



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

HELENA FABBRI SCALLET

“ESTUDO FUNCIONAL DE NOVAS VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS NO
GENE *NR5A1* EM PACIENTES 46,XY COM DISTÚRBIOS DA
DIFERENCIAÇÃO DO SEXO”

CAMPINAS

2017

HELENA FABBRI SCALLET

**“ESTUDO FUNCIONAL DE NOVAS VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS NO
GENE *NR5A1* EM PACIENTES 46,XY COM DISTÚRBIOS DA
DIFERENCIAÇÃO DO SEXO”**

*Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutora em Genética e
Biologia Molecular, na área de
Genética Animal e Evolução.*

Supervisor/Orientador: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Co-supervisores/Coorientadores: Prof. Dr. Olaf Hiort

Prof. Dr. Ralf Werner

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA HELENA FABBRI SCALLET,
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
MARICILDA PALANDI DE MELLO.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/05603-5; FAPESP, 2013/24333-9
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2738-1814>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F111e Fabbri-Scallet, Helena, 1987-
Estudo funcional de novas variações nucleotídicas no gene NR5A1 em pacientes 46,XY com distúrbios da diferenciação do sexo / Helena Fabbri Scallet. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Maricilda Palandi de Mello.
Coorientadores: Olaf Hiort e Ralf Werner.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fator esteroideogênico 1. 2. Disgenesia gonadal. 3. Mutação. I. Mello, Maricilda Palandi de. II. Hiort, Olaf. III. Werner, Ralf. IV. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Functional analyses of new nucleotide variations in NR5A1 gene in patients 46,XY with disorders of sex development

Palavras-chave em inglês:

Steroidogenic factor 1

Gonadal dysgenesis

Mutation

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Maricilda Palandi de Mello [Orientador]

Maria de Fátima Sonati

Carmen Silvia Bertuzzo

Elaine Maria Frade Costa

Edmilson Ricardo Gonçalves

Data de defesa: 29-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 29 de agosto de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello (orientadora)

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

Prof. Dr. Elaine Maria Frade Costa

Prof. Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

*À toda minha amada família,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar e guiar o meu caminho, em todos os dias da minha vida.

Aos meus queridos pais, Luiz Alberto e Eleni, que são minha base e sem eles nada teria alcançado. Obrigada por tudo o que fizeram e fazem por mim.

À minha amada irmã Isabel, que está ao meu lado em todos os momentos da minha vida, me orientando e ensinando a ser sempre uma pessoa melhor.

Ao meu maravilhoso marido Enio, que me apoia em qualquer decisão que eu tome e que está sempre ao meu lado. Obrigada por todo amor, paciência e companheirismo nesses anos todos.

A todos da minha família que sempre rezam e torcem por mim. Sem dúvida, tenho a maior sorte do mundo por ter uma família tão maravilhosa!

À querida professora Maricilda, que para mim é um exemplo a seguir. Professora, não tenho nem palavras para descrever o quanto você é especial para mim e como a minha vida mudou desde o momento em que me aceitou em seu laboratório. Você me ensina muito além do que a ciência pode ensinar. De todo coração, muito obrigada!

To my co-supervisors, Olaf and Ralf, thank you so much for receiving me in your lab. You did so much for me that no words would be enough to express how thankful I am. Thank you all my Lübeck family, especially Dagmar, Markus, Susanne, Lou and Bettina. I will always keep great memories from the moments we shared. It has been almost three years since I left and every time that we meet is so nice that I feel that I have made the best German friends ever! You will always be in my heart.

Ao Dr. Gil e Dra. Andréa por todo apoio que me deram na realização deste projeto. Agradeço também a todos que participam do GIEDDS.

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

A todos os meus queridos amigos do Laboratório de Genética Molecular e Humana do CBMEG, antigos e atuais! Em especial à Marcela, Rose, Pamela, Luana, Taís, Taci, Bárbara, Bia, Calina, João, Matheus, Giovana, Jonathan, Alessandra e Fábio! Obrigada pelo convívio diário, pela ajuda, pelas risadas e ótimas confraternizações que fazemos! Aos saudosos Flor, Regi e Luli, vocês também moram no meu coração!

Em especial gostaria de agradecer à Mara, minha amiga e companheira que me ajuda MUITO sempre, e faz com que meus dias sejam muito mais divertidos! É um prazer fazer parte da dupla Batman e Robin!rs. Drizinha, nossa médica de plantão, que está sempre pronta para nos ajudar no que for, você é demais e mora no meu coração! Obrigada Débora querida, por toda paciência e amizade nesses anos todos. Cris baby, mesmo estando um pouco mais distante de nós agora, adoro sua amizade. Ana Paula, obrigada por sempre me ajudar e ser uma ótima amiga! Nadya linda, obrigada pela sua amizade e companheirismo nas disciplinas! Lizandrinha, obrigada por ser essa maravilhosa aluna de iniciação que você é, tive muita sorte em dividir o trabalho com você! À amiga Jú Gabriel, obrigada pela colaboração e principalmente pela amizade e ótimos momentos que dividimos durante nossa jornada na Alemanha!

Aos professores, alunos e funcionários do CBMEG. Em especial a Gabi, Tânia e Sandra por serem sempre tão eficientes e prontas para nos ajudar.

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

Meus respeitosos agradecimentos para os membros da minha banca de defesa, Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati, Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, Prof. Dr. Elaine Maria Frade Costa e Prof. Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves.

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

À agência financiadora FAPESP pela concessão da Bolsa de Doutorado (2013/05603-5) e Bolsa BEPE (2013/24333-9), sem a qual este projeto não seria viável.

