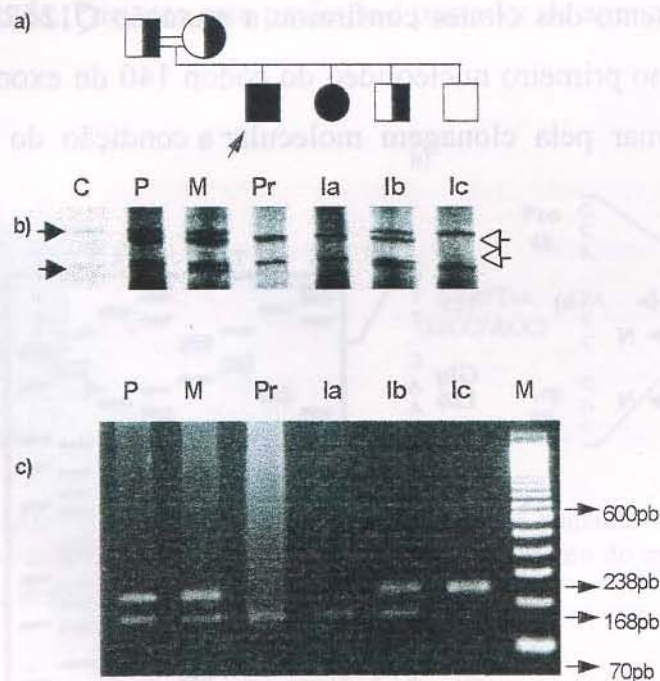


Figura 2. a) heredograma parcial da família do paciente no.1, b) análise SSCP e c) resultados da digestão com *Dde I*

C- controle P-Pai M-Mãe Pr-Propósito

Ia, Ib, Ic -irmãos fenotipicamente normais

M - marcador de peso molecular (Gibco-Brl)

Figura 7. Em a) heredograma parcial da família do paciente nº 1, em b) análise SSCP (as setas cheias representam as bandas normais e as setas vazias representam as bandas mutantes) e c) resultados da digestão com *Dde I*. (C-controle; P-pai do afetado; M-mãe do afetado; Pr-propósito; Ia, Ib, Ic-irmãos fenotipicamente normais; M-marcador de peso molecular Gibco-Brl).

O paciente nº 2 é um heterozigoto composto. O resultado de SSCP preliminar ressaltou um padrão de migração anormal no exon B do paciente (Figura 8a). O seqüenciamento direto do produto da PCR revelou uma transição A→G em heterozigose no códon 126 que leva à substituição do aminoácido Glutamina para Arginina (Gln126Arg). Revelou também regiões borradas e pouco nítidas que correspondiam às seqüências nucleotídicas “downstream” ao códon 140 sugerindo a existência de deleção ou inserção de nucleotídeos. Para verificar esta suposição, realizou-se a clonagem molecular do exon B deste paciente. O seqüenciamento dos clones confirmou a mutação Q126R e identificou a deleção de timina (418delT) no primeiro nucleotídeo do códon 140 do exon B (Figura 8b). Também foi possível confirmar pela clonagem molecular a condição do paciente como

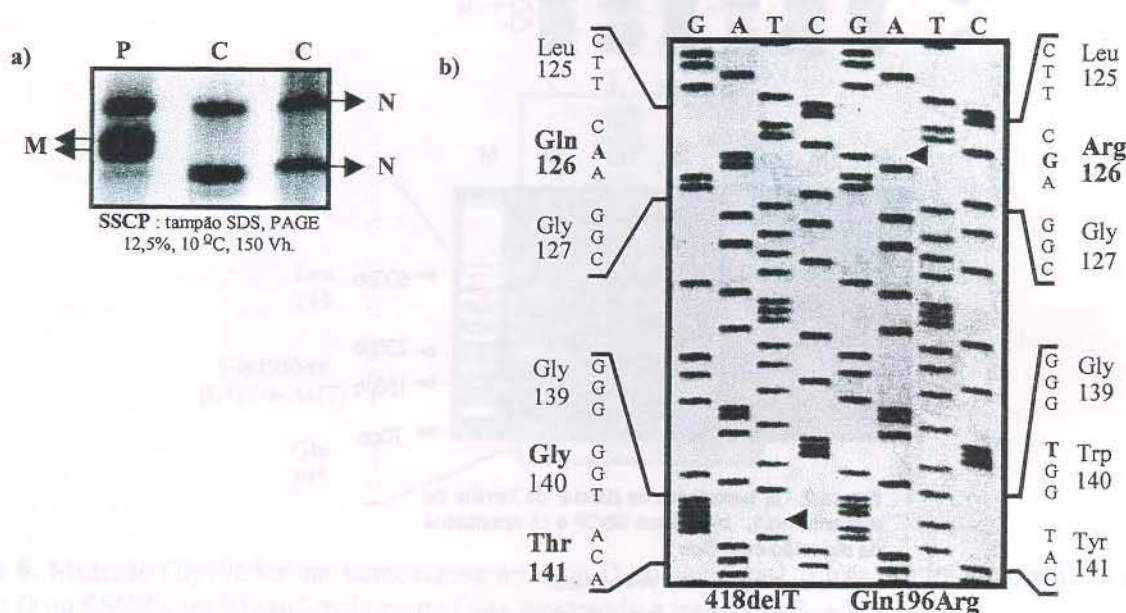


Figura 8. Mutação Gln126Arg e 418delT no paciente 2. Em a) a análise por SSCP e o padrão anormal de eletroforese para o exon B do paciente 2 (P) quando comparado com controles normais (N). Estão indicadas as condições de corrida e as bandas normais (N) e anômalas (M). Em b) seqüenciamento de dois clones do exon 2 mostrando que o paciente é um heterozigoto composto portador das mutações Glu126Arg e 418delT. As setas indicam a deleção do nucleotídeo timina no códon 140 e a transição A→G no códon 126.

heterozigoto composto : as mutações Q126R e 418delT estão localizadas em alelos diferentes, embora estejam no mesmo exon.

No paciente nº 4 a análise por SSCP detectou um padrão de migração anormal apenas no exon A. O seqüenciamento deste exon identificou uma mutação (transição G→A) em heterozigose que leva à substituição do aminoácido Alanina para Treonina no códon 49 (mutação Ala49Tre) (Figura 9). Todos os outros exons foram seqüenciados e nenhuma outra mutação foi detectada. Portanto este paciente é portador de apenas um alelo mutante.

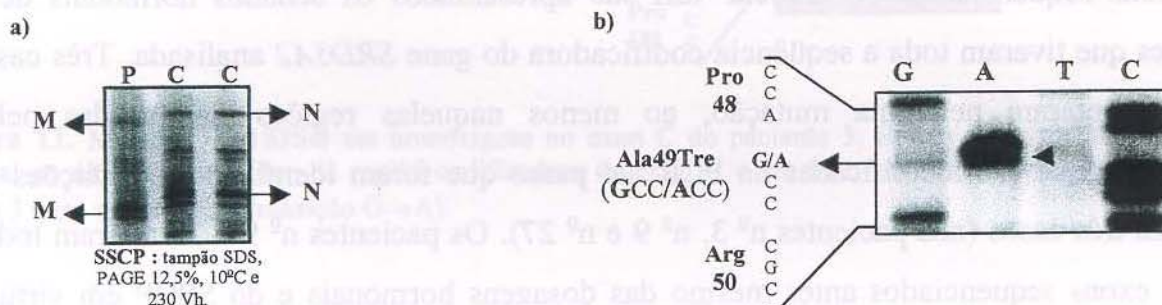


Figura 9. Mutação Ala49Trp em heterozigose no exon A do paciente 4. Em a) análise SSCP indicando padrão de eletroforese anormal para o exon A. Em b) seqüenciamento do mesmo exon e a mutação Ala49Tre em heterozigose (seta mostrando a transição G→A).

Contudo, nem todo padrão anômalo no SSCP correspondeu a alterações na seqüência nucleotídica; isto é, em algumas situações obteve-se padrões de migração que não correspondiam aos padrões de migração dos controles normais, apesar de não haver qualquer mutação (Figura 10).

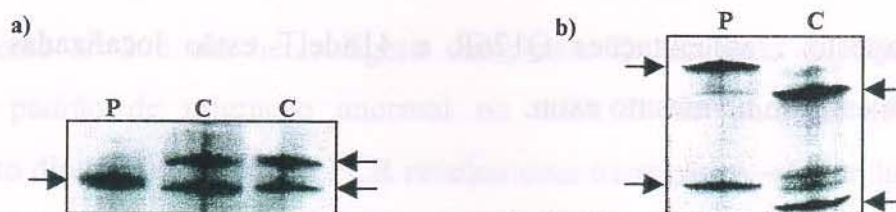


Figura 10. Alguns dos falsos-positivos detectados neste trabalho na análise por SSCP. Apesar dos padrões anormais de migração de bandas, não foram identificadas alterações moleculares nas seqüências nucleotídicas. As figuras ilustram o padrão de migração dos pacientes (P) e de indivíduos controles normais (C). Em a) padrão de migração do exon B do paciente nº 24 e em b) o padrão de migração do exon E do paciente nº 21.

Alguns pacientes que não apresentaram anormalidades no SSCP tiveram todos os seus exons seqüenciados. Na Tabela VIII são apresentados os achados hormonais de 6 pacientes que tiveram toda a seqüência codificadora do gene *SRD5A2* analisada. Três casos não apresentaram nenhuma mutação, ao menos naquelas regiões flanqueadas pelos “primers” e que são amplificadas na PCR, ao passo que foram identificadas mutações de ponto em três casos (nos pacientes nº 3, nº 9 e nº 27). Os pacientes nº 9 e 27 tiveram todos os seus exons seqüenciados antes mesmo das dosagens hormonais e do SSCP em virtude dos sinais clínicos sugestivos de deficiência em 5 α -redutase tipo 2.

Tabela VIII. Pacientes, com evidências clínicas e/ou laboratoriais de deficiência em 5 α -redutase, que tiveram todos os exons do gene *SRD5A2* seqüenciados. (dados foram fornecidos pelo GIEDDS).

PACIENTE	IDADE	LH (μ Ui/ml)	FSH (μ Ui/ml)	T pré/pós (ng/ml)	DHT (pg/ml)	T/DHT
Nº 3	pós-púbere	9,6	10,1	-/3,7	35,2	105
Nº 6	pré-púbere	4,9	4,4	4,1/-	-	51,2
Nº 8	pré-púbere	2,3	3,9	0,8/2,6	36,5	86,6
Nº 9	púbere	-	-	-/-	-	65*
Nº 27	pré-púbere	-	-	-/-	-	11*
Nº 29	pré-púbere	3,3	4,5	1,9/-	<25	95
NORMAL	pós-púbere	0,9-10,6	2,2-17,7	3,0/10,0	90-720	12 $\pm$ 4
	pré-púbere	0,1-1,0	0,5-3,3	0,1/0,2	10-70	

* resultado posterior ao seqüenciamento.

No paciente nº 3 detectou-se uma mutação (transição G→A) em homozigose no último nucleotídeo do códon 183 no exon C (Figura 11a). Tal mutação promove a substituição do aminoácido conservado Glicina para Serina (Figura 11b).

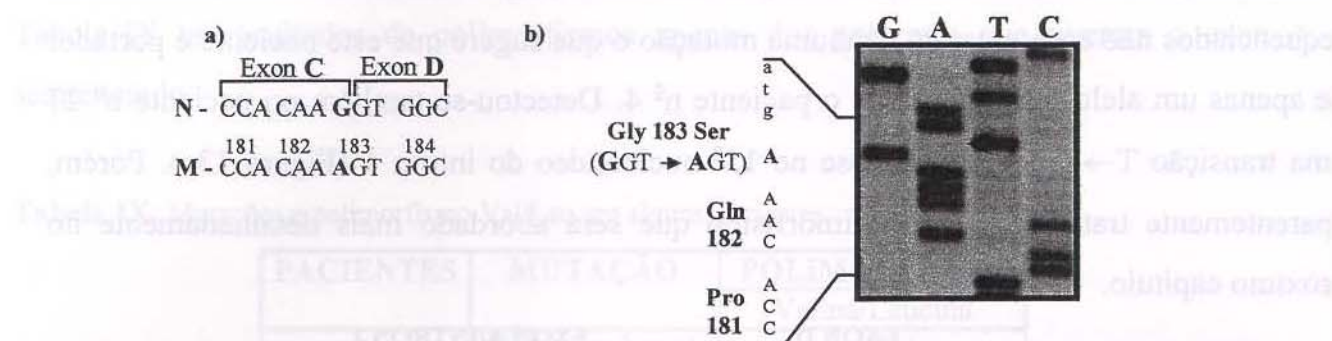


Figura 11. Mutação Gly183Ser em homozigose no exon C do paciente 3. Em a) a posição da mutação pontual no último nucleotídeo da região codificadora do exon C e em b) o seqüenciamento do exon C e intron 3 (seta mostrando a transição G→A).

No paciente nº 9 foi detectada uma transição C→T em homozigose no códon 246 do exon E (Figura 12). Esta conduz à substituição do aminoácido conservado Arginina para Triptofano.

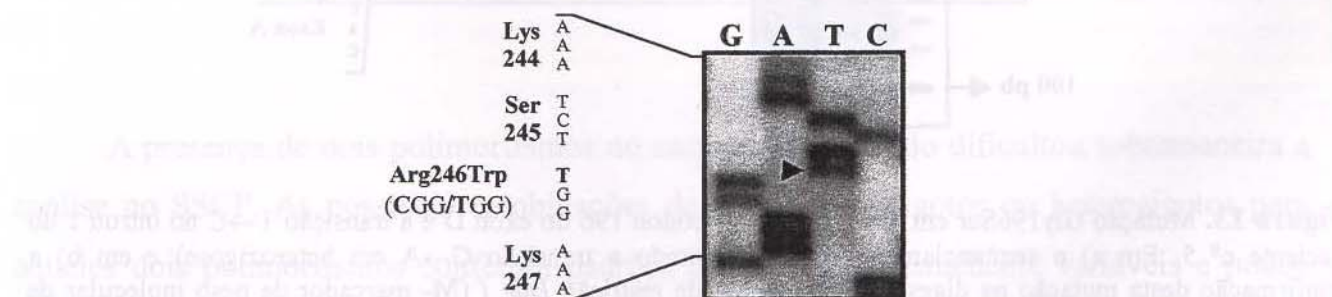


Figura 12. Mutação Arg246Trp em homozigose no exon E do paciente nº 9. A seta indica a transição C→T no códon 246.

No paciente nº 27 detectou-se a mutação Gly196Ser no exon D (a mesma do paciente nº 1) porém em heterozigose (Figura 13a). Em seguida, o SSCP foi realizado e foi obtido um padrão anormal de migração semelhante ao encontrado no paciente nº 1 (resultado não mostrado). Por meio da digestão do exon D com a enzima *Dde* I pôde-se confirmar a mutação Gly196Ser em heterozigose no paciente nº 27 (Figura 13b). Todos os outros exons sequenciados não apresentaram nenhuma mutação o que sugere que este paciente é portador de apenas um alelo mutante, como o paciente nº 4. Detectou-se também no paciente nº 27 uma transição T→C em homozigose no 15º nucleotídeo do intron 1 (Figura 13c). Porém, aparentemente trata-se de um polimorfismo que será abordado mais detalhadamente no próximo capítulo.