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

RESUMO

Os Distúrbios da Diferenciação do Sexo (DDS) caracterizam-se pelos desenvolvimentos gonadal e/ou genital incompletos ou desordenados, que levam a uma discordância entre o sexo genético, gonadal e fenotípico do indivíduo afetado. Entre os genes envolvidos na cascata de diferenciação e determinação sexual, encontra-se o *NR5A1*, que codifica a proteína SF-1, e que quando mutado, pode levar a diferentes fenótipos de DDS, como disgenesia gonadal pura e parcial, DDS ovário testicular 46,XX, DDS 46,XX testicular, anorquia bilateral e hipospádia, além de quadros de amenorréia primária, insuficiência ovariana primária, infertilidade masculina, entre outros. Os objetivos desse projeto foram analisar o papel funcional de dez mutações identificadas no gene *NR5A1*, sendo cinco delas encontradas na região codificante do gene (p.C65Y, p.R39C, p.S32N, p.C247* e p.K396Rfs*34) e cinco na região não codificante do gene (c.-133G>A, c.-156_-139dup, c.-413G>A + c.-207C>A e c.-762C>T), e estudar o gene *NR5A1* em indivíduos com DDS 46,XY e infertilidade masculina. Além dos métodos clássicos para os estudos moleculares, a metodologia deste estudo incluiu, para as mutações da região codificadora, os ensaios de expressão das proteínas NR5A1 normal e mutantes verificadas por *Western blot* que foram usadas na ativação do gene da Luciferase como repórter e nos Ensaios de Deslocamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA). Os estudos *in vitro* demonstraram que para as cinco mutações na região codificante do gene a capacidade de transativação dos promotores testados foi reduzida em relação à proteína normal. Isto se deve certamente ao fato de todas as mutações, com exceção da mutação p.C247*, eliminarem a capacidade da proteína em se ligar ao DNA. Para as mutações localizadas na região não codificante do gene, observou-se que a atividade transcricional dos elementos de transcrição presentes na região 5' e 5'UTR foi reduzida em cerca de 50% para a combinação c.-413G>A + c.-207C>A, e drasticamente aumentada para as variações c.-133G>A e c.-762C>T; enquanto que pouca alteração foi identificada para a variante causada pela duplicação de 18 pares de base (c.-156_-139dup). A busca de novas alterações dentro da casuística estudada, revelou duas novas mutações, a p.C55S e a p.M98Gfs*44, em dois pacientes com DDS 46,XY. Estes estudos permitiram estabelecer uma correlação

genótipo-fenótipo para as mutações identificadas na região codificante do gene *NR5A1*; no entanto, para as variantes da região não codificante, mais estudos funcionais podem ajudar no esclarecimento de seus papéis. Porém fica aqui demonstrada a importância da inclusão desta região no estudo molecular, uma vez que estas alterações foram identificadas em oito dos 114 indivíduos estudados. Este estudo relata um total de 12 mutações identificadas no gene *NR5A1* em 17 pacientes com DDS 46,XY. Esses resultados evidenciam a importância da análise molecular deste gene para todos os casos de DDS 46,XY, incluindo os quadros mais leves, como infertilidade masculina, até os mais graves, como disgenesia gonadal pura associada a insuficiência adrenal.

ABSTRACT

Disorders of Sex Development (DSD) are defined as congenital conditions in which development of chromosomal, gonadal or anatomical sex is atypical. Mutations in the *NR5A1* gene, which encodes the transcription factor SF-1, are responsible for different phenotypes of DSD, such partial and complete gonadal dysgenesis, 46,XX testicular and ovotesticular DSD, bilateral anorchia, hypospadias, and also can be associated with primary amenorrhea, premature ovarian failure, male infertility, adrenal tumors and others. The aims of this work were to analyze the functional role of ten *NR5A1* mutations, five described within the coding region (p.C65Y, p.R39C, p.S32N, p.C247* and p.K396Rfs*34) and five located at the non coding region of the gene (c.-133G>A, c.-156_-139dup, c.-413G>A + c.-207C>A and c.-762C>T), and also to screen *NR5A1* for mutations in patients with DSD 46,XY and male infertility. In addition to all classic methods used in molecular studies, the methodology for functional studies included the expression of normal and mutant NR5A1 proteins verified by Western Blot, followed by transcriptional activation of luciferase gene reporter assays, and, Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) for mutations located within the coding region. *In vitro* functional analyses demonstrated that *NR5A1* mutations impaired protein transactivation activity in all cases and lost their ability to DNA-binding, except for the mutation p.C247*. For mutations in the non-coding region, luciferase assays demonstrated that the activities of the affected transcriptional elements within the 5' promoter region and 5'UTR, were reduced to 50% for the combination c.-413G>A + c.-207C>A and drastically increased for the variations c.-133G>A and c.-762C>T; whereas no significant change had been observed for the c.-156_-139dup variation. The inclusion of additional patients in the investigation revealed two non described mutations, the p.C55S and p.M98Gfs*44, in two DSD 46,XY patients. A genotype-phenotype correlation, for the mutations at the coding region, was established with these results, whereas additional studies are necessary for the non coding variants. The results presented here demonstrate the importance of studying 5' regulatory region, since variations were found in eight out of 114 patients. The study revealed a total of 12 variations in the *NR5A1* gene in 17 46,XY DSD patients, highlighting the importance of the molecular study of this gene in a wide spectrum of DSD conditions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Desenvolvimento da genitália interna a partir do estágio indiferenciado...	22
Figura 2. Desenvolvimento da genitália externa a partir do estágio indiferenciado. .	23
Figura 3. Ilustração de alguns dos genes envolvidos na cascata do desenvolvimento sexual normal.	25
Figura 4. Classificação de Prader.....	30
Figura 5. Vias do desenvolvimento adrenal e gonadal.	32
Figura 6. Estrutura do gene <i>NR5A1</i>	35
Figura 7. Estrutura da proteína SF-1.	36
Figura 8. Elementos da região não codificante do gene <i>NR5A1</i>	38
Figura 9. Casos associados à mutações no gene <i>NR5A1</i>	41
Figura 10. Número de mutações identificadas nos diferentes domínios da proteína SF-1.	42
Figura 11. Porcentagem dos diagnósticos apresentados nesta casuística.	46
Figura 12. Estratégia para inserção da mutação no cDNA do gene <i>NR5A1</i>	52
Figura 13. Vetores escolhidos para os estudos funcionais da região não codificante do gene.	66
Figura 14. Distribuição das mutações identificadas no gene <i>NR5A1</i> e respectiva posição na proteína SF-1.	73
Figura 15. Parte dos eletroferogramas referentes a cada mutação identificada no DBD.....	74
Figura 16. Análise estrutural da mutação p.S32N.	75
Figura 17. Análise estrutural da mutação p.R39C.	76
Figura 18. Análise estrutural da mutação p.C65Y.	78
Figura 19. Resultados obtidos através dos estudos funcionais para as mutações identificadas no DBD da proteína SF-1.	80
Figura 20. Western Blot realizado a partir dos extratos celulares para as mutações identificadas no DBD.	81
Figura 21. Resultados obtidos através do EMSA para as mutações no identificadas no DBD.....	82
Figura 22. O domínio de ligação ao DNA da proteína SF-1.	83