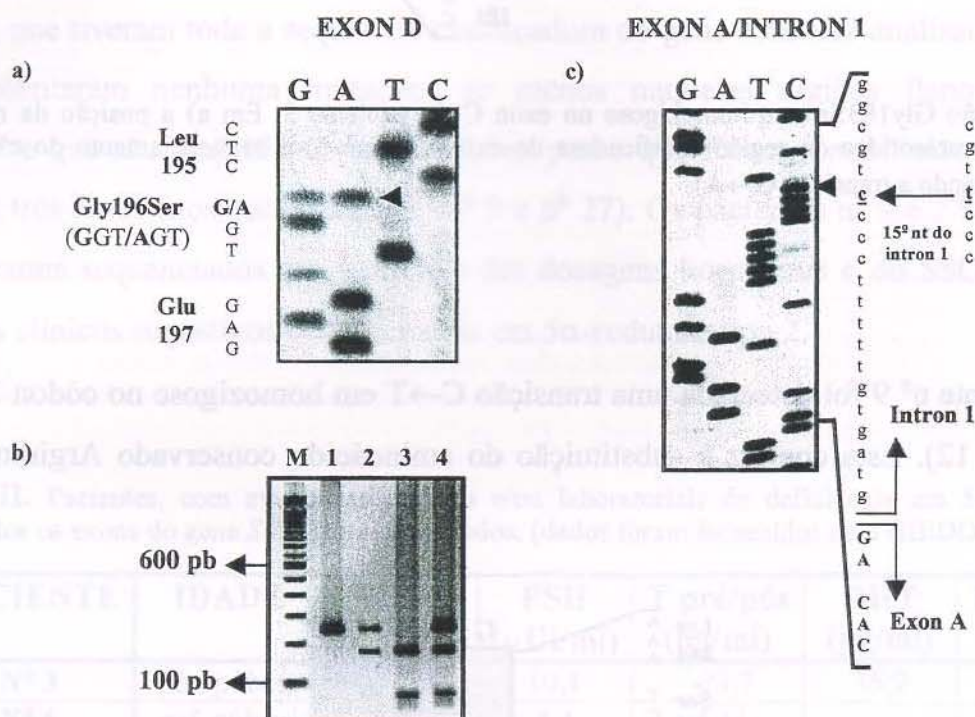


Figura 13. Mutação Gly196Ser em heterozigose no códon 196 do exon D e a transição T→C no intron 1 do paciente nº 5. Em a) o seqüenciamento (seta mostrando a transição G→A em heterozigose) e em b) a confirmação desta mutação na digestão pela enzima de restrição *Dde* I (M- marcador de peso molecular de 100pb; 1- paciente nº 5 não digerido; 2- heterozigoto para o alelo mutante; 3- homozigoto para o alelo mutante e 4- paciente nº 5 digerido). Em c) Seqüenciamento da junção exon A/intron 1 do paciente nº 5 mostrando o polimorfismo C/T (seta indica a transição T→C) no 15º nucleotídeo a partir do dinucleotídeo GT do sítio aceptor de splicing do intron 1.

2 - Análise do Polimorfismo Valina/Leucina no Gene *SRD5A2*

A partir do fragmento amplificado do exon A total foi possível o estudo dos polimorfismos Valina/Leucina no códon 89. Definiu-se o polimorfismo ou por sequenciamento direto ou por meio da digestão com a enzima *Rsa* I. Estão indicados na Tabela IX os resultados de polimorfismos apenas dos pacientes que tiveram o exon A sequenciado.

Tabela IX. Mutações e polimorfismo Val/Leu em alguns pacientes.

PACIENTES	MUTAÇÃO	POLIMORFISMO
		Valina/Leucina
1	Gly196Ser (homo)	Val/Val
2	Gln126Arg/418delT	Leu/Leu
4	Ala49Tre (hetero)	Val/Val
5	-	Val/Leu
8	-	Val/Val
9	Arg246Trp (homo)	Val/Val
10	-	Val/Val
11	-	Val/Val
13	-	Val/Val
17	-	Val/Val
21	-	Val/Val
22	-	Val/Val
23	-	Val/Val
24	-	Val/Val
26	-	Leu/Leu
27	Gly196Ser (hetero)	Val/Val
29	-	Val/Val
30	-	Val/Leu

A presença de dois polimorfismos no exon A amplificado dificultou sobremaneira a análise no SSCP. As possíveis combinações de alelos homozigotos ou heterozigotos para aqueles dois polimorfismos conferem padrões de bandas extremamente variáveis e pouco informativos (Figura 14a). A análise do polimorfismo Val/Leu no códon 89 foi realizado a partir da digestão do exon A₂ pela enzima *Rsa* I. O exon A₂, com 151 pares de bases, possui

um sítio de restrição para esta enzima, originando fragmentos de 75 e 76 pb. A variação G/C no códon 89 cria um segundo sítio de restrição : alelo GTA (Valina) possui dois sítios de restrição enquanto o alelo CTA (Leucina) permanece com apenas um sítio (Figura 14b). A digestão do alelo CTA resulta nos fragmentos de 76 e 75 pb. No alelo GTA, o fragmento de 75 é digerido em fragmentos de 21 e 54 pb. Em gel de poliacrilamida, é possível identificar homozigotos CTA mas não é possível fazer a distinção entre homozigotos GTA e heterozigotos GTA/CTA por que o que distingue estes dois alelos são os fragmentos de 75 e 76 pb. A distinção destes dois fragmentos não foi visível em gel de poliacrilamida. A definição do polimorfismo GTA/CTA pela enzima *Rsa* I em alguns pacientes está ilustrada na Figura 14c.

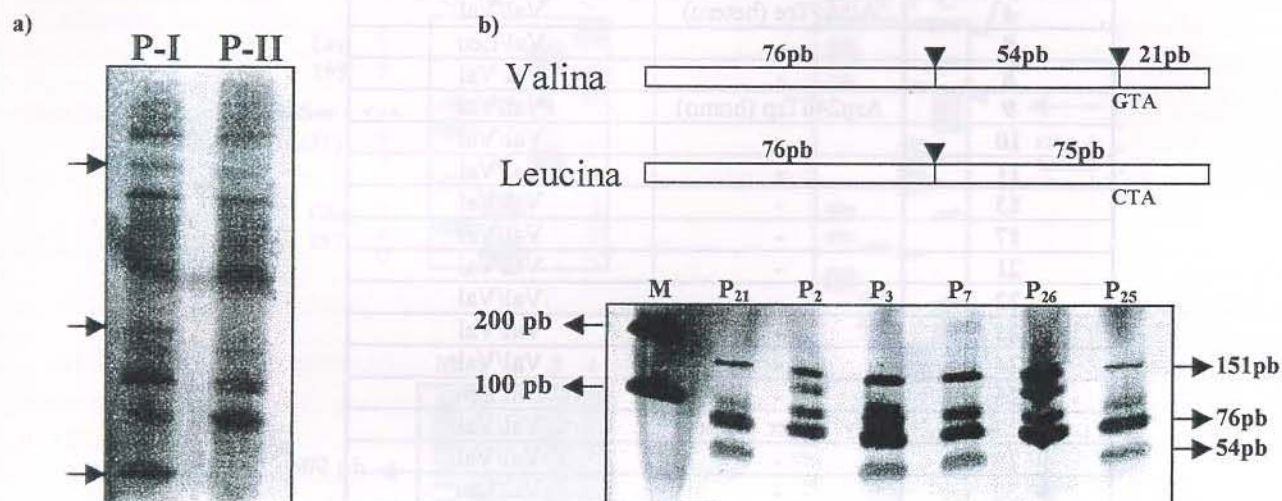


Figura 14. Em a) a diversidade de bandas (setas) obtidas no SSCP do exon A_{total} (padrões de migração P-I e P-II). Em b) o esquema da digestão do exon A₂ (151pb) pela enzima *Rsa* I (sítio de restrição indicados por setas), conforme o polimorfismo (valina ou leucina) e em c) análise da digestão em gel de poliacrilamida 20%, mostrando indivíduos homozigotos para o alelo Leucina (paciente nº 2 e paciente nº 26). Os demais pacientes relacionados são homozigotos para o alelo Valina ou heterozigotos (Val/Leu). (M: marcador de peso molecular)

VI - DISCUSSÃO

1 - Mutações no Gene *SRD5A2*

1.1 - Mutações descritas

Já foram descritas mais de 30 mutações diferentes no gene *SRD5A2* levando a falha enzimática e, conseqüentemente, ambigüidade genital. As alterações moleculares variam desde mutações pontuais (transições, transversões e pequenas deleções de nucleotídeos) até o relato de uma grande deleção envolvendo todo o gene *SRD5A2*. Algumas mutações exibem recorrência em grupos étnicos e geográficos distintos, constituindo, portanto, *hot spots* no gene. Em outras situações, a recorrência elevada de uma mesma mutação num mesmo grupo étnico é considerada derivada de um mesmo ancestral comum, definindo assim um efeito de fundador.

Alguns afetados com quadro clínico e laboratorial sugestivo de deficiência de 5 α -redutase tipo 2 não apresentam quaisquer alterações nas regiões codificantes ou, se as possuem, estas estão restritas a apenas um dos alelos (indivíduos heterozigotos). A deficiência nestes indivíduos pode ser explicada se considerarmos mutações em regiões de introns que, dependendo da amplitude da PCR, não são amplificadas e escapam de qualquer análise por seqüenciamento (Thigpen *et al.*, 1992). Apesar destas mutações estarem localizadas em regiões não traduzidas do gene, que não farão parte da proteína madura, estas alterações podem estar comprometendo a expressão correta do gene ou o processamento do pré-RNA mensageiro.

As mutações no gene *SRD5A2* podem levar ou a uma inativação total ou apenas a uma falha enzimática (proteína mutante com alguma atividade residual). A inativação total não é necessariamente causada por um *turnover* mais rápido da proteína mutante, pois não há relação direta entre a meia vida da proteína e sua atividade enzimática (Wigley *et al.*, 1994). As razões pelas quais as alterações moleculares conduzem à esta inativação enzimática são diversas. Algumas mutações depreciam a expressão e a tradução correta do gene. Dentre estas mutações estão aquelas que afetam o mecanismo de *splicing* e as deleções.

As mutações que afetam o mecanismo de *splicing* assim o fazem ou por abolir sítios de *splicing* normais ou por criar sítios alternativos. Em ambos os casos, o RNA mensageiro maduro não é corretamente processado e a proteína traduzida pode estar truncada ou apresentar aminoácidos adicionais. As grandes deleções (envolvendo todo o gene) quando em homozigose conduzem a nulissomia do gene e total ausência de expressão da proteína. As pequenas deleções que alteram o quadro de leitura têm, como consequência, a substituição de aminoácidos a partir do ponto de mutação e o surgimento de eventuais sítios de parada prematuros que conduzem à expressão de uma proteína truncada. Mutações do tipo *missense* também podem inativar completamente a enzima. Nestes casos, as substituições envolvem aminoácidos altamente conservados, bioquimicamente distintos (hidrofóbicos/hidrofílicos, polar/apolar, ácido/básico,) ou resíduos fundamentais para o funcionamento da enzima (Wigley *et al.*, 1994).

Outras mutações resultam em falha na atividade enzimática e alteram o pH ótimo de atividade da enzima, modificando ou a afinidade de ligação da enzima ao cofator NADPH ou ao substrato (hormônio testosterona). Neste caso, a troca de aminoácido altera a conformação da enzima de maneira que a necessidade de um ambiente ácido é reduzida. Segundo Thigpen *et al.* (1992), a isoenzima tipo 2 deve estar localizada em estruturas

subcelulares ácidas (frações microssomais) cujo pH ácido talvez seja um requerimento para a sua ativação. Esses mesmos autores constataram pH ótimos mais básicos nas proteínas com as substituições Gly196Ser e Gly34Arg. Enquanto na situação normal o pH da isoenzima 2 é 5, a substituição Gly196Ser eleva este valor para pH 5,5 e a Gly34Arg eleva mais ainda o pH para valores entre 5 e 6. A variação, de fato, é mínima, mas parece ser significativa : a mutação Gly34Arg afeta mais gravemente a enzima (reduz a atividade para 1,7%) e o quadro clínico nos portadores desta mutação também é mais grave (indivíduos fenotipicamente femininos com pouca virilização na puberdade). A substituição Gly196Ser reduz a atividade da enzima para 8,3% e os afetados possuem um fenótipo mais brando, predominantemente masculino. As diferenças no quadro clínico não são atribuídas somente ao pH de atividade alterado, pois estas mutações afetam domínios diferentes na enzima : a substituição Gly34Arg afeta a afinidade de ligação ao hormônio T e a substituição Gly196Ser afeta a afinidade de ligação ao cofator (Thigpen *et al.*, 1992; Wigley *et al.*, 1994).

As substituições de aminoácidos que afetam o domínio de ligação à T estão localizadas na extremidade da proteína, sugerindo que esse domínio não é composto por determinantes lineares. Ou seja, faz supor que a enzima ativa deve apresentar-se numa configuração não linear, assumindo uma conformação tridimensional fruto da interação entre as extremidades amino- e carboxi-terminal para formar o domínio de ligação ao substrato T. Na extremidade amino-terminal, a região crítica parece estar compreendida entre os resíduos 21 a 34, tal como evidenciado por estudos realizados com inibidores competitivos da testosterona (Russell *et al.*, 1994). Na extremidade carboxi-terminal os resíduos 230 a 232 parecem ser importantes para o processo catalítico. É surpreendente notar que substituições em aminoácidos adjacentes afetam diferentemente a atividade enzimática : enzimas com a mutação no resíduo 231 apresentam afinidade diminuída a T mas mantém alguma atividade residual e enzimas com mutação no resíduo 230 são

totalmente inativas (Russell *et al.*, 1994).

As mutações que depreciam a ligação ao cofator estão distribuídas basicamente na extremidade carboxi-terminal. A sequência consenso de ligação da isoenzima tipo 2 ao cofator NADPH não tem qualquer homologia com as sequências de outras enzimas redutases. Segundo Wigley *et al.* (1994), os resíduos atribuídos à sequência de ligação ao cofator provavelmente definem uma nova classe de domínios de ligação ao NADPH. A dissolução do domínio de ligação ao NADPH resulta também num decréscimo na meia vida da proteína. Isto sugere que o cofator é fundamental na estabilidade da proteína e manutenção da atividade enzimática. Essa ligação parece estabilizar a enzima dentro das células e a concentração intracelular daquele cofator deve regular o *turnover* da enzima (Russell *et al.*, 1994; Russell e Wilson, 1994; Wigley *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 1995 e Vilchis *et al.*, 1997a).

Dentre as mutações pontuais, as mutações do tipo “*missense*” detectadas alteram aminoácidos altamente conservados na enzima 5 α -redutase, tanto de origem humana quanto de rato e de macaco (Levy *et al.*, 1995). Por esta razão não se pode dizer que a deficiência é causada por polimorfismos aleatórios no gene *SRD5A2* mas que, ao contrário, estas mutações afetam regiões fundamentais para a atividade enzimática normal da 5 α -redutase (Thigpen *et al.*, 1992). No entanto, há que se discutir as reais implicações de alguns polimorfismos na atividade enzimática. Sobretudo naqueles polimorfismos que, apesar de serem considerados normais na população em geral, ainda não tiveram uma caracterização bioquímica *in vitro* que definisse as suas conseqüências na atividade final da enzima. Esta questão será abordada no tópico seguinte sobre polimorfismos no gene *SRD5A2* e com a descrição das alterações moleculares detectadas no paciente nº 27.

1.2 - Mutações detectadas

As mutações detectadas neste trabalho são mutações do tipo “missense”, em sua maioria já descritas na literatura, que conduzem à substituição de aminoácidos em regiões conservadas na enzima 5 α -redutase tipo 2, sugerindo que esses resíduos são importantes para a atividade da enzima. Também foi detectada uma deleção nunca antes descrita na literatura. Três pacientes são homozigotos para as mutações detectadas e três são heterozigotos, sendo que em apenas um destes foram identificadas duas mutações em configuração *trans* (heterozigoto composto). A Figura 15 resume as mutações encontradas neste trabalho e a seguir são discutidos os achados relativos a cada paciente, levando-se em conta as características bioquímicas da enzima mutante e analisando a ocorrência destas alterações nos casos descritos na literatura pertinente.

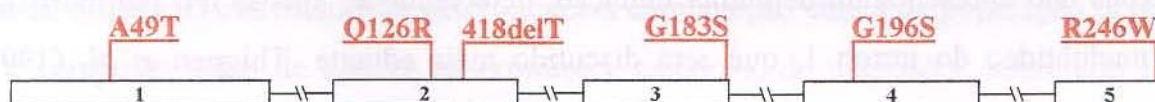


Figura 15. Mutações detectadas neste trabalho.