Figura 23. Parte dos eletroferogramas referentes as duas mutações recentemente identificadas no DBD.	86
Figura 24. Análise estrutural da mutação p.C55S.	87
Figura 25. Representação da mutação p.M98Gfs*44 na estrutura da proteína SF-1.	88
Figura 26. Parte dos eletroferogramas referentes as duas mutações identificadas no LBD.	90
Figura 27. Resultados obtidos através dos estudos funcionais para as mutações identificadas no LBD da proteína SF-1.	92
Figura 28. Western Blot realizado a partir dos extratos celulares obtidos para as mutações identificadas no LBD.	93
Figura 29. Resultados obtidos através do EMSA para as mutações identificadas no LBD.	94
Figura 30. Parte da região não codificante do gene <i>NR5A1</i>	97
Figura 31. Parte dos eletroferogramas referentes as duas mutações identificas no éxon 1.	98
Figura 32. Parte dos eletroferogramas referentes as três mutações identificas na região promotora.	99
Figura 33. Análises <i>in silico</i> realizadas através do programa de predição <i>Alibaba2.1 Gene Regulation</i>	100
Figura 34. Análises <i>in silico</i> realizadas através do programa de predição <i>Alibaba2.1 Gene Regulation</i> , mostrando as alterações sofridas no sítio de reconhecimento para o fator de transcrição SP1.	101
Figura 35. Resultados obtidos através dos ensaios de Luciferase para as alterações identificadas no éxon 1 do gene <i>NR5A1</i>	103
Figura 36. Parte dos eletroferogramas referente ao sequenciamento dos clones mutantes contendo as alterações c.-413G>A e c.-207C>A.	104
Figura 37. Resultados obtidos através dos ensaios de Luciferase para as alterações identificadas na região promotora do gene <i>NR5A1</i>	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos DDS segundo o Consenso de Chicago de 2006 (HUGHES et al., 2006).	29
Tabela 2. Genes alvos regulados pelo SF-1 nos diferentes tecidos. Adaptado de (HOIVIK et al., 2010).	33
Tabela 3. Descrição clínica dos pacientes que apresentaram mutações no gene <i>NR5A1</i>	48
Tabela 4. Sequência dos primers utilizados para construção de cada clone mutante.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

c.	Posição do nucleotídeo no cDNA
cDNA	DNA Codificante
DBD	<i>DNA Binding Domain</i> (Domínio de Ligação ao DNA)
DDS	Distúrbios da Diferenciação do Sexo
DG	Disgenesia Gonadal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
EMSA	Ensaio de Deslocamento da Mobilidade Eletroforética
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
HAM	Hormônio Anti-Mulleriano
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i> (Domínio de Ligação ao DNA)
LH	Hormônio Luteinizante
mRNA	RNA mensageiro
NR5A1	<i>Nuclear Receptor Subfamily 5, Group A, Member 1</i>
p.	Posição do aminoácido na proteína
pb	Pares de base
PBD	<i>Protein Data Bank</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SBF	Soro Fetal Bovino

SF-1	<i>Steroidogenic Factor – 1</i>
SRY	<i>Sex - Determining Region On The Y Chromosome</i>
STAR	<i>Steroidogenic Acute Regulatory Protein</i>
T	Testosterona
Tm	Temperatura de <i>Melting</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
WT	<i>Wild-Type</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1.	DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO SEXUAL	20
1.2.	DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO DO SEXO	26
1.3.	O GENE NR5A1 E A PROTEÍNA SF-1	31
1.3.1.	O papel do gene <i>NR5A1</i> no desenvolvimento sexual normal	31
1.3.2.	A estrutura do gene e da proteína	34
1.3.3.	Região não codificante do gene <i>NR5A1</i>	37
1.3.4.	Os diferentes fenótipos relacionados a mutações no gene <i>NR5A1</i>	38
1.4.	JUSTIFICATIVA	43
2.	OBJETIVOS	44
3.	CASUÍSTICA E MÉTODOS	45
3.1.	CASUÍSTICA	45
3.2.	MÉTODOS	50
3.2.1.	Análise funcional das mutações identificadas na região codificante do gene <i>NR5A1</i>	50
3.2.1.1.	Construção dos clones mutantes	50
3.2.1.2.	Clonagem e transformação	55
3.2.1.3.	Seleção das colônias positivas	56
3.2.1.4.	Extração de plasmídeo em pequena escala (Miniprep)	56
3.2.1.5.	Digestão do inserto e ligação no vetor de expressão	57
3.2.1.6.	Extração de plasmídeo em grande escala (Maxiprep)	59
3.2.1.7.	Cultura de Células e Transfecção Transiente	59
3.2.1.8.	Ensaio de Luciferase	60

3.2.1.9.	Western Blot	61
3.2.1.10.	Ensaio de Deslocamento da Mobilidade Eletroforética	63
3.2.2.	Análise funcional das mutações identificadas na região não codificante do gene <i>NR5A1</i>	65
3.2.2.2.	Escolha dos vetores de expressão	65
3.2.2.3.	Amplificação da região de interesse	67
3.2.2.4.	Clonagem, transformação, seleção de colônias positivas e extração de plasmídeo em pequena escala	68
3.2.2.5.	Digestão do inserto e ligação ao vetor de expressão	68
3.2.2.6.	Cultura de Células e Transfecção Transiente	69
3.2.2.7.	Ensaio de expressão da Luciferase	69
3.2.3.	Estudos in silico.....	70
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.1.	MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO DNA	73
4.1.1.	Descrição das mutações p.S32N, p.R39C e p.C65Y	73
4.1.2.	Estudos funcionais das mutações no DBD.....	78
4.1.2.1.	Atividade transcricional através do gene da luciferase e Western Blot	78
4.1.2.2.	Ensaio de Deslocamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA)	81
4.1.3.	O impacto das mutações no DBD na proteína formada	83
4.1.4.	Mutações recentemente identificadas no gene <i>NR5A1</i> (p.C55S e p.M98Gfs*44)	85
4.2.	MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO LIGANTE	89

4.2.1.	Descrição das mutações p.C247* e p.K396Rfs*34	89
4.2.2.	Estudos funcionais das mutações no LBD	90
4.2.2.1.	Atividade transcricional através do gene da luciferase e Western Blot	91
4.2.2.2.	Ensaio de Deslocamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA)	93
4.2.3.	O impacto das mutações no LBD na proteína formada.....	95
4.4.	MUTAÇÕES IDENTIFICADAS DA REGIÃO NÃO CODIFICANTE DO GENE NR5A1	97
4.4.1.	Descrição das alterações c.-762C>T, c.-413G>A, c.-207C>A, c.-156_-139dup e c.-133G>A.....	97
4.4.2.	Predições <i>in silico</i> para as alterações da região não codificante..	100
4.4.3.	Estudos funcionais para as alterações da região não codificante	102
4.4.4.	O impacto das alterações identificadas na região não codificante para a expressão do gene <i>NR5A1</i>	105
4.5.	VISÃO GERAL DAS MUTAÇÕES NO GENE NR5A1	108
5.	CONCLUSÕES	111
6.	REFERÊNCIAS	113
7.	ANEXOS	126
	Anexo 1: Mutações previamente descritas na literatura no gene NR5A1.	126
	Anexo 2: Meios e Soluções.....	132
	Anexo 3: Artigo Publicado.	133
	Anexo 4: Parecer Comitê de Ética.	143
	Anexo 5: Parecer CIBio.....	145
	Anexo 6: Declaração de Direitos Autorais.....	146

1. INTRODUÇÃO

1.1. DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO SEXUAL

O processo de desenvolvimento sexual em mamíferos é de extrema importância para garantir a continuidade e diversidade genética entre as espécies, e pode ser dividido em duas etapas principais: a determinação e a diferenciação sexual. A determinação sexual resulta na formação de testículos ou ovários, de acordo com o sexo genético estabelecido no momento da fecundação; ao passo que, a diferenciação sexual ocorre em resposta aos hormônios produzidos pelas gônadas, contribuindo para o desenvolvimento dos ductos genitais e da genitália externa, bem como para completar o fenótipo sexual do indivíduo na puberdade (ARBOLEDA et al., 2015; MACIEL-GUERRA; GUERRA JÚNIOR, 2010).

Do ponto de vista embriológico, a partir da quarta semana de gestação inicia-se o estado sexualmente neutro ou indiferenciado. Neste estágio ocorre a formação das cristas urogenitais, que irão se desenvolver e originar as saliências gonadais (Figura 1). Neste processo ocorre a migração das células germinativas primordiais, que posteriormente serão cercadas pelos cordões sexuais primários, originando os ductos de Müller e os ductos de Wolff. A genitália externa por sua vez, é formada apenas por um tubérculo genital, saliências labioescrotais e pregas urogenitais. A diferenciação subsequente, para o sexo masculino ou feminino, tanto da genitália interna quanto da externa, irá depender do sexo genético do embrião (MACIEL-GUERRA; GUERRA JÚNIOR, 2010).

O sexo genético é estabelecido no momento da fertilização através da herança de um cromossomo X ou Y paterno. O cariótipo 46,XY corresponde ao sexo masculino, enquanto o cariótipo 46,XX corresponde ao sexo feminino. A presença do cromossomo Y é responsável por guiar a gônada bipotente em direção a diferenciação testicular, enquanto que a sua ausência, irá resultar na diferenciação ovariana. Ainda nessa fase, ocorre a expressão do gene *SRY* (*Sex-determining Region on the Y chromosome*), localizado no cromossomo Y, que irá iniciar a

cascata de expressão gênica dentro das células de Sertoli, levando à diferenciação morfológica dos testículos (ARBOLEDA et al., 2015; GOODFELLOW; DARLING, 1988).

No cariótipo 46,XY, a partir da sexta semana de gestação, as células epiteliais irão se diferenciar em células de Sertoli, e as células mesênquimais originarão as células de Leydig. No testículo já diferenciado, a partir da sétima semana as células de Sertoli irão produzir o hormônio antimülleriano (HAM), que é responsável pela regressão dos ductos de Müller (primórdios da genitália interna feminina). Já na oitava e nona semana, as células de Leydig fetais irão produzir testosterona, que será responsável por manter os ductos de Wolff (Figura 1). Além disso, sob a ação da enzima 5-alfa-reductase tipo 2, a testosterona será convertida em diidrotestosterona (DHT), levando à virilização da genitália externa. Nessa fase, ocorre uma fusão das saliências labioescrotais, originando a bolsa escrotal, o tubérculo genital forma a glândula do pênis, e a fusão das pregas urogenitais dão origem a uretra peniana (Figura 2).

Por outro lado, no cariótipo 46,XX, como não há a ação do gene *SRY*, não ocorrerá a diferenciação testicular, e ao final da 10ª semana da gestação, será iniciado o processo de diferenciação ovariana. Neste estágio, os cordões sexuais primários, dão origem aos cordões sexuais secundários, as células mesenquimais se diferenciam em células foliculares e as células germinativas primordiais originam as ovogônias. Na ausência de células de Sertoli produzindo HAM, os ductos de Müller se desenvolvem, formando o trato genital feminino. Como também não há células Leydig, não haverá testosterona, nem diidrotestosterona, levando assim a fragmentação do ductos de Wolff e a não virilização da genitália externa, respectivamente (Figura 1). O tubérculo genital dá origem a glândula e a haste do clitóris, as pregas urogenitais formam os pequenos lábios e o seio urogenital origina a uretra na porção inferior da vagina (Figura 2) (GOODFELLOW; DARLING, 1988; MACIEL-GUERRA; GUERRA JÚNIOR, 2010; MCELREAVEY et al., 1993).