Mutação Gly196Ser

O paciente nº 1 é portador da mutação que conduz à substituição de Glicina por Serina na posição 196 do exon 4 da enzima. Este paciente é um indivíduo com 16 anos de idade, criado no sexo feminino, que vinha apresentando sinais de virilização (crescimento do falo, desenvolvimento de massa muscular e espessamento de voz) e ausência de desenvolvimento mamário, acne ou pêlos faciais (Ferraz *et al.*, 1998). Esta mesma mutação foi previamente relatada em dois pacientes pré-púberes com fenótipo masculino. O primeiro deles, de origem grega, exibia hipospadia perineal e um falo pequeno em *chordee*

(Carpenter *et al.*, 1990 e Thigpen *et al.*, 1992). O segundo, de origem turca e filho de consangüíneos, apresentava escroto bífido, hipospadia perineal e micropênis (Hiort *et al.*, 1996). Estudos *in vitro* realizados por Thigpen *et al.* (1992) revelaram que essa substituição eleva o pH ótimo da enzima e reduz a atividade enzimática a aproximadamente 8,3% do normal em decorrência de uma drástica diminuição da afinidade dessa enzima pelo NADPH.

É ainda aventada a hipótese de um efeito de fundador no povoado de origem do paciente nº 1, uma pequena cidade no Estado de Minas Gerais com alta taxa de casamentos consangüíneos. De fato, os pais do paciente nº 1 são consangüíneos e referem a existência de ambigüidade genital em outros membros da família (Ferraz *et al.*, 1998).

O paciente nº 27 também possui a mutação Gly196Ser, mas em heterozigose. Os outros exons não apresentaram nenhuma mutação, detectando-se apenas um polimorfismo no 15º nucleotídeo do intron 1, que será discutido mais adiante. Thigpen *et al.* (1992) sugerem que, se a enzima 5 α -redutase tipo 2 funcionasse como um complexo funcional multimérico, mutações em heterozigose poderiam comprometer a atividade normal da enzima. Isto explicaria a ambigüidade genital naqueles pacientes pois a mutação em heterozigose apresentaria um efeito dominante. Entretanto, esta explicação está descartada no caso da mutação Gly196Ser, já que foram descritos indivíduos assintomáticos portadores desta mutação em heterozigose no presente trabalho, representados pelo pai e por um dos irmãos do paciente nº 1.

Mutações Gln126Arg e 418delT

O único heterozigoto composto (Gln126Arg/418del T) encontrado no presente estudo (paciente nº 2) foi criado como menina, apesar das gônadas palpáveis e da ausência de genitália interna feminina. Com a puberdade, passou a demonstrar comportamento e

orientação sexual masculinos, apresentando crescimento do falo, pilificação e ausência de desenvolvimento de mamas. A substituição Gln126Arg, encontrada nesse paciente, já foi anteriormente relatada no Brasil, na Bélgica, na Louisiana e em Nova York, em pacientes presumidamente de origem portuguesa (Thigpen *et al.*, 1992; Russell e Wilson, 1994). Mais recentemente, a mesma mutação foi descrita em pacientes franceses e alemães (Boudon *et al.*, 1995b; Sinnecker *et al.*, 1996). Esta substituição inativa completamente a enzima reduzindo drasticamente a sua meia-vida em células transfectadas *in vitro* (Wigley *et al.*, 1994).

É a terceira vez que a substituição Gln126Arg é detectada na população brasileira. Em todas as ocasiões os portadores são heterozigotos compostos (a 2ª mutação do paciente nº 2 é descrita a seguir). A ascendência caucasiana nos três casos citados reafirma a tese de uma possível ancestralidade comum a esses afetados, pelo menos no que se refere ao grupo étnico de origem. É extremamente heterogênea a composição étnica da população brasileira. Esta é composta, além de nativos ameríndios e asiáticos, de negróides, sobretudo negros africanos provenientes do tráfico negreiro, e de caucasóides, representados pela imigração de europeus, sendo expressiva a imigração portuguesa que remonta aos tempos da colonização no início do século 16. Aparentemente a substituição Gln126Arg é relativamente comum entre os caucasóides e pode, pelo menos nos casos brasileiros com ascendência caucasóide, ter sido difundida no Brasil a partir das rotas migratórias oriundas da Europa.

A segunda mutação detectada no paciente nº 2 (mutação 418del T) provoca uma alteração do quadro de leitura a partir do códon 140, conduzindo à substituição de 19 aminoácidos e criando um códon de parada prematuro na posição 159 (figura 16). A deleção 418delT conduz à expressão de uma proteína truncada e, presumivelmente, sem qualquer atividade enzimática. Esta mutação não se acha relatada na literatura.

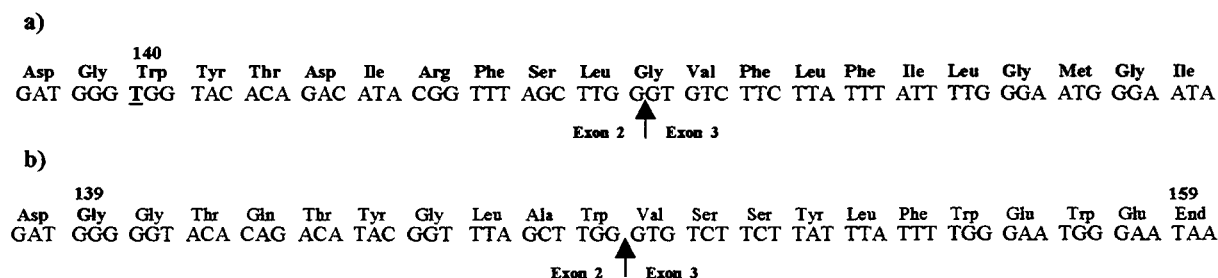


Figura 16. Deleção 418delT no paciente nº 2. Estão representadas as seqüências de nucleotídeos próximas à junção dos exons 2 e 3 (indicadas pelas setas). Em (a) a seqüência normal indicando a timina que está deletado no códon 140 do alelo mutante (b). Esta deleção altera o quadro de leitura e proteína apresenta-se truncada : além de possuir os aminoácidos substituídos nas posições 140 a 158, um códon de parada prematuro é introduzido na posição 159.

Uma vez que nenhuma atividade enzimática é esperada em consequência das mutações Gln126Arg e 418delT, a razão T/DHT em níveis normais no paciente nº 2 deve ser atribuída à atividade da 5 α -redutase tipo 1 em tecidos não genitais.

Mutação Gly183Ser

O paciente nº 3, portador da substituição Gly183Ser em homozigose, é de origem negróide, tendo sido criado no sexo feminino. À semelhança do paciente nº 2, a partir da puberdade passou a manifestar sinais de virilização, com subsequente mudança de orientação sexual. Os estudos funcionais *in vitro* realizados por Wigley *et al.* (1994) revelaram que essa substituição de aminoácido resulta em uma diminuição da afinidade da enzima pelo NADPH e num decréscimo de 90% da sua atividade enzimática. Esses dados bioquímicos são compatíveis com o achado de uma razão T/DHT (=105,7) extremamente elevada nesse paciente.

A substituição Gly183Ser foi inicialmente descrita por Thigpen *et al.* (1992) em um paciente brasileiro, filho de consangüíneos e de ascendência negróide, sendo

subseqüentemente identificada em um segundo paciente, também brasileiro e de ascendência negróide (Wilson *et al.*, 1993). Mais recentemente, essa mesma mutação foi detectada por Cai *et al.* (1996) em 4 afetados de uma família da República Dominicana. Estes autores definem o códon 183 como um *hot spot* do gene *SRD5A2*. Entretanto, esta suposição pode ser questionada, pois essa substituição foi identificada apenas em pacientes brasileiros e em dominicanos, não havendo relato desta mutação em outras partes do mundo. Ao contrário do que foi exposto por Cai *et al.* (1996), estes achados parecem sugerir a recorrência daquela mutação a partir de ancestrais comuns. De acordo com Wilson *et al.* (1993), a alta incidência da doença e a recorrência de determinadas mutações (como a Gly183Ser e Arg246Trp, descrita a seguir) em grandes *clusters* como o da República Dominicana pode ser consequência de efeito do fundador em isolados geográficos que apresentam um alto coeficiente de endocruzamento. Com relação à recorrência da mutação Gly183Ser no Brasil e na República Dominicana, deve-se considerar a história da colonização destes dois países. Constata-se que ambos os países apresentam um forte componente negróide na sua população, fruto do período da escravidão. A ascendência negróide nos casos brasileiros e a forte composição negróide na população dominicana, fruto da miscigenação entre espanhóis colonizadores e negros africanos vindos como escravos (Weil *et al.*, 1973) fazem supor que a substituição Gly183Ser surgiu em um grupo étnico ancestral (negros africanos, por exemplo) e distribuiu-se nas Américas às custas dos movimentos migratórios.

Mutação Ala49Tre

A mutação Ala49Tre foi encontrada em heterozigose no paciente nº 4. O aminoácido alanina no códon 49 do exon A é altamente conservado em espécies tão distintas quanto homem, macaco e rato (Levy *et al.*, 1995). Esta mutação já foi detectada em outros pacientes com PHM (Russell *et al.*, 1996).

Paradoxalmente, a substituição de aminoácido provocada por esta mutação afeta positivamente a atividade enzimática da 5 α -redutase 2 : estudos *in vitro* tem atribuído esta mutação à uma atividade elevada da enzima 5 α -redutase 2, associando a sua presença ao crescimento hiperplásico da próstata (Makridakis *et al.*, in press). Considerando o suposto complexo funcional multimérico proposto por Thigpen *et al.* (1992), pode-se supor que a mutação Ala49Tre confere ganho de atividade enzimática apenas quando presente em homozigose. Ou seja, a interação de duas enzimas com o resíduo treonina na posição 49 poderia resultar numa atividade elevada. Desta forma, e ainda no plano das suposições, resta saber quais seriam os resultados da interação de duas enzimas com resíduos diferentes (Alanina ou Treonina) na posição 49. A ambigüidade genital nos pacientes com a mutação A49T em heterozigose poderia ser explicada se a interação das duas enzimas afetasse a formação do complexo multimérico entre as 5 α -redutases, se é que, de fato, ele existe. Por outro lado, indivíduos heterozigotos para esta mutação tem sido detectados na população normal (Makridakis *et al.*, 1997), o que exclui essa possibilidade.

Portanto, a ambigüidade genital do paciente nº 4 não pode ser atribuída à deficiência na enzima 5 α -reductase tipo 2 já que, ao contrário, a mutação parece não proporcionar perda de atividade enzimática. Outras causas, tais como a insensibilidade parcial aos andrógenos, podem conduzir a um quadro clínico semelhante ao apresentado pelos deficientes em 5 α -redutase e devem ser consideradas.

Mutação Arg246Trp

O paciente nº 9, portador da substituição Arg246Trp em homozigose, é um adolescente com 14 anos de idade, de origem caucasóide e filho de pais consanguíneos. Apresenta genitália externa praticamente feminina e gônadas palpáveis na região inguinal

bilateral. As dosagens hormonais neste paciente indicam razão T/DHT de 65. Desde os 12 anos o paciente tem manifestado sinais de virilização com aumento do falo a 3 cm.

A mutação Arg246Trp já foi descrita antes em pacientes dominicanos, egípcios e brasileiros (Thigpen *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1993, Cai *et al.*, 1996). Segundo Thigpen *et al.* (1992), a recorrência desta mesma mutação em famílias do Brasil, Egito e República Dominicana pode ser explicada devido à presença *hot spots* no gene. De fato, o códon 246 parece ser uma região altamente mutável. Neste mesmo códon já foram descritas mutações tanto no primeiro quanto no segundo nucleotídeo da trinca. A transição C→T, no 1º nucleotídeo, conduz à substituição R246W e foi detectada em 4 pacientes. A transição G→A, no 2º nucleotídeo do códon 246, conduz à substituição R246Q e foi identificada em outros 4 afetados não relacionados.

A substituição de Arginina por Triptofano na posição 246 diminui a afinidade da isoenzima tipo 2 pelo seu cofator NADPH em mais de 100 vezes, reduz a sua meia vida e a enzima mutante apresenta uma atividade residual menor que 5% da normal (Thigpen *et al.*, 1992; Wigley *et al.*, 1994; Russell *et al.*, 1994). Surpreendentemente, Katz *et al.* (1997) relatam o caso de um deficiente em 5 α -redutase 2 portador desta mutação cujos espermatozóides foram recuperados, o que tornou possível uma inseminação artificial. O afetado é pai de três filhos (dois dos quais são gêmeos dizigóticos), todos necessariamente portadores de um alelo mutante. Apesar da reduzidíssima conversão de DHT, o caso deste paciente ressalta que a deficiência em 5 α -redutase 2 não compromete gametogênese dos afetados. Segundo esses autores, o diagnóstico bioquímico/molecular deve ser realizado o quanto antes pois as correções de criptorquidismo e hipospadia quando precoce minimizam os danos nos testículos e preservam a espermatogênese.

1.3 - Polimorfismos no Gene *SRD5A2*

O gene *SRD5A2* possui 3 polimorfismos que conduzem a variantes alélicas consideradas normais na população (Russell e Wilson, 1994). Dois destes polimorfismos estão localizados em regiões não codificantes (intron 1 e extremidade 3') e um está presente na sequência codificadora (códon 89 no exon A). Dentre estes, o polimorfismo GTA89CTA foi alvo de estudos mais detalhados, provavelmente por estar localizado num exon (Forti *et al.*, 1996; Vilchis *et al.*, 1997; Makridakis *et al.*, 1997).

Estudos populacionais revelaram que 70% dos alelos codificam Valina (GTA) e 30% deles Leucina (CTA) no códon 89 (Makridakis *et al.*, 1997; Vilchis *et al.*, 1997b). Tais dados sugerem que o alelo GTA deve ser o alelo tipo selvagem. Vilchis *et al.* (1997a,b) e Canto *et al.* (1997) observaram, na população mexicana, que deficientes em 5 α -redutase homozigotos para determinada mutação são também homozigotos para GTA, enquanto que os heterozigotos compostos são, também, heterozigotos GTA/CTA. Segundo Vilchis *et al.* (1997b) essa associação poderia contribuir para elucidar o padrão da mutação nos afetados naquela população. Entretanto, esta constatação não é totalmente aplicável para os casos detectados neste trabalho, pois o paciente nº 2, heterozigoto composto, é homozigoto CTA/CTA.

Outro polimorfismo relativamente bem estudado está localizado na extremidade 3' não traduzida do gene *SRD5A2* e consiste de números variáveis da repetição do dinucleotídeo TA. O alelo sem essa repetição, designado (TA)₀, é o mais freqüente na população (96%). Dois alelos polimórficos de menor freqüência são detectados : o alelo (TA)₉ e o alelo (TA)₁₈ (Reichardt *et al.*, 1995).

Por algum tempo imaginou-se que os polimorfismos GTA/CTA e (TA)_n fossem silenciosos e não promovessem qualquer alteração funcional na enzima ativa. Estudos populacionais mais apurados revelaram uma possível associação de algumas variantes alélicas com neoplasias de próstata (Reichardt *et al.*, 1995; Makridakis *et al.*, 1997; Makridakis *et al.*, in press). Os alelos GTA e (TA)₀ foram associados a maior propensão ao desenvolvimento do câncer de próstata, havendo uma nítida prevalência desses alelos nos grupos étnicos com maior risco para esse tipo de câncer. Segundo Reichardt *et al.* (1995), existiria uma relação inversa entre o número de repetições TA e o nível de atividade enzimática. Makridakis *et al.* (1997) observaram que a substituição de Valina por Leucina resulta em redução de 30% da atividade enzimática da 5 α -reductase tipo 2 *in vitro*. Esses autores também constataram que indivíduos normais homozigotos para o alelo GTA (Valina), exibem maior produção de DHT, o andrógeno mais ativo na próstata e responsável pelo crescimento das células naquele órgão. Com efeito, negróides norte-americanos apresentam elevado risco de desenvolver câncer de próstata e exibem frequência elevada desse alelo, enquanto que dentre os asiáticos norte-americanos o alelo CTA (Leucina) é o mais frequente. Desse modo, sugere-se que a baixa incidência de câncer de próstata nos asiáticos poderia ser explicada pela presença do resíduo Leucina na posição 89, em virtude da atividade reduzida dessa variante enzimática (Makridakis *et al.*, 1997).