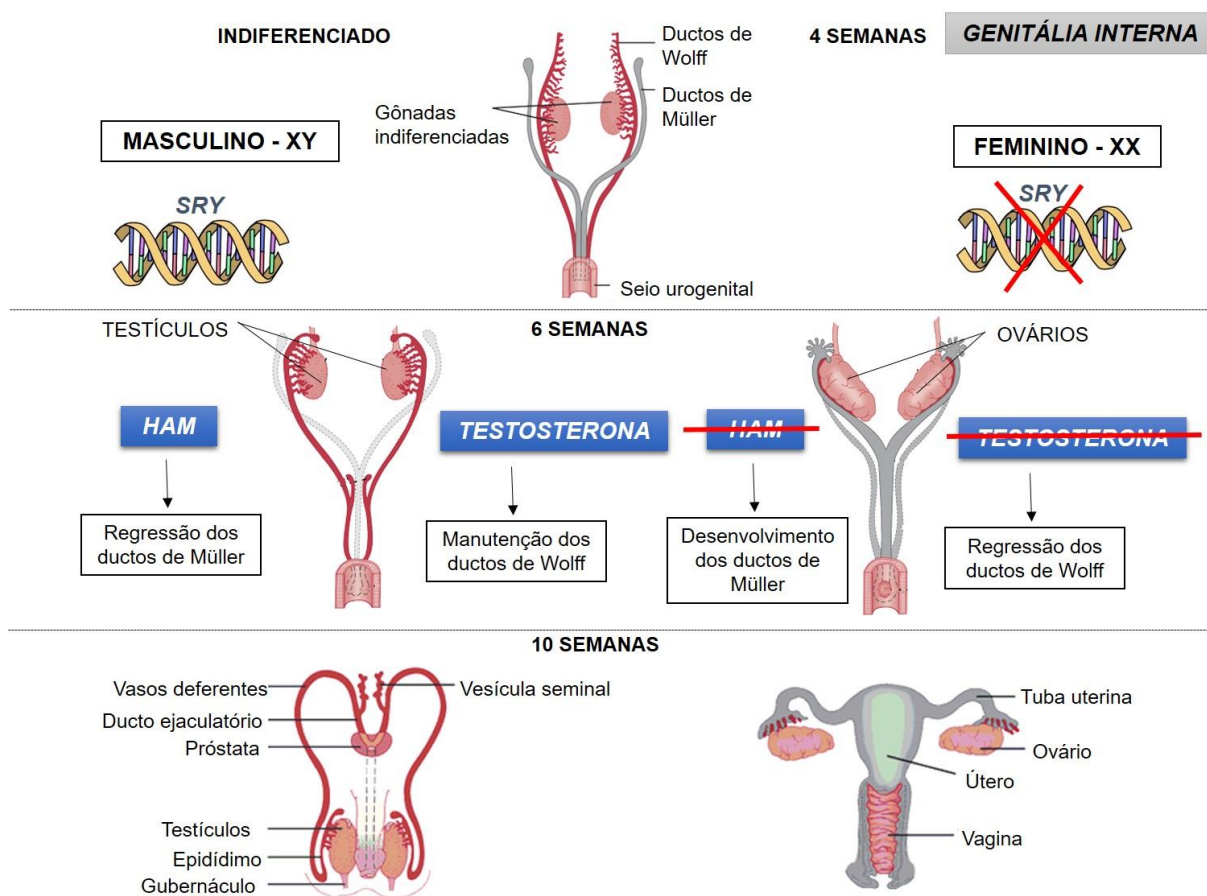


Figura 1. Desenvolvimento da genitália interna a partir do estágio indiferenciado.

As gônadas bipotentes irão se diferenciar em testículos, na presença do gene *SRY* localizado no cromossomo Y, ou em ovários, na ausência do mesmo. A partir da 6ª semana de gestação, os testículos irão produzir HAM e testosterona, responsáveis por regredir os ductos de Müller e manter os ductos de Wolff. Na ausência desses hormônios, que não serão produzidos pelos ovários, os ductos de Müller irão se manter e os de Wolff se fragmentar. A partir da 10ª semana de gestação, os ductos de Wolff e de Müller irão se desenvolver, originando a genitália interna masculina e feminina, respectivamente (Adaptado de http://www.pediatricurologybook.com/embryology_urinary_tract.html).

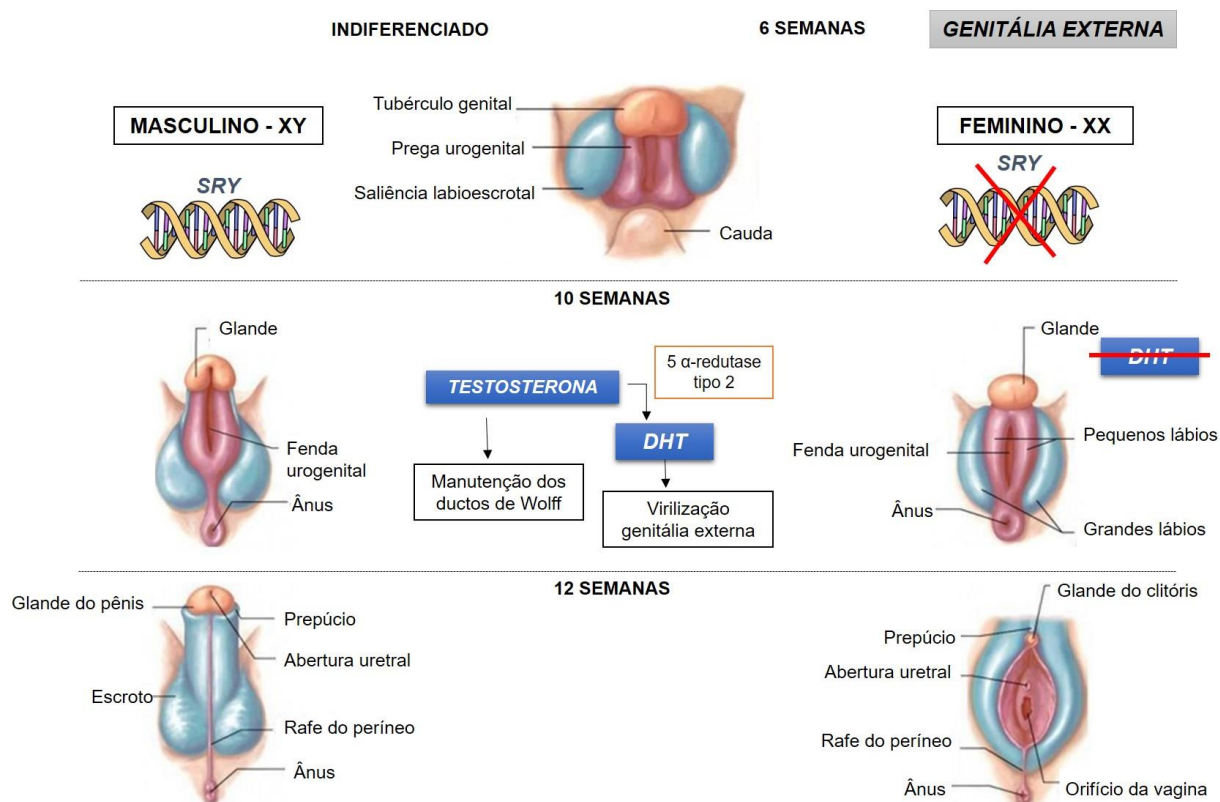


Figura 2. Desenvolvimento da genitália externa a partir do estágio indiferenciado.

Até a 6ª semana de gestação, a genitália externa permanece no estágio indiferenciado, e irá se desenvolver de acordo com o sexo genético estabelecido no momento da fecundação. À esquerda: na presença do gene *SRY*, associado a outros genes envolvidos na diferenciação testicular normal, a partir da 10ª semana de gestação, a testosterona será convertida em diidrotestosterona na presença da enzima 5 alfa-redutase tipo 2, hormônio responsável por virilizar a genitália externa masculina. A direita: na ausência de *SRY*, as gônadas não irão se diferenciar em testículos, sendo assim não haverá células de Leydig produzindo hormônios androgênicos, e por essa razão a genitália feminina não viriliza. (Adaptado de <http://www.lifewithgremlins.com/when-can-you-tell-the-gender-of-a-baby-external-gender-development/>).

Para que os processos de diferenciação e determinação sexual ocorram, outros genes, além do *SRY*, devem ser expressos corretamente. Existe uma complexa cascata de genes reguladores que irão atuar em todos os estágios do desenvolvimento sexual (Figura 3). No estágio indiferenciado da gônada, ocorre a expressão de diversos genes, como por exemplo, o *WT1* (*Wilms Tumor Suppressor Locus – Gene 1*) e o *GATA4* (*GATA Binding Protein 4*). O gene *WT1*, codifica uma proteína que se expressa nos rins e nas gônadas em desenvolvimento, e que quando alterada, pode causar o tumor de *Wilms* e ambiguidade genital, estando relacionada com a síndrome de Denys-Drash e de Frasier. O *WT1* age diretamente na expressão de outros genes, como *NR0B1* (*Nuclear Receptor Subfamily 0, Group B, Member 1*), *WNT4* (*Wingless-Type Mmtv Integration Site Family, Member 4*) e *HAM* (*Anti-Müllerian Hormone*), e é expresso juntamente com o *NR5A1* (*Nuclear Receptor Subfamily 5, Group A, Member 1*). Já o gene *GATA4* age como um regulador da expressão gênica nas gônadas, atuando no desenvolvimento das linhagens de células somáticas, como por exemplo, as células de Sertoli (BIASON-LAUBER, 2010).

Como descrito anteriormente, o gene que desencadeia a formação dos testículos em indivíduos 46,XY é o *SRY*, que uma vez expresso, interage com o *SOX9* (*SRY-Related HMG-Box Gene 9*) para guiar a diferenciação e proliferação das células de Sertoli. O gene *NR5A1* atua em conjunto com esses dois genes, e os três são fundamentais para a determinação testicular; além disso nas células precursoras de Sertoli, este interage com *GATA4*, e ambos regulam a expressão do *SRY* (ARBOLEDA et al., 2015; BIASON-LAUBER, 2010). Ainda nos testículos, as células de Sertoli, pela ação do gene *HAM*, irão produzir o hormônio antimülleriano; enquanto que, as células de Leydig, estimuladas pelo gene *AR* (*Androgen Receptor*), irão produzir testosterona. Essa testosterona será convertida em diidrotestosterona pela enzima 5-alfa-redutase tipo 2, codificada pelo gene *SRD5A2* (*Steroid 5-Alpha-Reductase 2*), sendo responsável pela diferenciação da genitália externa masculina. O gene *INSL3* (*Insulin-Like 3*), também é expresso nas células de Leydig, sendo responsável por estimular a descida testicular para a bolsa escrotal (BAXTER et al., 2015; MACIEL-GUERRA; GUERRA JÚNIOR, 2010). Além desses, outros genes estão envolvidos na diferenciação testicular, como por exemplo: *DMTR1* (*Doublesex and MAB3-Related Transcription Factor 1*) e *DMRT2* (*Doublesex*