Convém lembrar neste momento os pacientes com ambigüidade genital analisados neste trabalho que são portadores do alelo Leucina em homozigose (paciente no 26) ou em heterozigose (pacientes 5 e 30) como única alteração molecular no gene *SRD5A2*. É pouco provável que a ambigüidade genital nestes pacientes possa ser explicada por uma enzima com atividade reduzida em função da presença de Leucina no resíduo 89, sem que outras etiologias tenham sido excluídas. Em relação à uma atividade enzimática diminuída em razão do alelo (TA)₁₈, este trabalho não reúne dados suficientes para considerar tal suposição, uma vez que a repetição TA não foi avaliada no presente estudo.

O terceiro polimorfismo do gene *SRD5A2* está localizado no intron 1 e envolve a presença de citosina ou timina no 15º nucleotídeo da extremidade 5' do intron 1. As seqüências nucleotídicas dos introns que estão adjacentes aos exons apresentam alta homologia nos genes de vertebrados. Há uma seqüência consenso do sítio de *splice* extremamente conservada e que é primordial para a interação do pré-RNA mensageiro com as proteínas que participam do mecanismo de *splicing* (as pequenas ribonucleoproteínas, ou snRNPs - do inglês small ribonucleoprotein). Na extremidade 3' do intron (sítio acceptor de *splicing*), por exemplo, 70% dos primeiros 20 nucleotídeos são pirimidinas. No caso da extremidade 5' (sítio doador de *splicing*) há uma seqüência consenso específica que permite a interação da snRNP tipo U1 num processo mediado pela complementaridade de bases entre esta proteína e aquela junção do *splice*. A conformação estabelecida permite o alinhamento dos exons e a clivagem dos introns (Krawczak *et al.*, 1992).

Das mutações que afetam o sítio de *splice* na extremidade 5', 60% envolvem o dinucleotídeo GT, que está presente em todos os genes de vertebrados até hoje descritos (Krawczak *et al.*, 1992). As demais mutações e/ou polimorfismos ocorrem nos primeiros nucleotídeos que perfazem a seqüência consenso do sítio de *splice* a 5'. No caso do gene *SRD5A2*, esta seqüência consenso contém aproximadamente 60% de pirimidinas (Labrie *et al.*, 1992). Em relação a esse último polimorfismo, desconhecem-se, até o momento, as implicações do polimorfismo C/T sobre o processo de *splicing* da extremidade 5' do intron 1 do gene *SRD5A2*. Desse modo, é questionável se a mutação Gly196Ser em heterozigose mais a transição C para T no intron 1 em homozigose seriam suficientes para explicar a causa da ambigüidade genital no paciente nº 27. Em relação a este último polimorfismo, seriam necessários estudos *in vitro* para esclarecer essa questão.

O crescente interesse na caracterização dos aspectos bioquímicos e funcionais da 5 α -redutase tipo 2, dada a sua possível relação com o risco para câncer de próstata, fez com que

alguns autores se dedicassem à identificação de novas variantes alélicas do gene. Desse modo, por intermédio de análises moleculares em escala populacional outros polimorfismos foram detectados por Makridakis *et al.* (1997) e Makridakis *et al.* (in press). Esses autores descreveram o achado de 6 substituições *missense* em adultos normais da população norte-americana dentre as quais se inclui a mutação que conduz à troca do aminoácido Alanina por Treonina no códon 49, por nós detectada em um paciente com PHM. Segundo Makridakis *et al.* (in press), esta substituição eleva em até 5 vezes a atividade da 5 α -redutase tipo 2. Tendo em vista esses achados, torna-se claro que a interpretação do significado de uma “nova” mutação detectada em um paciente afetado depende não somente da realização de estudos funcionais *in vivo* e *in vitro*, como também de análises populacionais que permitam definir se não se trata de um polimorfismo.

Como apontado por Cotton e Scriver (1998), uma mutação que é detectada em menos de 1% dos alelos da população é, por definição, considerada rara e pode ser a causa da doença, enquanto que em frequências superiores tal mutação poderia ser considerada um polimorfismo neutro. No entanto, mesmo a definição de um polimorfismo “neutro” é controversa, já que a sua expressão pode contribuir para modular o fenótipo especialmente em características mais complexas tais como a susceptibilidade ao câncer.

1.4 - Pacientes com Etiologia não Definida

Dos 30 pacientes analisados neste trabalho, 24 não apresentaram qualquer alteração molecular, além do polimorfismo Val/Leu, no gene *SRD5A2* quer pela triagem de SSCP quer pelo seqüenciamento de DNA. A não identificação de mutações nestes pacientes pode ser atribuída : - 1º alterações moleculares localizadas em regiões não amplificadas na reação PCR (como por exemplo os introns); - 2º falha da técnica SSCP (que será melhor abordada logo adiante), e - 3º outras causas de PHM.

2 - Relevância do diagnóstico molecular

2.1 - Diagnóstico Precoce

Os pacientes com deficiência em 5α -redutase tipo 2 em geral apresentam ao nascimento ambigüidade genital caracterizada por hipospadia períneo-escrotal, chamada pseudo-vaginal, ou seio urogenital e testículos nos canais inguinais, ou nas saliências lábio-escrotais (Wilson *et al.*, 1993). Entretanto, pode ocorrer variações significativas, com manifestações tipo genitália feminina quase normal até a presença de um fenótipo nitidamente masculino com hipospadia, testículos bilaterais e estruturas derivadas de Wolff normalmente virilizadas. Uma das características da deficiência em 5α -redutase tipo 2 é a virilização da genitália externa, que ocorre durante a puberdade, devido à combinação dos efeitos da testosterona e da DHT formada ou pela isoenzima tipo 1 da 5α -redutase ou pela enzima mutante que, em alguns casos, possui uma atividade residual considerável (Forti *et al.*, 1996).

A virilização da genitália externa na puberdade, mediada pela isoenzima 1, levanta uma série de implicações pois esse processo está associado à aquisição de identificação psicossocial masculina em pacientes comumente criados como mulheres. É prudente identificar o defeito enzimático causador da ambigüidade genital pois, no caso da deficiência em 5α -redutase tipo 2, é possível reverter os defeitos da masculinização por meio de tratamento hormonal. Nos casos de pacientes com quadro clínico mais suave cirurgias corretivas e tratamento hormonal podem reparar situações de hipospadia e micropênis. Já nos casos mais gravemente afetados a escolha do sexo psicossocial feminino

pode ser mais adequada, sendo necessário a gonadectomia para evitar virilização na puberdade (Sinnecker *et al.*, 1996).

A escolha do sexo psicossocial em um paciente com ambigüidade genital é uma atitude complexa e que deve ser muito bem fundamentada. No caso da deficiência em 5 α -redutase, pela significativa heterogeneidade fenotípica da doença as análises moleculares são imprescindíveis, sobretudo em pacientes pré-púberes. Por esta razão, a identificação de mutações no gene *SRD5A2* tem contribuído não somente para confirmação da deficiência mas também para o aconselhamento genético às famílias dos afetados, bem como para um melhor entendimento das bases moleculares da deficiência em 5 α -redutase tipo 2.

2.2 - Diagnóstico Clínico/Hormonal

As dosagens hormonais, quer sejam de testosterona (T) quer sejam de 5 α -dihidrotestosterona (DHT) e precursores, muito acrescentam na identificação da etiologia do PHM. Contudo, há ressalvas. Nem sempre é possível o diagnóstico da deficiência em 5 α -redutase tendo como base apenas as dosagens hormonais. O achado hormonal indicativo de deficiência em 5 α -redutase é a razão Testosterona/DHT extremamente elevada, uma vez que não há síntese de DHT e a de T é normal e contínua. Entretanto, a razão T/DHT dentro dos níveis normais não exclui a deficiência em 5 α -redutase como causa de ambigüidade genital, pois nem sempre há uma correlação precisa entre valores de T/DHT e o quadro clínico da deficiência em 5 α -redutase 2 (Sinnecker *et al.*, 1996).

Sinnecker *et al.* (1996) salientam o achado da substituição Arg227Gln em homozigose em dois irmãos de origem vietnamita. Apesar de portadores da mesma mutação,

os afetados apresentavam graus variados de ambigüidade genital, sendo que o irmão mais velho (7 anos) exibia hipospadia escrotal, escroto bífido, *chordee* e micropênis (fenótipo SRD tipo 2) e o irmão mais novo (4 anos) exibia apenas pênis pequeno (embora dentro dos padrões normais) e sem nenhum outro sinal de defeito na masculinização (fenótipo SRD tipo 1). No entanto, ambos apresentavam razão T/DHT extremamente elevada apesar da divergência quanto ao fenótipo. Estes achados ilustram de maneira conclusiva que nem sempre o grau de ambigüidade genital deve ser atribuído a mutações diferentes, sendo necessário a análise molecular para identificar, sem sombra de dúvidas, a razão da deficiência.

Portanto, em determinadas situações não é absolutamente necessário dosar a DHT; ou seja, esta investigação pode ser relegada. Estudos ressaltam que a investigação molecular do gene *SRD5A2*, antes mesmo das dosagens hormonais, pode ser uma alternativa viável (Hiort *et al.*, 1996; Sinnecker *et al.*, 1996). É oportuno lembrar que, no passado, quando era mínimo o emprego das técnicas de análise molecular, pacientes menos gravemente afetados e com dosagens próximas da normalidade não eram diagnosticados corretamente. Em estudo realizado no Egito, Gad *et al.* (1997) relatam que, apesar de ser mais elevada a incidência de deficiência em 5 α -redutase 2 em casos de genitália ambígua associada a micropênis (5 das 10 famílias estudadas), é relativamente alta também a incidência de deficiência em 5 α -redutase 2 nos casos de micropênis isolado (1 caso entre 9 pacientes nesta situação). Embora a etiologia do micropênis, como uma anomalia isolada, seja tão heterogênea quanto a etiologia da ambigüidade genital, os dados apresentados por aqueles autores justificam a investigação bioquímica e molecular da deficiência em 5 α -redutase 2 até mesmo nos casos de hipospadia e (ou) micropênis isolado, com ou sem recorrência familiar. Wilson *et al.* (1993) e Albers *et al.* (1997) também ressaltam que a deficiência em 5 α -redutase 2 deve ser considerada nos casos de hipospadia isolada, sobretudo naqueles casos com recorrência familiar. No presente estudo a técnica de triagem por SSCP não

revelou alterações moleculares nos dois casos com recorrência de hipospadia na irmandade (pacientes 12 e 13, pacientes 18 e 19). De modo semelhante, também não foram detectadas alterações nos oito pacientes com hipospadia isolada (Tabela II, pág. 38), bem como em sete pacientes que exibiam hipospadia ou micropênis associadas a outras anomalias genitais, com história familiar negativa. Embora a validade do método de detecção por SSCP seja discutida no tópico seguinte, pode se concluir que mutações no gene *SRD5A2* seriam extremamente raras nos pacientes analisados neste trabalho que exibiam como sinal principal a hipospadia, com ou sem recorrência familiar.

Pelo menos em duas situações considera-se imprescindível a triagem molecular do gene da 5 α -redutase 2 antes mesmo dos testes hormonais : nos pacientes pré-púberes e nos gonadectomizados. Os primeiros em razão da inconstância dos valores hormonais e os últimos em função da impossibilidade de resposta hormonal aos testes aplicados. O prognóstico da deficiência em 5 α -redutase 2 depende da confirmação imediata da causa, para que os procedimentos mais adequados (gonadectomia, reposição hormonal, cirurgia plástica, etc) sejam realizados antes da ocorrência de qualquer complicação relacionada a essa anomalia (virilização na puberdade, indefinição quanto ao sexo psicossocial, etc). Segundo Hiort *et al.* (1996) a identificação de mutações no gene *SRD5A2* pode ser uma abordagem alternativa para o diagnóstico diferencial do pseudo-hermafroditismo masculino, por tratar-se de um procedimento menos invasivo, do que a realização dos testes de estímulo hormonal.

A seleção dos pacientes seguiu critérios clínicos e laboratoriais estabelecidos pelo GIEDDS. O protocolo de investigação empregado foi importante na medida em que os casos mais gravemente afetados puderam ser mais rapidamente identificados (salvo as exceções explicitadas acima), e por orientar de maneira mais adequada, embora não exclusiva e conclusiva, a seleção dos pacientes para estudo molecular.

2.3 - Diagnóstico Molecular

A análise por SSCP foi empregada como uma metodologia na triagem inicial de mutações. Por esta técnica foram identificados alguns fragmentos de PCR com padrões anormais de migração das bandas em eletroforese os quais foram sequenciados. Contudo, é questionável a sensibilidade do método, o qual revelou algumas falhas, principalmente no tocante à presença de muitos falsos-positivos, à incapacidade de analisar o exon A e de identificar algumas mutações já descritas (quicá as mutações novas). Estes fatos comprometeram a confiabilidade até então demonstrada pelo método. Por esta razão, os pacientes que, apesar da evidência laboratorial de deficiência em 5 α -redutase, não apresentaram anormalidades no SSCP tiveram todos os seus exons sequenciados.

Como verificado no presente trabalho, nem todo padrão anômalo no SSCP correspondeu a alterações moleculares na sequência nucleotídica. Isto é, pelo menos em 4 situações obteve-se padrões de migração que não correspondiam às migrações dos controles normais, apesar de não haver qualquer mutação (falsos-positivos). Estes padrões anômalos podem ser explicados por que determinadas sequências nucleotídicas podem originar mais de uma configuração estrutural, apesar de serem ainda desconhecidas as razões que levam à estas possíveis conformações. Também podem originar resultados duvidosos os parâmetros das condições da corrida como voltagem, amperagem, potência, temperatura e concentração do gel. Atenção especial devem ser dadas à estes dois últimos parâmetros, já que a temperatura da corrida e a densidade do gel podem efetivamente determinar a conformação e o padrão de migração das fitas simples (Kurniven *et al.*, 1995). Convém lembrar que um padrão anômalo é considerado confiável e relevante quando ele se repete independente das condições da corrida.

Pode-se, ainda, atribuir a falha na detecção de mutações aos reagentes presentes na própria reação de PCR, os quais podem influenciar a corrida no SSCP. Cai *et al.*, (1993) atribuem as falhas na detecção de mutações pelo SSCP ao excesso de “*primers*” da reação de PCR. Este excesso de “*primers*” interfere na fita simples de DNA, alterando sua conformação e, subseqüentemente, seu padrão de migração durante o SSCP. Segundo esses autores, o excesso de “*primers*” pode inibir o potencial discriminativo do SSCP provavelmente por que durante a corrida há um re-pareamento dos “*primers*” com as fitas simples. Outro reagente comumente utilizado em reações PCR é o dimetil sulfoxido (DMSO). Apesar de ser um inibidor da enzima *Taq* polimerase, quando utilizado em até 10% do volume final da reação PCR não há comprometimento da atividade da enzima. Ao contrário, o DMSO permite a amplificação de fragmentos de DNA que tendem a formar complexos de estruturas secundárias e/ou terciárias. Estas estruturas conformacionais formadas dificultam a extensão dos “*primers*” pela *Taq* polimerase e o DMSO previne a formação destes complexos. Isto exposto, é razoável supor que o excesso de DMSO, ou mesmo quantidades ínfimas deste reagente remanescentes da reação de PCR, podem influenciar a conformação das fitas simples durante a análise por SSCP. Além do excesso de “*primers*” e do DMSO, a concentração de sal do tampão usado na reação PCR também pode influenciar na estabilização das fitas simples depois da desnaturação, sendo necessário uma padronização da reação PCR. Enfim, os reagentes utilizados na PCR podem alterar ou modular o padrão de corrida das fitas simples, seja por alterar a conformação da fita simples seja por interferir na corrida destas fitas. Entretanto, o mesmo padrão anômalo foi obtido nos 4 falsos-negativos detectados neste trabalho, independentemente das condições da corrida e mesmo com fragmentos amplificados em reações PCR distintas.