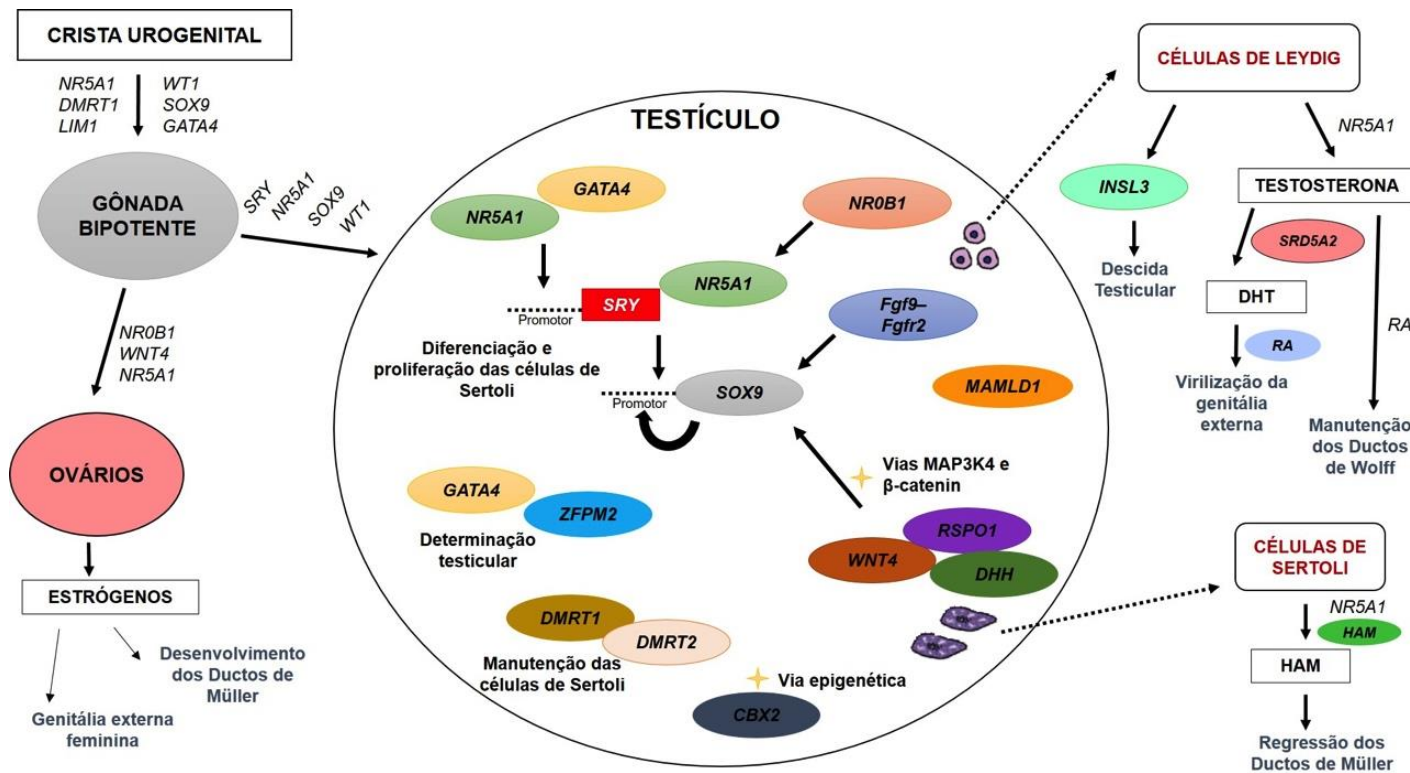


Figura 3. Ilustração de alguns dos genes envolvidos na cascata do desenvolvimento sexual normal.

Como é possível observar os genes estão envolvidos em todas as etapas do desenvolvimento, desde a origem da gônada bipotente a partir da crista urogenital, até a produção de hormônios pelos ovários e testículos. A via de diferenciação sexual feminina se apresenta um pouco mais simples quando comparada com a masculina, entretanto alguns genes como *WNT4*, *NR5A1* e *NR0B1* são fundamentais para a produção de estrógenos e o desenvolvimento normal da genitália interna e externa feminina. Já na via de diferenciação masculina, além do *SRY* (indicado pelo quadrado vermelho), a expressão e regulação de outros genes também são essenciais, como por exemplo do *SOX9*, *NR5A1*, *GATA4*, *RA*, *SRD5A2*, *HAM*, entre outros. Estes genes atuam para manter e estimular as células de Leydig e de Sertoli a produzirem testosterona e HAM, respectivamente; ambos são fundamentais para a formação da genitália interna e externa masculina.

and MAB3-Related Transcription Factor 2), *ZFPM2* (Zinc Finger Protein, Multitype 2), *DHH* (Desert Hedgehog), *RSPO1* (R-Spondin Family, Member 1), *MAMLD1* (Mastermind-Like Domain-Containing Protein 1), *CBX2* (Chromobox Homolog 2, *Drosophila Polycomb Class*), *ATRX* (X-Linked Nuclear Protein Gene), entre outros (ARBOLEDA et al., 2015; BIASON-LAUBER, 2010; MACIEL-GUERRA; GUERRA JÚNIOR, 2010).

Dentro do conhecimento atual, o número de genes associados com o desenvolvimento ovariano é sem dúvida bem menor do que os relacionados com o desenvolvimento testicular, e ainda não se conhece nenhum gene equivalente ao *SRY* para a diferenciação ovariana. Apesar disso, a expressão de alguns genes tem se mostrado importante no momento da diferenciação das células da granulosa e da teca, tais como o *WNT4*, o *RSP01* e o *NR5A1*, que atuam juntamente com a proteína β -catenina e são responsáveis por suprimir a expressão de genes específicos do desenvolvimento testicular, como por exemplo o *SOX9* (ARBOLEDA et al., 2015; BASHAMBOO et al., 2017; MACIEL-GUERRA; GUERRA JÚNIOR, 2010).

Todos esses genes devem agir em conjunto para que o desenvolvimento sexual ocorra de forma correta, caso contrário, toda a cascata poderá ser prejudicada. Uma mutação em algum dos genes envolvidos neste processo, pode acarretar em diferentes fenótipos dentro da condição conhecida por “Distúrbios da Diferenciação do Sexo”, que será abordada no tema a seguir.

1.2. DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO DO SEXO

O termo Distúrbio da Diferenciação do Sexo (DDS) refere-se ao desenvolvimento genital ou gonadal incompleto ou desordenado, levando a uma discordância entre o sexo genético, gonadal e fenotípico do indivíduo afetado (HUGHES et al., 2006). Não há um número exato sobre a incidência de pacientes que apresentam genitália ambígua ao nascimento, mas a estimativa está entre 1 para 4.500-5.500 nascimentos. A incidência estimada para indivíduos com cariótipo 46,XY que apresentam DDS é de 1 para 20.000, entretanto se forem contabilizadas

as condições como hipospádia e criptorquidismo, esse número aumenta consideravelmente, ficando entre 1:200 e 1:300 nascimentos (BASHAMBOO et al., 2016; LEE et al., 2016).

Para classificar esses pacientes, por muito tempo se usaram termos considerados pejorativos para os pacientes, como por exemplo: “intersexo”, “pseudo-hermafroditismo”, “hermafrodita”, “sexo reverso”, entre outros (HUGHES et al., 2006). Por essa razão em 2006, foi realizado um consenso em Chicago com especialistas da área, para melhor designar essa classe de condições, dividindo os pacientes em grupos de acordo com suas características clínicas e genéticas, criando uma nova nomenclatura considerada mais apropriada para cada uma delas. Dessa forma, alguns termos foram substituídos, como: “pseudo-hermafroditas” feminino ou masculino, passou a ser “DDS 46,XX” ou “DDS 46,XY”, respectivamente; “hermafroditismo” verdadeiro, foi substituído por “DDS ovário testicular”; “sexo reverso” XX e XY, passaram a ser “46,XX DDS testicular” e “disgenesia gonadal completa 46,XY”, respectivamente; enquanto que “intersexo” foi designado como “Distúrbio da Diferenciação do Sexo”. Esta nova classificação, dividiu os DDS em três principais grupos, mostrados na Tabela 1 (HUGHES et al., 2006).

Uma característica comum em grande parte dos pacientes com DDS é a presença de genitália ambígua, sendo, muitas vezes, o primeiro indício da condição que é observado logo ao nascimento. A investigação da origem da ambiguidade genital antes da definição do sexo de criação é fundamental, uma vez que, caso contrário, isso poderá acarretar problemas psicossociais para a criança e seus familiares (MACIEL-GUERRA; GUERRA JÚNIOR, 2010). Em geral, a ambiguidade genital, pode ser considerada nos seguintes casos (DAMIANI et al., 2001):

Em genitália de aspecto aparente masculino:

- Gônadas não palpáveis;
- Tamanho peniano abaixo do normal;
- Gônadas pequenas;
- Presença de massa inguinal que pode corresponder a útero e trompas rudimentares;

- Hipospádia.