A eficácia da técnica SSCP é garantida com sensibilidade de >90% e >80% para fragmentos de PCR com até 200 e 400 pares de bases, respectivamente, sendo que esta porcentagem também pode variar não apenas em função do tamanho do fragmento que está

sendo analisado, mas também da sua sequência nucleotídica (Hayashi e Yandell, 1993; Sheffield *et al.*, 1993; Vidal-Puig e Moller, 1994; Kurvinen *et al.*, 1995). O exon A do gene *SRD5A2* quando amplificado em sua totalidade numa única reação PCR apresenta 369 pares de bases. No SSCP não foi possível definir um padrão bem definido de migração das fitas simples, provavelmente devido ao tamanho elevado do fragmento amplificado. Além disso, a existência de dois polimorfismos neste exon dificultou a interpretação dos resultados. Com relação ao tamanho do amplificado, o problema pôde ser parcialmente solucionado após a amplificação do fragmento em duas reações PCR (exons A₁ e A₂ de tamanhos menores) ou a digestão do exon A com a enzima *Bam* HI (originando fragmentos de 225 e 144 pares de bases). Mesmo assim, não foi possível definir um padrão de migração específico para os exons A₁ e A₂ no SSCP, pela inespecificidade da reação de amplificação do exon A₁ e pela presença de polimorfismos no exon A₂.

A falha na detecção de mutações pelo SSCP tem sido relatada para uma série de genes como o gene p53, o gene da proteína C, os genes dos receptores de insulina e de andrógenos, etc (Vidal-Puig e Moller, 1994; Gomez *et al.*, 1997; Tolbert *et al.*, 1999). Falhas na detecção de mutações no gene *SRD5A2* também foram relatadas. Cinco mutações foram incapazes de serem detectadas, sendo elas as substituições Tir91Asp, Arg145Trp, Gly183Ser, Leu224Pro e His230Pro (Thigpen *et al.*, 1992; Wigley *et al.*, 1994). Curiosamente, essas mutações não detectadas localizam-se em posições extremas do fragmento amplificado, o que corrobora a hipótese de que a localização da mutação parece determinar qual será a conformação da fita simples. Provavelmente estas substituições seriam detectadas em fragmentos de PCR nos quais os pares de “primers” utilizados alterassem a posição da mutação.

Com tudo isto exposto, consideramos que a triagem inicial de mutações no gene *SRD5A2* pela técnica do SSCP não foi eficaz, apesar de identificar 4 das 7 mutações

detectadas neste trabalho. Alternativamente, são sugeridas outras técnicas de triagem de mutações como as já existentes CSGE (do inglês Conformation Sensitive Gel Electrophoresis; detecta mutações através da formação de heteroduplexes e parece ter sensibilidade próxima a 100% em fragmentos de 200 a 450 pares de bases), DGGE (do inglês Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), didesoxi - “*fingerprinting*” bidirecional (com sensibilidade próxima a 100% em fragmentos de 250 pares de bases), análise de heteroduplexes, etc (Haavik *et al.*, 1996; Kõrkkö *et al.*, 1998). Estas outras técnicas possuem sensibilidade próxima à demonstrada pelo SSCP e o seu uso em associação pode proporcionar uma eficácia ainda maior.

Por outro lado, o tamanho relativamente pequeno do gene *SRD5A2* (5 exons/762 pares de nucleotídeos codificantes) e as crescentes facilidades das reações de seqüenciamento preconizam o seqüenciamento direto de todos os exons do gene *SRD5A2*, mesmo sem a análise prévia por SSCP. Esta conduta seria idealmente indicada nos pacientes que tivessem clara evidência diagnóstica de deficiência em 5 α -redutase tipo 2. Os kits comumente utilizados para seqüenciamento manual proporcionam simplicidade na preparação das reações (não há mais necessidade de marcação radioativa dos “*primers*” com a T₄ Polinucleotídeo Quinase) e maior segurança (substituição do $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP pelo $\alpha^{33}\text{P}$ -ddNTP's, menos danoso que o primeiro). Com relação ao seqüenciamento automático, além de não radioativo (emprega-se nucleotídeos marcados com fluorescência) este método proporciona rapidez na obtenção de resultados. No caso do gene *SRD5A2*, é tecnicamente possível, em função do tamanho reduzido dos exons e das temperaturas de anelamento, a amplificação de todos os exons em uma única reação PCR (PCR *multiplex*) e o seqüenciamento automático de cada um dos exons separadamente a partir de alíquotas deste PCR *multiplex* e com os *primers* específicos a cada exon. Desta forma, seria mais rápida a detecção da alteração molecular no gene, o que garantiria, quando aliada ao diagnóstico

clínico, uma conduta mais adequada a partir da identificação precoce da deficiência enzimática.

VII - CONCLUSÕES

A deficiência em 5 α -redutase tipo 2 conduz a uma forma rara de pseudohermafroditismo masculino (PHM), em decorrência de mutações no gene *SRD5A2*. No presente trabalho realizou-se a análise molecular dos cinco exons desse gene em 30 pacientes 46,XY com graus variados de ambigüidade da genitália externa. Foram identificados dois indivíduos com mutações em homozigose, um heterozigoto composto e dois heterozigotos.

Apesar da baixa incidência de mutações no gene e da raridade da deficiência, 6 mutações diferentes foram identificadas. Dentre estas mutações, três já foram anteriormente descritas em pacientes brasileiros (Q126R, G183S e R246W), duas nunca haviam sido detectadas em nossa população (A49T e G196S) e uma mutação nova (418delT) foi identificada.

A existência de vários polimorfismos no gene *SRD5A2* dificulta a interpretação dos achados clínicos em pacientes com PHM, já que suas consequências sobre a atividade enzimática da proteína não estão completamente esclarecidas.

Não foram detectadas alterações moleculares entre os demais pacientes com hipospadia e (ou) outras manifestações de ambigüidade da genitália externa. A existência de mutações no gene *SRD5A2* também foi descartada em duas irmandades com hipospadia isolada. Tais dados sugerem que mutações no gene *SRD5A2* seriam extremamente raras nos pacientes analisados neste trabalho que exibiam como sinal principal a hipospadia, com ou sem recorrência familiar. Todavia, essa suposição só poderá ser confirmada mediante o seqüenciamento direto do gene.

CONCLUSÕES

Concluiu-se também neste trabalho que a análise molecular do gene *SRD5A2* pode anteceder o diagnóstico hormonal em alguns casos, sobretudo nos pacientes pré-púberes onde as dosagens hormonais são dificultadas e podem indicar valores às vezes inconclusivos, assim como naqueles casos em que há sinais clínicos sugestivos de deficiência em 5 α -redutase tipo 2.

A metodologia de diagnóstico molecular da deficiência em 5 α -redutase 2 proposta no presente trabalho baseou-se na análise preliminar de mutações pela técnica de SSCP. A eficácia desta técnica mostrou-se duvidosa, ao menos no que se refere ao gene *SRD5A2*. Embora fossem detectadas por esta análise 4 das 7 mutações descritas neste trabalho, os achados falso-negativos e a presença de polimorfismos no exon A comprometeram a confiabilidade e a sensibilidade do método. O tamanho relativamente pequeno do gene *SRD5A2* sugere a triagem de mutações por seqüenciamento direto de todos os exons, eliminando-se a análise prévia por SSCP.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ATTIA, H.M. - Male pseudohermaphroditism due to 5 alpha-reductase-2 deficiency in an Arab kindred. **Postgrad. Med. J.**, **73**:802-7, 1997.

ALBERS, N.; ULRICH, C.; GLÜER, S.; HIORT, O.; SINNECKER, G.H.G.;
MILDENBERGER, H.; BRODEHL, J. - Etiologic classification of severe
hypospadias: implications for prognosis and management. **J. Pediatr.**, **131**:386-92,
1997.

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

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

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

ANWAR, R.; GILBEY, S.G.; NEW, J.P.; MARKHAM, A.F. - Male
pseudohermaphroditism resulting from a novel mutation in the human steroid 5 α -
reductase type 2 gene (*SRD5A2*). **J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.**, **50**:51-2, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANEO, B.A.; DOWELL, T.; DIEGEL, M.; DAYNES, R.A. - Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukin-4 (IL-4), IL-5 and gamma interferon, but not IL-2 by activated murine T cells. **Blood**, **78**:688-99, 1991.
- AUMÜLLER, G.; EICHELER, W.; RENNEBERG, H.; ADERMAM, K.; VILJA, P.; FORSSMAM, W.G. - Immunocytochemical evidence for differential subcellular localization of 5 α -reductase isoenzymes in human tissues. **Acta Anat.**, **156**:241-52, 1996.
- BALDUCCI, R.; GHIRRI, P.; BROWN, T.R.; BRADFORD, S.; BOLDRINI, A.; BOSCHERINI, B.; SCIARRA, F.; TOSCANO, V. - A clinician looks at androgen resistance. **Steroids**, **61**:205-11, 1996.
- BEIGUELMAN, B. - A diferenciação sexual normal e anômala e as aberrações dos cromossomos sexuais. In : _____ **Citogenética Humana**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1982. p.243-301.
- BERMAN, D.M. & RUSSELL, D.W. - Cell-type-specific expression of rat steroid 5 α -reductase isozymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**:9359-63, 1993.
- BOUDON, C.; LOBACCARO, J.M.; LUMBROSO, S.; OGUR, G.; OCAL, G.; BELON, C.; SULTAN, C. - A new deletion of the 5 α -reductase type 2 gene in a Turkish family with 5 α -reductase deficiency. **Clin. Endocrinol.**, **43**:183-8, 1995a.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOUDON, C.; LUMBROSO, S.; LOBACCARO, J.M.; SZARRAS-CZAPNIK, M.; ROMER, T.E.; GARANDEAU, P.; MONTOYA, P.; SULTAN, C. - Molecular study of the 5 α -reductase type 2 gene in three European families with 5 α -reductase deficiency. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **80**:2149-53, 1995b.
- BRINKMANN, A.; JENSTER, G.; RIS-STALPERS, C.; VAN DER KORPUT, H.; BRUGGENWIRTH, H.; BOEHMER, A.; TRAPMAN, J. - Molecular basis of androgen insensitivity. **Steroids**, **61**:172-75, 1996.
- CAI, L.-Q.; FRATIANNI, C.M.; GAUTIER, T.; IMPERATO-MCGINLEY, J. - Dihydrotestosterone regulation of semen in male pseudohermaphrodites with 5 α -reductase-2 deficiency. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **79**: 409-14, 1994.
- CAI, L.-Q.; ZHU, Y.-S.; KATZ, M.D.; HERRERA, C.; BAÉZ, J.; DEFILLO-RICART, M.; SHACKLETON, C.H.L.; IMPERATO-MCGINLEY, J. - 5 α -reductase-2 gene mutations in the Dominican Republic. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **81**:1730-35, 1996.
- CAI, Q.-Q. & TOUITOU, I. - Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency. **Nucleic Acids Res.**, **21**:3909-10, 1993.
- CAN, S.; ZHU, Y.-S.; CAI, L.-Q.; LING, Q.; KATZ, M.D.; AKGUN, S.; SHACKLETON, C.H.L.; IMPERATO-MCGINLEY, J. - The identification of 5 α -reductase-2 and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase-3 gene defects in male pseudohermaphrodites from a Turkish kindred. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **83**:560-9, 1998.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CANTO, P.; VILCHIS, F.; CHÁVEZ, B.; MUTCHINICK, O.; IMPERATO-MCGINLEY, J.; PÉREZ-PALACIOS, G.; ULLOA-AGUIRRE, A.; MÉNDEZ, J.P. - Mutations of the 5 α -reductase type 2 gene in eight Mexican patients from six different pedigrees with 5 α -reductase-2 deficiency. **Clin. Endocrinol.**, **46**:155-60, 1997.
- CARPENTER, T.O.; IMPERATO-MCGINLEY, J.; BOULWARE, S.D.; WEISS, R.M.; SHACKLETON, C.; GRIFFIN, J.E.; WILSON, J.D. - Variable expression of 5 α -reductase deficiency : presentation with male phenotype in a child of Greek origin. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **71**:318-22, 1990.
- CELOTTI, F.; NEGRI-CESI, P.; POLETTI, A. - Steroid metabolism in the mammalian brain: 5 α -reduction and aromatization. **Brain Res. Bull.**, **44**:365-75, 1997.
- CELOTTI, F.; MELCANGI, R.C.; NEGRI-CESI, P.; POLETTI, A. - Testosterone metabolism in brain cells and membranes. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, **40**:673-78, 1991.
- COTTON, R.G.H. & SCRIVER, C.R. - Proof of "Disease Causing" mutation. **Hum. Mutat.**, **12**:1-3, 1998.
- EICHELER, W.; TUOHIMAA, P.; VILJA, P.; ADERMANN, K.; FORSSMANN, W.-G.; AUMÜLLER, G. - Immunocytochemical localization of human 5 α -reductase 2 with polyclonal antibodies in androgen target and non-target human tissues. **J. Histochem. Cytochem.**, **42**:667-75, 1994.
- ELLIS, J.A.; STEBBING, M.; HARRAP, S.B. - Genetic analysis of male pattern baldness and the 5 α -reductase genes. **J. Invest. Dermatol.**, **110**:849-53, 1998.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FERRAZ, L.F.C.; GUERRA JR., G.; BAPTISTA, M.T.M.; MACIEL-GUERRA, A.T.; HACKEL, C. - Detection of Gly-196-Ser mutation in 5 α -reductase type II gene in a Brazilian patient with female assignment and behavior. **J. Pediatr. Endocrinol. Metab.**, **11**:465-6, 1998.
- FORTI, G.; FALCHETTI, A.; SANTORO, S.; DAVIS, D.L.; WILSON, J.D.; RUSSELL, D.W. - Steroid 5 α -reductase 2 deficiency: virilization in early infancy may be due to partial function of mutant enzyme. **Clin. Endocrinol.**, **44**:477-82, 1996.
- GAD, Y.Z.; NASR, H.; MAZEN, I.; SALAH, N.; EL-RIDI, R. - 5 α -Reductase deficiency in patients with micropenis. **J. Inherit. Metab. Dis.**, **20**:95-101, 1997.
- GEORGE, F.W.; RUSSELL, D.W.; WILSON, J.D. - Feed-forward control of prostate growth: dihydrotestosterone induces expression of its own biosynthetic enzyme, steroid 5 α -reductase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**:8044-7, 1991.
- GRIFFIN, J.E.; MCPHAUL, M.J.; RUSSELL, D.W.; WILSON, J.D. - The androgen resistance syndromes : steroid 5 α -reductase 2 deficiency, testicular feminization and related disorders. In : Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (eds) - **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York. McGraw-Hill, 7th edition, 1995. p.2967-98.
- GRINO, P.B.; GRIFFIN, J.E.; WILSON, J.D. - Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. **Endocrinology**, **126**:1165-72, 1990.
- GUERRA-JÚNIOR, G. & MACIEL-GUERRA, A.T. - A determinação e a diferenciação sexual normais : atualização. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, **41**:191-7, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HAAVIK, J.; NISHINO, H.; LIU, Q.; SOMMER, S.S. - Bi-directional dideoxy fingerprinting (Bi-ddF): rapid and efficient screening for mutations in the Big Blue transgenic mouse mutation detection system. **Biotechniques**, **20**:988-90/992-4, 1996.
- HAYASHI, K. & YANDELL D.W. - How sensitive is PCR-SSCP ? **Hum. Mutat.**, **2**:338-46, 1993.
- HANAHAN, D. - Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, **166**:557-80, 1983.
- HIORT, O.; WILENBRIG, H.; ALBERS, N.; HECKER, W.; ENGERT, J.; DIBBELT, L.; SINNECKER, G.H.G. - Molecular genetic analysis and human chorionic gonadotropin stimulation tests in the diagnosis of prepubertal patients with partial 5 α -reductase deficiency. **Eur. J. Pediatr.**, **155**:445-51, 1996a.
- HIORT, O.; SINNECKER, G.H.G.; WILLENBRING, H.; LEHNERS, A.; ZÖLLNER, A.; STRUVE D - Nonisotopic single strand conformation analysis of the 5 α -reductase type 2 gene for the diagnosis of 5 α -reductase deficiency. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **81**:3415-8, 1996b.
- HOCHBERG, Z.; CHAYEN, R.; REISS, N.; FALIK, Z.; MAKLER, A.; MUNICHOR, M.; FARKAS, A.; GOLDFARB, H.; OHANA, N.; HIORT, O. - Clinical, biochemical, and genetic findings in a large pedigree of male and female patients with 5 α -reductase 2 deficiency. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **81**:2821-7, 1996.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- IMPERATO-MCGINLEY, J.; PETERSON, R.E.; GAUTIER, T.; STURLA, E. - Androgens and the evolution of male-gender identity among male pseudohermaphrodites with 5 α -reductase deficiency. **N. Engl. J. Med.**, **300**:1233-7, 1979a.
- IMPERATO-MCGINLEY, J.; PETERSON, R.E.; GAUTIER, T.; ARTHUR, A.; SHACKLETON, C. - Decreased urinary C₁₉ and C₂₁ steroid 5 α -metabolites in parents of male pseudohermaphrodites with 5-reductase deficiency : detection of carriers. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **60**:553-8, 1985.
- IMPERATO-MCGINLEY, J.; PETERSON, R.E.; GAUTIER, T.; STURLA, E. - Male pseudohermaphroditism secondary to 5 α -reductase deficiency – a model for the role of androgens in both the development of the male phenotype and the evolution of a male gender identity. **J. Steroid Biochem.**, **11**:637-45, 1979b.
- IMPERATO-MCGINLEY, J.; GUERRERO, L.; GAUTIER, T.; PETERSON, R.E. - Steroid 5 α - reductase deficiency in man : an inherited form of male pseudohermaphroditism. **Science**, **186**:1213-5, 1974.
- JENKINS, E.P.; ANDERSSON, S.; IMPERATO-MCGINLEY, J.; WILSON, J.D.; RUSSELL, D.W. - Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 α -reductase. **J. Clin. Invest.**, **89**:293-300, 1992.
- KATZ, M.D.; KLIGMAN, I.; CAI, L.-Q.; ZHU, Y.-S.; FRATIANNI, C.M.; ZERVOUDAKIS, I.; ROSENWAKS, Z.; IMPERATO-MCGINLEY, J. - Paternity by intrauterine insemination with sperm from a man with 5 α -reductase-2 deficiency. **N. Engl. J. Med.**, **336**:994-7, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KATZ, M.D.; CAI, L.-Q.; ZHU, Y.-S.; HERRERA, C.; DEFILLO-RICART, M.; SHACKLETON, H.L.; IMPERATO-MCGINLEY, J. - The biochemical and phenotypic characterization of females homozygous for 5 α -reductase deficiency. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **80**:3160-7, 1995.
- KÖRKKÖ, J.; ANNUNEN, S.; PIHLAJAMAA, T.; PROCKOP, D.J.; ALA-KOKKO, L. - Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**:1681-5, 1998.
- KRAWCZAK, M.; REISS, J.; COOPER, D.N. - The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. **Hum. Genet.**, **90**:41-54, 1992.
- KURVINEN, K.; HIETANEN, S.; SYRJÄNEN, K.; SYRJÄNEN, S. - Rapid and effective detection of mutations in the p53 gene using nonradioactive single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique applied on PhastSystemTM. **J. Virol. Methods.**, **51**:43-54, 1995.
- LABRIE, F.; SUGIMOTO, Y.; LUU-THE, V.; SIMARD, J.; LACHANCE, Y.; BACHVAROV, D.; LEBLANC, G.; DUROCHER, F.; PAQUET, N. - Structure of human type II 5 α -reductase gene. **Endocrinology**, **131**:1571-3, 1992.
- LEVY, M.A.; BRANDT, M.; SHEEDY, K.M.; HOLT, D.A.; HEASLIP, J.I.; TRILL, J.J.; RYAN, P.J.; MORRIS, R.A.; GARRISON, L.M.; BERGSMA, D.J. - Cloning, expression and functional characterization of type 1 and type 2 steroid 5 α -reductases from *Cynomolgus* monkey: comparisons with human and rat isoenzymes. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, **52**:307-19, 1995.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LEVY, M.A.; BRANDT, M.; GREWAY, A.T. - Mechanistic studies with solubilized rat liver steroid 5 α -reductase: elucidation of the kinetic mechanism. **Biochemistry**, **29**:2808-15, 1990.
- LU, S.-F.; MCKENNA, S.E.; COLOGER-CLIFFORD, A.; NAU, E.A.; SIMON, N.G. - Androgen receptor in mouse brain: sex differences and similarities in autoregulation. **Endocrinology**, **139**:1594-601, 1998.
- LUGG, J.A.; RAJFER, J.; GONZÁLEZ-CADAVID, N.F. - Dihydrotestosterone is the active androgen in the maintenance of nitric oxide-mediated penile erection in the rat. **Endocrinology**, **136**:1495-501, 1995.
- MACLEAN, H.E.; WARNE, G.L.; ZAJAC, J.D. - Intersex disorders: shedding light on male sexual differentiation beyond *SRY*. **Clin. Endocrinol.**, **46**:101-8, 1997.
- MAHONY, M.C.; SWANLUND, D.J.; BILLETER, M.; ROBERTS, K.P.; PRYOR J.L. - Regional distribution of 5 α -reductase type 1 and type 2 mRNA along the human epididymus. **Fertil. Steril.**, **69**:1116-21, 1998.
- MAKRIDAKIS, N.M.; ROSS, R.K.; PIKE, M.C.; CHANG, L.; STANCZYK, F.Z.; KOLONEL, L.N.; SHI, C.-Y.; YU, M.C.; HENDERSON, B.E.; REICHARDT, J.K.V. - A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5 α -reductase. **Cancer Res.**, **57**:1020-2, 1997.
- MAKRIDAKIS, N.M.; ROSS, R.K.; PIKE, M.C.; CROCITTO, L.E.; KOLONEL, L.N.; PEARCE, C.L.; HENDERSON, B.E.; REICHARDT, J.K.V. - A missense substitution in the *SRD5A2* gene is associated with prostate cancer in African-American and Latino men in Los Angeles. **Lancet**, [In press]

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MARSHALL, W.A. & TANNER, J.M. - Variation in pattern of pubertal changes in boys.

Arch. Dis. Child., **44**:201-303, 1969.

McELREAVEY, K.; BARBAUX, S.; ION, A.; FELLOUS, M. - The genetic basis of murine and human sex determination: a review. **Heredity**, **75**:599-611, 1995.

MELCANGI, R.C.; POLETTI, A.; CAVARRETTA, I.; CELOTTI, F.; COCIAGO, A.; MAGNAGHI, V.; MOTTA, M.; NEGRI-CESI, P.; MARTINI, L. - The 5 α -reductase in the central nervous system: expression and modes of control. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, **65**:295-9, 1998.

MENKE, A.L.; VAN DER EB, A.J.; JOCHEMSEN, A.G. - The Wilm's tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene ? **Int. Rev. Cytol.**, **181**:151-212, 1998.

MILEWICH, L.; MENDONÇA, B.B.; ARNHOLD, I.; WALLACE, A.M.; DONALDSON, M.D.C.; WILSON, J.D.; RUSSELL, D.W. - Women with steroid 5 α -reductase 2 deficiency have normal concentrations of plasma 5 α -dihydrotestosterone during the luteal phase. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **80**:3136-9, 1995.

MOORE, K.L. - Sistema Urogenital. In: _____ **Embriologia Clínica**. Rio de Janeiro. Interamericana, 1978. p. 219-58.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- NACHTIGAL, M.W.; HIROKAWA, Y.; ENYEART-VANHOUTEN, 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**:445-54, 1998.
- NEGRI-CESI, P.; POLETTI, A.; CELOTTI, F. - Metabolism of steroids in the brain: a new insight into the role of 5 α -reductase and aromatase in brain differentiation and functions. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, **58**:455-66, 1996.
- NISHIMURA, A.; MORITA, M.; NISHIMURA, Y.; SUGINO, Y. - A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. **Nucleic Acids Res.**, **18**:6169, 1990.
- NORDENSKJÖLD, A.; MAGNUS, Ø.; AAGENÆS, Ø.; KNUDTZON, J. - Homozygous mutation (A228T) in the 5 α -reductase type 2 gene in a boy with 5 α -reductase deficiency: genotype-phenotype correlations. **Am. J. Med. Genet.**, **80**:269-72, 1998.
- NORMINGTON, K. & RUSSELL, D.W. - Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 α -reductase isozymes. **J. Biol. Chem.**, **267**:19548-54, 1992.
- OPITZ, J.M.; SIMPSON, J.L.; SARTO, G.E.; SUMMITT, R.L.; NEW, M.; GERMAN, J. - Pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. **Clin. Genet.**, **3**:1-26, 1972.
- ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. - Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. **Genomics**, **5**:874-9, 1989.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PRADER, A. - Der genital befund bein pseudohermaphroditismus femininus des kongenitalen adrenogenitalen syndrome. **Helv. Paediatr. Acta**, **9**:231-48, 1954.
- PETERSON, R.E.; IMPERATO-MCGINLEY, J.; GAUTIER, T.; STURLA, E. - Male pseudohermaphroditism due to steroid 5 α -reductase deficiency. **Am. J. Med.**, **62**:170-91, 1977.
- POLETTI, A.; CELOTTI, F.; RUMIO, C.; RABUFFETTI, M.; MARTINI, L. - Identification of type 1 5 α -reductase in myelin membranes of male and female rat brain. **Mol. Cell. Endocrinol.**, **129**:181-90, 1997.
- POLETTI, A.; CELOTTI, F.; MELCANGI, R.C.; BALLABIO, M.; MARTINI, L. - Kinetic properties of the 5 α -reductase of testosterone in the purified myelin, in the subcortical white matter and in the cerebral cortex of the male rat brain. **J. Steroid Biochem.**, **35**:97-101, 1990.
- POLETTI, A.; NEGRI-CESI, P.; RABUFFETTI, M.; COLCIAGO, A.; CELOTTI, F.; MARTINI, L. - Transient expression of the 5 α -reductase type 2 isozyme in the rat brain in late fetal and early postnatal life. **Endocrinology**, **139**:2171-6, 1998a.
- POLETTI, A.; COSCARELLA, A.; NEGRI-CESI, P.; COLCIAGO, A.; CELOTTI, F.; MARTINI, L. - 5 α -reductase isozymes in the central nervous system. **Steroids**, **63**:246-51, 1998b.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. **Hum. Mol. Genet.**, 8:989-96, 1999.
- REICHARDT, J.K.V.; MAKRIDAKIS, N.; HENDERSON, B.E.; YU, M.C.; PIKE, M.C.; ROSS, R.K. - Genetic variability of the human *SRD5A2* gene: implications for prostate cancer risk. **Cancer Res.**, 55:3973-5, 1995.
- RUSSELL, D.W. & WILSON, J.D. - Steroids 5 α -reductase : two genes/two enzymes. **Annu. Rev. Biochem.**, 63:25-61, 1994.
- RUSSELL, D.W.; BERMAN, D.M.; BRYANT, J.T.; CALA, K.M.; DAVIS, D.L.; LANDRUM, C.P.; PRIHODA, J.S.; SILVER, R.I.; THIGPEN, A.E.; WIGLEY, W.C. - The molecular genetics of steroid 5 α -reductases. **Recent Prog. Horm. Res.**, 49:275-84, 1994.
- RUSSELL, D.W.; ANDERSSON, S.; WILSON, J.D. - The molecular genetics of male phenotypic sexual differentiation. In: Hughes, I.A. - **Frontiers in Endocrinology - Sex Differentiation: clinical and biological aspects**. Sero Symposia, 1996. p.80-83.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. - Primer-direct enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239:487-91, 1989.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SCHAFER, A.J. & GOODFELLOW, P.N. - Sex determination in humans. **BioEssays**, **18**:955-63, 1996.
- SHEFFIELD, V.C.; BECK, J.S.; KWITEK, A.E.; SANDSTRON, D.W.; STONE, E.M. - The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. **Genomics**, **16**:325-32, 1993.
- SHEN, W.-H.; MOORE, C.C.D.; IKEDA, Y.; PARKER, K.L.; INGRAHAM, H.A. - Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. **Cell**, **77**:651-61, 1994.
- SILVER, R. I.; WILEY, E.L.; THIGPEN, A.E.; GUILLEYARDO, J.M.; MCCONNELL, J.D.; RUSSELL, D.W. - Cell type specific expression of steroid 5 α -reductase 2. **J. Urol.**, **152**:438-42, 1994a.
- SILVER, R. I.; WILEY, E.L.; DAVIS, D.L.; THIGPEN, A.E.; RUSSELL, D.W.; MCCONNELL, J.D. - Expression and regulation of steroid 5 α -reductase 2 in prostate disease. **J. Urol.**, **152**:433-7, 1994b.
- SINNECKER, G.H.G.; HIORT, O.; DIBBELT, L.; ALBERS, N.; DORR, H.G.; HAUSS, H.; HEINRICH, U.; HEMMINGHAUS, M.; HOEPFFNER, W.; HOLDER, M.; SCHNABEL, D.; KRUSE, K. - Phenotypic Classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 α -reductase 2 deficiency. **Am. J. Med. Genet.**, **63**:223-30, 1996.
- STONER, E. - 5 α -reductase inhibitors for the treatment of benign prostatic hyperplasia. **Recent Prog. Horm. Res.**, **49**:285-92, 1994.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- THIGPEN, A.E.; DAVIS, D.L.; MILATOVICH, A.; MENDONÇA, B.B.; IMPERATO-MCGINLEY, J.; GRIFFIN, J.E.; FRANCKE, U.; WILSON, J.D.; RUSSELL, D.W. - Molecular genetics of 5 α -reductase deficiency. **J. Clin. Invest.**, **90**:799-809, 1992.
- THIGPEN, A.E.; SILVER, R.I.; GUILYARDO, J.M.; CASEY, M.L.; MCCONNELL, J.D.; RUSSELL, D.W. - Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 α -reductase isozyme expression. **J. Clin. Invest.**, **92**:903-10, 1993.
- TIAN, H. & RUSSELL, D.W. - Expression and regulation of steroid 5 α -reductase in the genital tubercle of the fetal rat. **Dev. Dyn.**, **209**:117-26, 1997.
- TOLBERT D.M.; NOFFSINGER, A.E.; MILLER, M.A.; DEVOE, G.W.; STEMMERMANN, G.N.; MACDONALD, J.S.; FENOGLIO-PREISER, C.M. - p53 immunoreactivity and single-strand conformational polymorphism analysis often fail to predict p53 mutational status. **Mod. Pathol.**, **12**:54-60, 1999.
- VIDAL-PUIG, A. & MOLLER, D.E. - Comparative sensitivity of alternative single-strand conformation polymorphism (SSCP) methods. **Biotechniques**, **17**:490-6, 1994.
- VIGER, R.S. & ROBAIRE, B. - Differential regulation of steady state 4-ene steroid 5 α -reductase messenger ribonucleic acid levels along the rat epididymis. **Endocrinology**, **128**:2407-14, 1991.
- VILAIN, E. & MCCABE, E.R. - Mammalian sex determination: from gonads to brain. **Mol. Genet. Metab.**, **65**:74-84, 1998.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- VILCHIS, F.; HERNÁNDEZ, D.; CANTO, P.; MÉNDEZ, J.P.; CHÁVEZ, B. - Codon 89 polymorphism of the human 5 α -steroid reductase type 2 gene. **Clin. Genet.**, **51**:399-402, 1997a.
- VILCHIS, F.; CANTO, P.; CHÁVEZ, B.; ULLOA-AGUIRRE, A.; MÉNDEZ, J.P. - Molecular analysis of the 5 α -steroid reductase type 2 gene in a family with deficiency of the enzyme. **Am. J. Med. Genet.**, **69**:69-72, 1997b.
- WALSH, P.C.; MADDEN, J.D.; HARROD, M.J.; GOLDSTEIN, J.L.; MACDONALD, P.C.; WILSON, J.D. - Familial incomplete male pseudohermafroditism, type 2. Decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. **N. Eng. J. Med.**, **291**:944-9, 1974.
- WEIL, T.E.; BLACK, J.K.; BLUTSTEIN, H.I.; JOHNSTON, K.T.; MCMORRIS, D.S.; MUNSON, F.P. - Social System. In : **Area handbook for the Dominican Republic**. U.S. Government Printing Office, Superintendent of Documents, 2nd edition, 1973. p.49-55.
- WIGLEY, W.C.; PRIHODA, J.S.; MOWSZOWICZ, I.; MENDONÇA, B.B.; NEW, M.I.; WILSON, J.D.; RUSSELL, D.W. - Natural mutagenesis study of the human steroid 5 α -reductase 2 isozyme. **Biochemistry**, **33**:1265-70, 1994.
- WILSON, J.D. - Syndrome of androgen resistance. **Biol. Reprod.**, **46**:168-73, 1992.
- WILSON, J.D.; GRIFFIN, J.E.; RUSSELL, D.W. - Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. **Endocr. Rev.**, **14**:577-93, 1993.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WOODHEAD, J.L.; FALLON, R.; FIGUEREDO, H.; LANGDALE, J.; MALCOM, A.D.B. - Alternative methodology of gene diagnosis. In: Davies, K.E. - **Human genetic diseases - a practical approach**. Oxford. IRL Press Limited, 1986. p.51-64.

XI - ANEXOS

1 - Protocolo de Avaliação Clínica e Hormonal

1.1-Avaliação Clínica

Os pacientes foram e vem sendo avaliados pelos Profs. Drs. Andréa Trevas Maciel-Guerra e Gil Guerra Júnior e pela médica Márcia Scolfaro, aluna de Pós-Graduação do Curso de Clínica Médica da FCM/Unicamp. Foram realizadas genitografias e ultrassonografias pélvicas de todos os pacientes pré-púberes incluídos no estudo, exceto aqueles que já haviam realizado previamente tais exames, ou que já haviam sido submetidos à correção cirúrgica dos genitais internos. Os pacientes são acompanhados mediante consultas periódicas no GIEDDS (Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo), até que a abordagem diagnóstica esteja completa e um diagnóstico etiológico possa ser realizado, mesmo que este seja idiopático.

1.2-Avaliação Hormonal

Desde setembro de 1997, as dosagens hormonais vem sendo realizadas no Laboratório de Fisiologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp. São utilizados kits comerciais e todas as dosagens são realizadas em duplicata. Esse protocolo compreende :

A) Dosagens séricas basais de testosterona total, testosterona livre, hormônio luteinizante, hormônio folículo-estimulante, 5 α -di-hidrotestosterona (valores normais vide

Quadro I), para os quais foram necessários cerca de 8 ml de sangue periférico colhido em frasco sem anti-coagulante.

B) Dosagens séricas de testosterona total, testosterona livre e 5 α -dihidrotestosterona (DHT), após estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG), para as quais são necessários novamente cerca de 8 ml de sangue periférico coletado nas mesmas condições. Em todos os pacientes com idade superior a 6 meses, cujos responsáveis concordaram em participar do protocolo, foram realizadas aplicações intramusculares de hCG na dose única diária de 1.000U, para crianças menores de 2 anos, e de 1.500U, para aquelas maiores de 2 anos de idade, por três dias consecutivos. Um dia após a última aplicação, realizou-se a coleta do sangue após o hCG. Este tem efeito análogo ao hormônio luteinizante e induz a um aumento na produção de andrógenos por estímulo das células de Leydig. O teste com esse hormônio tem por finalidade avaliar a integridade da via de síntese da testosterona e sua conversão periférica em DHT. Antes dos 6 meses de idade e durante a puberdade não é necessário o estímulo com o hCG, pois é esperado que o eixo hipotálamo-hipófise-testículos esteja ativado.

C) Dosagens séricas de androstenediona, dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona e progesterona, nos soros já coletados pré- e pós-hCG, nos pacientes sem produção adequada de testosterona após estímulo com hCG (incremento menor que 1,5 ng/ml) em relação à dosagem basal, e naqueles em que somente foi realizada a dosagem basal de testosterona e esta foi menor que 1,5 ng/ml. Essas dosagens tem por finalidade investigar a existência de defeitos na via de síntese da testosterona.

Quadro I. Valores normais para as dosagens hormonais.

LH (hormônio lutienizante) e FSH (horm. foliculo-estimulante) : imunofluorometria (STRATUS)		
	Valores Normais (em mUI/ml) :	
	LH	FSH
Pré-púberes	0.1 – 1.0	0.5 – 3.3
Homens adultos	0.9 – 10.6	2.2 – 17.7
Mulheres (fase folicular)	1.1 – 11.1	3.6 – 16.6

TESTOSTERONA TOTAL (T) : quimioluminescência (IMMULITE)		
	Valores Normais (em ng/ml) :	
	masculino	feminino
Pré-púberes	0.1 – 0.2	0.1 – 0.2
Adultos	3.0 – 10.0	0.2 – 0.8

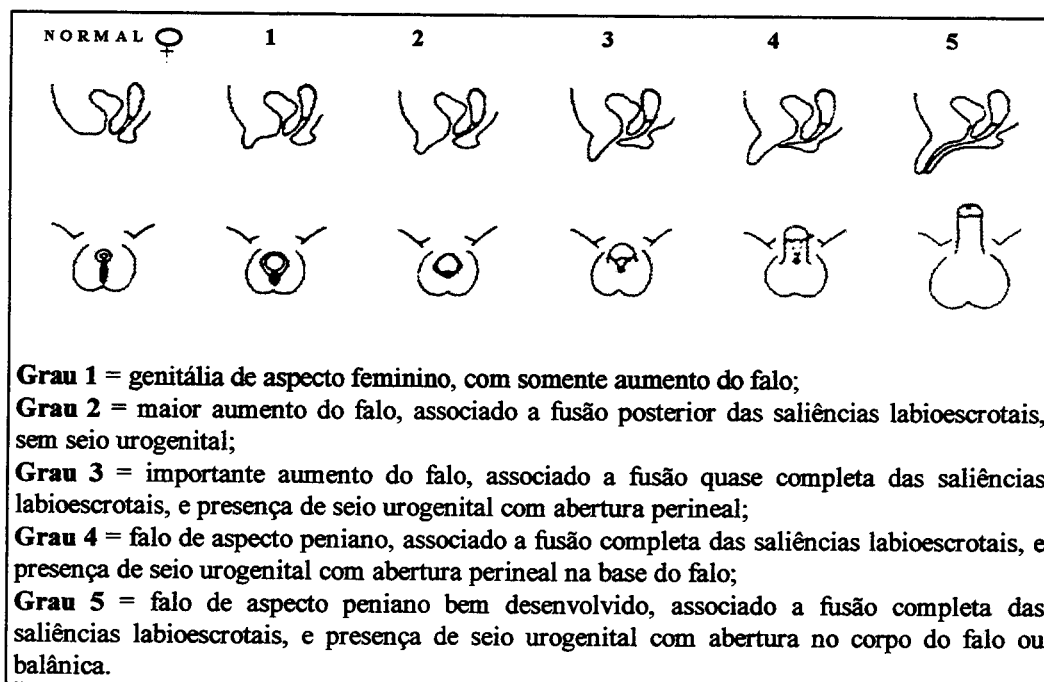
5α-DI-HIDROTESTOSTERONA (DHT) : radioimunoensaio (trício)		
	Valores Normais (em ng/ml) :	
	masculino	feminino
Pré-púberes	0.01 – 0.07	0.01 – 0.07
Adultos	0.09 – 0.72	0.07 – 0.53

RELAÇÃO T/DHT	
Normal	até 20
Deficiente em 5 α -redutase 2	acima de 40
Valores Intermediários	entre 20 e 40

ESTRADIOL : quimioluminescência (IMMULITE)		
	Valores Normais (em Pg/ml) :	
	masculino	Feminino
Pré-púberes	<40	<40
Adultos	<56	40-266

2 - Classificação da genitália externa de acordo com Prader

Graus de virilização da genitália externa feminina (PRADER, 1954).



3 - Parecer da Comissão de Ética

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA**

CONSULTA No. 385/96-C.Ética

DATA: 18.11.96

ASSUNTO: Projeto de Pesquisa: "Detecção de mutações do gene 5 α -redutase-2 em pacientes de sexo genético masculino com ambiguidade genital"

INTERESSADO: Profa. Dra. Christine Hackel

RELATOR: Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona

P A R E C E R

Consideramos que o projeto referido acima obedece os requisitos necessários para pesquisa.

Esta Comissão manifesta-se favorável à realização do estudo.



Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona
MEMBRO RELATOR



Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE DA COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA
HC/UNICAMP

4 - Artigo Publicado

SHORT COMMUNICATION

Detection of Gly-196-Ser Mutation in 5 α -Reductase Type II Gene in a Brazilian Patient with Female Assignment and Behavior

Lúcio Fábio Caldas Ferraz¹, Gil Guerra Jr², Maria Tereza Matias Baptista², Andréa Trevas Maciel-Guerra¹ and Christine Hackel¹

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

ABSTRACT

We describe the identification of a single base mutation in the 5 α -reductase type II gene in a Brazilian patient who was reared as female and remained with female behavior and sexual identity.

KEY WORDS

male pseudohermaphroditism, 5 α -reductase type II gene, point mutation

5 α -Reductase type II deficiency is an autosomal recessive condition leading to impairment of the conversion of testosterone (T) to dihydrotestosterone (DHT). Since DHT is essential for the development of normal external genitalia in the male fetus, deficiency of 5 α -reductase activity results in partial to severe impairment of virilization of the external genitalia. These children are more often raised as girls, but at puberty a change to male gender is frequently observed, together with virilization and descent of the testes, deepening of the voice, muscular development and increase in phallic size.

The 5 α -reductase type II gene (SRD5A2) comprises five exons and translates into a protein of 254 amino acids /1/. The SRD5A2 gene has been located on chromosome 2p23 /2/ and specific gene mutations have been defined /3/.

The proband, a 16 year-old Caucasian patient, was referred to us due to virilization of the external genitalia. She was born at term by normal delivery after an uneventful pregnancy, to a 19 year-old mother and a 22 year-old father; birth weight is unknown. Her parents are consanguineous (second cousins once removed), and she has three normal younger sibs (a girl and two boys). According to the parents, there are two relatives with sexual ambiguity (a first cousin once removed of the father and a first cousin of the mother). She is a healthy girl with normal psychomotor development. On examination, she had normal height and weight (158 cm and 47.7 kg), and anomalies were limited to the external genitalia: there was a 6 cm phallus bound in chordee, a perineal urethral outlet, and genital folds were fused, pigmented and wrinkled. The right gonad was palpable in the inguinal canal and the left one inside the genital fold. There was no breast development, facial hair and acne were absent, and pubic hair was Tanner stage 3. Her voice was deepened, and muscular development was evident. Laboratory investigation revealed a 46,XY karyotype, normal levels of FSH (13.4 μ IU/ml) and LH (5.3 μ IU/ml), the levels of testosterone were in the normal male pubertal range (4.9 ng/ml), and there was a low level of DHT (65 pg/ml) (T/DHT ratio = 75). The prostate has not been seen by pelvic ultrasonography.

For molecular genetic analysis, DNA from peripheral blood leukocytes was extracted and exons 1 to 5 of the SRD5A2 gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with primer sequences according to Katz *et al.* /4/. Non-radioactive single strand conformation polymorphism analysis allowed the detection of an abnormal electrophoretic band shift in exon 4. Direct sequen-

Reprint address:
Dr. Christine Hackel
Departamento de Genética Médica
FCM, UNICAMP, CP 6111
13081-970 Campinas, SP, Brazil

cing was performed with PCR products from two separated reactions using the sense primer labelled with γ - ^{32} P-ATP and the Thermosequenase kit (Amersham). A single nucleotide substitution (G $\rightarrow$ A transition) was identified, changing the predicted amino acid in codon 196 from glycine to serine. This nucleotide substitution created a site for the restriction enzyme *DdeI* (CTNAG) in exon 4. The G196S mutation was followed through the patient's family by *DdeI* digestion and the results indicated that the father, the mother and one of the boys were heterozygous for the mutation, while the younger brother was homozygous for the normal allele. The normal sister was homozygous for the mutant allele, thus being deficient in the 5 α -reductase type II enzyme.

The G196S mutation has already been described in three unrelated patients with male phenotype: a child of Greek origin with perineal hypospadias and a small phallus bound in chordee /3/ and two prepubertal patients of Turkish origin, with bifid scrotum, perineal hypospadias and micropenis /5,6/. We report here finding the same mutation in homozygous condition in a pubertal patient with female assignment, behavior and psychological sex. The non-reversal of gender role behavior to male may be due to environmental cultural forces, since this family came from a very small and conservative village in Minas Gerais, Brazil. Unfortunately, referral to our service was late, and psychological prejudices about sexual ambiguity could not be avoided.

The fact that the G196S mutation has been detected in patients from distinct geographical areas raises the possibility of a mutational hotspot in the gene that may lead to increased carrier frequency. In the present case, it is interesting to note that both parents come from a small town in south-east Brazil, where a high rate of consanguinity is ob-

served. Thus, the characterization of homozygosity or heterozygosity in the unaffected sibship reinforces the importance of molecular genetic analysis for genetic counseling.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (FAEP-UNICAMP). L.F.C.F. holds a grant from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

REFERENCES

1. Labrie F, Sugimoto Y, Luu-The V, Simard J, Lachance Y, Bachvarov D, Leblanc G, Durocher F, Paquet N. Structure of human type II 5 α -reductase gene. *Endocrinology* 1992; 131: 1571-1573.
2. Russel DW and Wilson JD. Steroid 5 α -reductase: two genes/two enzymes. *Ann Rev Biochem* 1994; 63: 25-61.
3. Thigpen AE, Davis DL, Miltovich A, Mendonça BB, Imperato-McGinley J, Griffin JE, Francke U, Wilson JD, Russel DW. Molecular genetics of 5 α -reductase deficiency. *J Clin Invest* 1992; 90: 799-809.
4. Katz MD, Cai LQ, Zhu Y, Herrera C, DeFillo-Ricart M, Shackleton HL, Imperato-McGinley J. The biochemical and phenotypic characterization of females homozygous for 5 α -reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3160-3167.
5. Hiort O, Willengring H, Albers N, Hecker W, Engert J, Dibbelt L, Sinnecker GHG. Molecular genetic analysis and human chorionic gonadotropin stimulation tests in the diagnosis of prepubertal patients with partial 5 α -reductase deficiency. *Eur J Pediatr* 1996; 155: 445-451.
6. Sinnecker GHG, Hiort O, Dibbelt L, Albers N, Dörr HG, Hauss H, Heinrich U, Hemminghaus M, Hoepffner W, Holder M, Schnabel D, Kruse K. Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Am J Med Genet* 1996; 63: 223-230.

5 - Artigo Aceito Para Publicação

When first examined by us, at age 18 years, he had an unequivocal male habitus with no breast development, a 4.5 cm phallus, lack of fusion of the labioscrotal folds, a perineal urethral outlet and a vaginal introitus. The right gonad was found inside the labioscrotal fold, and the left gonad was on the inguinal region. There was axillary and pubic hair (Tanner stage 5), but no facial hair (except for a fuzz on the upper lip), acne or temporal recession of the anterior hairline. Ultrasonography showed absence of female internal genitalia, while retrograde contrast study of the perineal orifices confirmed the existence of a female urethra and a blind vaginal pouch. Excretory urography disclosed rotation abnormalities of both kidneys.

The hypothesis of 5- α -reductase 2 deficiency was raised on the basis of the patient's history and clinical findings. However, testosterone (T) and dihydrotestosterone (DHT) levels after hCG stimulation were 31.5 nmol/L and 2.1 nmol/L, respectively, giving an unexpected low T/DHT ratio (15.0). There was also high LH (13.3 mUI/mL) and normal FSH (10.9 nUI/mL) levels. Psychological evaluation showed that the patient had a clear male identity, and he was reassigned as a male. Many surgeries in an attempt to correct hypospadias were performed in the following years. He married a few years ago, experiences increased libido, and intends to adopt children.

MOLECULAR STUDIES

Genomic DNA for PCR was isolated from blood leukocytes of the patient by standard methods. The five exons of the SRD5A2 gene were individually amplified by PCR with flanking intronic sequences as specific primers sequences [Katz *et al.*, 1995]. Reactions were denatured at 94°C for 5 minutes and subjected to 35 cycles of amplification at 94°C for 90 s, annealing at 60–68°C for 90 s and extension at 72°C for 90 s, followed by a final extension step at 72°C for 5 minutes. After amplification, PCR products were analyzed in ethidium bromide-stained agarose gels to check the predicted size of the expected fragments. The amplification products were screened for variations by non-radioactive single strand conformation polymorphism analysis (SSCP) on silver-stained gels. The exon 1 product (369 base pairs) was digested with *Bam*H I to generate fragments of 144 and 225 base pairs, in order to obtain a better resolution on SSCP analysis. Electrophoresis were run on PhastSystem™ (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) using non-denaturing polyacrilamide Phastgel Homogeneous 12.5 and 20% with PhastGel SDS and native buffer strips. Optimal temperatures and other running conditions were predetermined for each exon (data not shown). Direct sequencing was performed with PCR products from two separated reactions using sense and anti-sense primers. The exon 2 PCR products were also cloned into the vector pMOSBlue, using the

pMOSBlue blunt ended cloning kit (Amersham). Sequences analysis were performed with the reagents of the ThermoSequenase™ radiolabeled terminator cycle sequencing kit (Amersham) using radiolabeled 2', 3'-dideoxynucleoside-5'-triphosphate nucleotide analogs (α -³³P-ddNTPs).

RESULTS

All exons of the SRD5A2 gene were amplified successfully by PCR. The resulting fragments were of the expected size when electrophoresed on agarose gels. The screening for the presence of putative mutations by SSCP analysis showed that only exon 2 of the patient exhibited an altered electrophoretic pattern when compared to normal subjects (Fig. 1). Direct sequencing of the PCR product showed the A→G transition that leads to the Q126R substitution in heterozygosis and a less distinct region downstream codon 140, where the superimposition of the allelic sequences suggested the existence of a nucleotide deletion. Cloning and sequencing the exon 2 fragments enabled us to identify the second mutation as a timine deletion at the first nucleotide of codon 140 (nt.418) and to confirm that the two mutations resided on different alleles (Fig.2). Nucleotide and amino acid numbering are according to Labrie *et al.*, (1992).

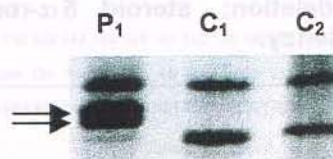


Figure 1. SSCP analysis of exon 2 of the SRD5A2 gene. Abnormal electrophoretic bands (arrows) are seen in the patient (P) as compared to two unrelated normal male controls (C₁, C₂).

DISCUSSION

The patient is a compound heterozygote for two mutations (Q126R and 418delT) on exon 2 of the SRD5A2 gene. The Q126R mutation has been detected in subjects from Brazil, Belgium, Louisiana, and New York, all with presumed Portuguese ancestry [Thigpen *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1993; Russel and Wilson, 1994]. More recently, the same mutation was reported in a French sibship [Boudon *et al.*, 1995a] and in a German individual [Sinnecker *et al.*, 1996]. Four of these cases were homozygous for Q126R mutation, although consanguinity was excluded in three of them

A New Frameshift Mutation in the 5 α -Reductase Type 2 Gene in a Brazilian Patient with 5 α -Reductase Deficiency

LÚCIO FÁBIO CALDAS FERRAZ⁽¹⁾, MARIA TEREZA MATIAS BAPTISTA⁽²⁾, ANDRÉA TREVAS MACIEL-GUERRA⁽³⁾, GIL GUERRA JÚNIOR⁽²⁾, and CHRISTINE HACKEL^{(1,3)*}

⁽¹⁾Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, ⁽²⁾Departamento de Pediatria, ⁽³⁾Departamento de Genética Médica, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP) - Campinas, São Paulo, Brazil.

Male pseudohermaphroditism due to steroid 5 α -reductase deficiency is an autosomal recessive disorder. The enzyme steroid 5 α -reductase 2 (encoded by the SRD5A2 gene) catalyses the conversion of testosterone to dihydrotestosterone, which is required for normal differentiation of the external male genitalia. This report describes the molecular analysis of the 5 α -reductase type 2 gene in a Brazilian patient who was raised as a female, underwent a reversal of gender role behavior, and is now a married man. This patient is a compound heterozygote, bearing an A $\rightarrow$ G mutation within exon 2, changing codon 126 from Glu to Arg on one allele and a novel single base deletion (418delT) causing a frameshift mutation at codon 140 in the same exon, on the other allele. This last mutation probably leads to the synthesis of a truncated protein, since a premature termination signal is created at codon 159.

KEY WORDS : male pseudohermaphroditism; 1 base-pair deletion; steroid 5 α -reductase deficiency.

INTRODUCTION

Steroid 5 α -reductase deficiency, an autosomal recessive disorder, leads to impairment of the conversion of testosterone (T) to dihydrotestosterone (DHT), the androgen essential for normal development of external genitalia in the male fetus [Wilson *et al.*, 1993]. DHT also mediates most events of male puberty, including maturation of facial and body hair, development of acne, genital growth, and acquisition of male behavior.

Male pseudohermaphroditism due to 5 α -reductase deficiency is the consequence of mutations in the gene encoding the type 2 isozyme [Thigpen *et al.*, 1992; Wigley *et al.*, 1994]. In the classical syndrome, affected individuals are 46,XY males who generally present with an ambiguous albeit phenotype at birth with testes and perineoescrotal hypospadias with pseudovagina [Wilson *et al.*, 1993]. These patients are often raised as girls, but at puberty a change to male gender is frequently observed, together with virilization and descent of the testes, deepening of voice, muscular development and increase in phallic size.

The 5 α -reductase type 2 gene (SRD5A2) comprises five exons and translates into a protein of 254 amino acids [Labrie *et al.*, 1992]. To date, over 30 different mutations have been identified in patients with 5 α -reductase deficiency [Thigpen *et al.*, 1992; Boudon *et al.*, 1995a; Forti *et al.*, 1996; Sinnecker *et al.*, 1996; Anwar *et al.*, 1997; Canto *et al.*, 1997]. Most of the mutations are missense or nonsense mutations, although total deletion of the gene and nucleotide deletions, as well as splice-junctions alterations have also been reported [Andersson *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1993; Boudon *et al.*, 1995b; Can *et al.*, 1998]. Here, we present the molecular genetic analysis of a Brazilian patient with 5 α -reductase deficiency. In this patient, who was raised as female but changed gender role at age 14, two mutations were found in exon 2: a A $\rightarrow$ G resulting in the Q126R substitution and a one base-pair deletion (418delT) which alters the open reading frame and predicts the synthesis of a truncated protein.

CLINICAL REPORT

The patient, a Caucasian man now 25 years old, was born at term by vaginal delivery after an uneventful pregnancy to a 19-year-old G2P2 mother and 25-year-old father. Birth weight was 3,250 g. There was no consanguinity, and family history was unremarkable. Although palpable gonads were noted by the mother since birth, he had a female sex assignment and was reared as a girl. When he was 14 years old, the family looked for medical assistance due to male behavior and sexual orientation, an enlarged phallus and palpable gonads. Karyotype was 46,XY. Unfortunately, the patient was lost to follow up.

Running head : Ferraz *et al.* A new frameshift mutation in the 5 α -reductase type 2 gene.

* Send correspondence to Dr. Christine Hackel

Departamento de Genética Médica
FCM - UNICAMP CP 6111
13081-970 Campinas, SP, Brazil
Phone/fax : 55-19-7888909
e-mail : hackel_c@turing.unicamp.br

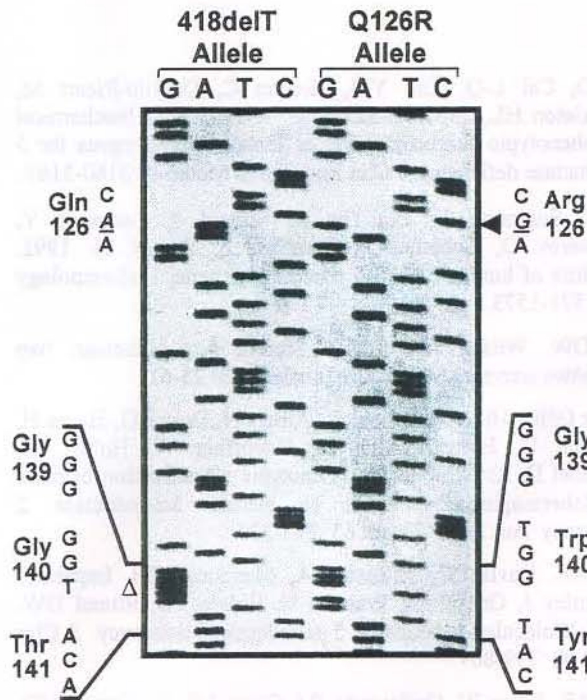


Figure 2. Sequencing analysis of two clones containing exon 2 fragments revealed that the patient is a compound heterozygote, bearing an adenine to guanine substitution at codon 126 on one allele (solid arrowhead) and the deletion of a thymine nucleotide at codon 140 on the other allele (open triangle).

[Wilson *et al.*, 1993; Boudon *et al.*, 1995a], while the other patients exhibited different combinations in a heterozygous state [Q126R/D164V and Q126R/N193S - Wilson *et al.*, 1993; Q126R/I112N - Sinnecker *et al.*, 1996].

Our patient, of Caucasian descent, is the third case of a compound heterozygote bearing the Q126R mutation detected in Brazilian population. The ethnic origins of Brazilian population are highly heterogeneous, being composed of immigrants from Europe, Africa, Asia, as well as Amerindian groups, resulting in a complex race admixture. Portuguese contribution is one of the most ancient and predominant ones, beginning in the 16th century with Brazilian colonization. These observations may indicate that the Q126R mutation is relatively common among Caucasians and could have been spread through European migration in the last centuries. However, the possibility of a mutational hotspot cannot be excluded.

The other mutation is a thymine deletion of the first nucleotide in codon 140 (418delT). As far as we know, this deletion has not yet been described. As shown in Fig. 3, this mutation introduces a translational frameshift and probably results in the synthesis of a truncated protein. Nineteen amino acids downstream of the mutation are codified until the premature termination signal created at codon 159. Regarding the first mutation detected in our patient, it has been demonstrated that the Q126R substitution inactivates the enzymatic function *in vitro*, and is associated with a drastically

decreased half-life of the mutant protein [Wigley *et al.*, 1994]. Since no enzymatic activity is expected in consequence of the second mutation detected in our patient, the finding of a normal T/DHT ratio in this case can only be attributed to the type 1 isoform 5 α reductase activity, which is expressed in non-genital tissues [Thigpen *et al.*, 1993].

Phenotypes may vary widely in patients with SRD5A2 gene mutations, spanning the whole range from completely female to normal male without distinctive clinical signs of the disease or with mild symptoms of undermasculinization [Sinnecker *et al.*, 1996]. The clinical variability of the syndrome leads to a continuous search for correlations between different phenotypes and specific mutations, which hopefully will support the clinical decisions to be made in patients with pseudohermaphroditism due to 5 α reductase deficiency. Since the diagnosis of this disorder is sometimes difficult, and cannot be ruled out by a lack of an elevated T/DHT ratio, the molecular characterisation of the mutations is a relevant tool for correct diagnosis, as illustrated by the present case.

NORMAL

139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159
Gly Trp Tyr Thr Asp Ile Arg Phe Ser Leu Gly Val Phe Leu Phe Ile Leu Gly Met Gly Ile
GGG TGG TAC ACA GAC ATA CGG TTT AGC TTG GGT GTC TTG TTA TTT ATT TTG GGA ATG GGA ATAA
Exon 2 Exon 3

MUTANT

139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159
Gly Gly Thr Gln Thr Tyr Gly Leu Ala Trp Val Ser Ser Tyr Leu Phe Trp Glu Trp Glu End
GGG GGT ACA CAG ACA TAC GGT TTA GGT TGG GTG TCT TCT TAT TTA TTT TGG GAA TGG GAA TAA
Exon 2 Exon 3

Figure 3. Partial nucleotide sequence of exons 2 and 3 of the SRD5A2 gene to illustrate the single base (thymine) deletion in the exon 2 that leads to a frameshift at codon 140 and introduces a premature stop codon at amino acid position 159. The numbers in the first row show the amino acid positions of 5 α -reductase 2 isozyme. The boldface T in the third row of the normal sequence indicates the deleted thymine in the mutated gene. The amino acids after the mutation are indicated as italic letters and exon 2/exon 3 junctions are indicated by arrows

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fundo de Apoio à Pesquisa e ao Ensino da Universidade Estadual de Campinas, FAEP - UNICAMP, Brazil. LFCF was supported by a fellowship from Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior, CAPES, Brazil.

REFERENCES

- Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russel DW. 1991. Deletion of steroid 5 α -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 354:159-161.
- Anwar R, Gilbey SG, New JP, Markham AF. 1997. Male pseudohermaphroditism resulting from a novel mutation in the human steroid 5 α -reductase type 2 gene. *J Clin Pathol: Mol. Pathol* 50: 51-52.
- Boudon C, Lumbroso S, Lobaccaro JM, Szarras-Czapnik M, Romer TE, Garandeau P, Montoya P, Sultan C. 1995a. Molecular study of the 5 α -reductase type 2 gene in three European families with 5 α -reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2149-2153.
- Boudon C, Lobaccaro JM, Lumbroso S, Ogur G, Ocal G, Belon C, Sultan C. 1995b. A new deletion of the 5 α -reductase type 2 gene in a Turkish family with 5 α -reductase deficiency. *Clin Endocrinol* 43: 183-188.
- Can S, Zhu Y-S, Cai L-Q, Ling Q, Katz MD, Akgun S, Shackleton CHL, Imperato-McGinley J. 1998. The identification of 5 α -reductase-2 and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase-3 gene defects in male pseudohermaphrodites from a Turkish kindred. *J Clin Endocrinol Metab* 83:560-569.
- Canto P, Vilchis F, Chávez B, Mutchinick O, Imperato-McGinley J, Pérez-Palacios G, Ulloa-Aguirre A, Méndez JP. 1997. Mutations of the 5 α -reductase Type 2 gene in eight Mexican patients from six different pedigrees with 5 α -reductase-2 deficiency. *Clin Endocrinol* 46:155-160.
- Forti G, Falchetti A, Santoro S, Davis DL, Wilson JD, Russel DW. 1996. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency: virilization in early infancy may be due to partial function of mutant enzyme. *Clin Endocrinol* 44:477-482.
- Katz MD, Cai L-Q, Zhu Y-S, Herrera C, DeFillo-Ricart M, Shackleton HL, Imperato-McGinley J. 1995. The biochemical and phenotypic characterization of females homozygous for 5 α -reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3160-3167.
- Labrie F, Sugimoto Y, Luu-The V, Simard J, Lachance Y, Bachvarov D, Leblanc G, Durocher F, Paquet N. 1992. Structure of human type II 5 α -reductase gene. *Endocrinology* 131:1571-1573.
- Russell DW, Wilson JD. 1994. Steroid 5 α -reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 63: 25-61.
- Sinnecker GHG, Hiort O, Dibbelt L, Albers N, Dorr HG, Hauss H, Heinrich U, Hemminghaus M, Hoepffner W, Holder M, Schnabel D, Kruse K. 1996. Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Am J Med Genet* 63: 223-230.
- Thigpen AE, Davis DL, Miltovich A, Mendonça BB, Imperato-McGinley J, Griffin JE, Francke U, Wilson JD, Russel DW. 1992. Molecular genetics of 5 α -reductase deficiency. *J Clin Invest* 90 :799-809.
- Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey ML, McConnell JD, Russel DW. 1993. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 α -reductase isozyme expression. *J Clin Invest* 92:903-910.
- Wigley WC, Prihoda JS, Mowszowicz I, Mendonça BB, New MI, Wilson JD, Russel DW. 1994. Natural mutagenesis study of the human steroid 5 α -reductase 2 isozyme. *Biochemistry* 33:1265-1270.
- Wilson JD, Griffin JE, Russel DW. 1993. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocr Rev* 14:577-593.