Em genitália de aspecto aparente feminino:

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

Tabela 1. Classificação dos DDS segundo o Consenso de Chicago de 2006 (HUGHES et al., 2006).

<i>DDS associados a anormalidades cromossômicas</i>	<i>DDS 46,XY</i>	<i>DDS 46,XX</i>
(A) 45,X (Síndrome de Turner e suas variantes) (B) 47,XXY (Síndrome de Klinefelter e variantes) (C) 45,X/46,XY (disgenesia gonadal mista e DDS ovário testicular) (D) 46,XX/46,XY (quimera e DDS ovário testicular)	(A) Distúrbios da diferenciação gonadal (testicular) <ol style="list-style-type: none"> 1. Disgenesia gonadal completa 2. Disgenesia gonadal parcial 3. Regressão testicular 4. DDS ovário testicular (B) Distúrbios na ação ou produção de andrógenos <ol style="list-style-type: none"> 1. Defeitos na produção de testosterona (ex: deficiência de 17-OH, deficiência de 5-alfa-redutase tipo 2, mutações no gene STAR) 2. Defeitos na ação androgênica (ex: Insensibilidade total e parcial a andrógenos) 3. Defeitos no receptor de LH (ex: hipoplasia de células de Leydig, aplasia) 4. Distúrbios no HAM e no receptor do HAM (Persistência dos ductos de Müller) (C) Outros (ex: hipospádia severa, extrofia cloacal)	(A) Distúrbios da diferenciação gonadal (ovariana) <ol style="list-style-type: none"> 1. DDS ovário testicular 2. DDS testicular (ex: <i>SRY+</i>, dup <i>SOX9</i>) 3. Disgenesia Gonadal (B) Excesso de andrógenos <ol style="list-style-type: none"> 1. Fetal (ex: deficiência de 21-hidroxilase e 11-hidroxilase) 2. Fetoplacentária (deficiência da aromatase e POR) 3. Materna (luteoma, fatores exógenos, etc.) (C) Outros (ex: extrofia cloacal, atresia vaginal, outras síndromes)

Para melhor descrever a aparência de uma genitália externa ambígua, Prader, em 1954, criou critérios ao classificar pacientes 46,XX com hiperplasia adrenal congênita de acordo com o grau de virilização que essas meninas apresentavam (Figura 4), desde o mais leve (Prader I) até o mais virilizado (Prader V) (DAMIANI et al., 2001; MACIEL-GUERRA; GUERRA JÚNIOR, 2010). Desde então, esse critério é usado também para classificar a ambiguidade genital em todos os casos de DDS.

- Prader I - genitália de aspecto feminino, com aumento isolado do falo;
- Prader II - maior aumento do falo, associado à fusão posterior das saliências labioescrotais, sem seio urogenital;
- Prader III - importante aumento do falo, associado à fusão quase completa das saliências labioescrotais, e presença de seio urogenital com abertura perineal;
- Prader IV - falo de aspecto peniano, associado à fusão completa das saliências labioescrotais, e presença de seio urogenital com abertura uretral na base do falo;
- Prader V - falo de aspecto peniano bem desenvolvido, associado à fusão completa das saliências labioescrotais, e abertura da uretra na extremidade da glândula.

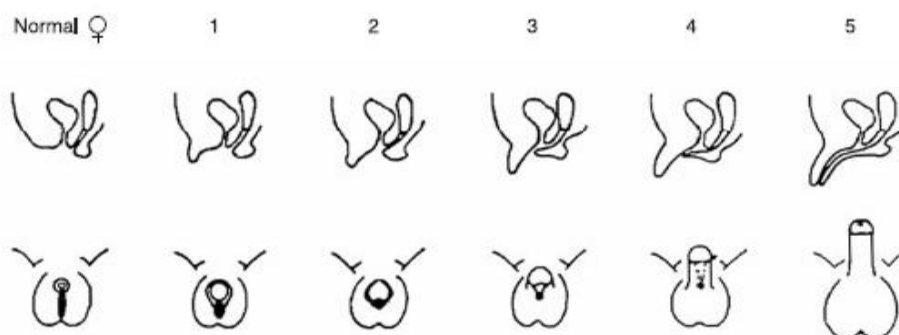


Figura 4. Classificação de Prader.

Graus de ambiguidade genital que Prader utilizou para classificar pacientes 46,XX com hiperplasia adrenal congênita e que foi, desde então, também utilizado para outras DDS. A classificação é a partir de uma genitália feminina normal, partindo do mais leve (grau 1) até o mais virilizado (grau 5) (MACIEL-GUERRA; GUERRA JÚNIOR, 2010).

1.3. O GENE *NR5A1* E A PROTEÍNA SF-1

1.3.1. O papel do gene *NR5A1* no desenvolvimento sexual normal

O gene *NR5A1* exerce um papel fundamental durante a esteroidogênese e o desenvolvimento sexual, regulando diversas etapas do desenvolvimento adrenal e gonadal (Figura 5) (LUO; IKEDA; PARKER, 1994). Durante o desenvolvimento embrionário, SF-1 aparece primeiramente na crista urogenital, representando o primeiro passo da diferenciação adrenal e gonadal, estimulando a diferenciação dos testículos a partir da gônada bipotente (OZISIK; ACHERMANN; JAMESON, 2002). Para a determinação testicular, o gene *NR5A1*, atua em conjunto com o *SRY* e o *SOX9* (BIASON-LAUBER, 2010). Nas células de Sertoli, ele regula a expressão do gene *HAM*, levando à regressão dos ductos de Müller (LIN; ACHERMANN, 2008). Já nas células de Leydig, *NR5A1* regula a expressão de algumas enzimas esteroidogênicas, como STAR, CYP11A1 e CYP17A1, necessárias para a produção de testosterona, levando à manutenção dos ductos de Wolff e à virilização da genitália externa. *NR5A1* também aumenta a expressão do gene *INSL3*, regulando a descida testicular (ARBOLEDA et al., 2015; ZIMMERMANN et al., 1998). Nos ovários, a proteína SF-1 também é expressa, tanto nas células esteroidogênicas quanto nas não esteroidogênicas, participando da produção de estrógenos e, juntamente com a proteína β -catenina, aumentando a expressão de genes que inibem a diferenciação testicular, como por exemplo, o *NR0B1* (BASHAMBOO et al., 2017; BUAAS et al., 2012).

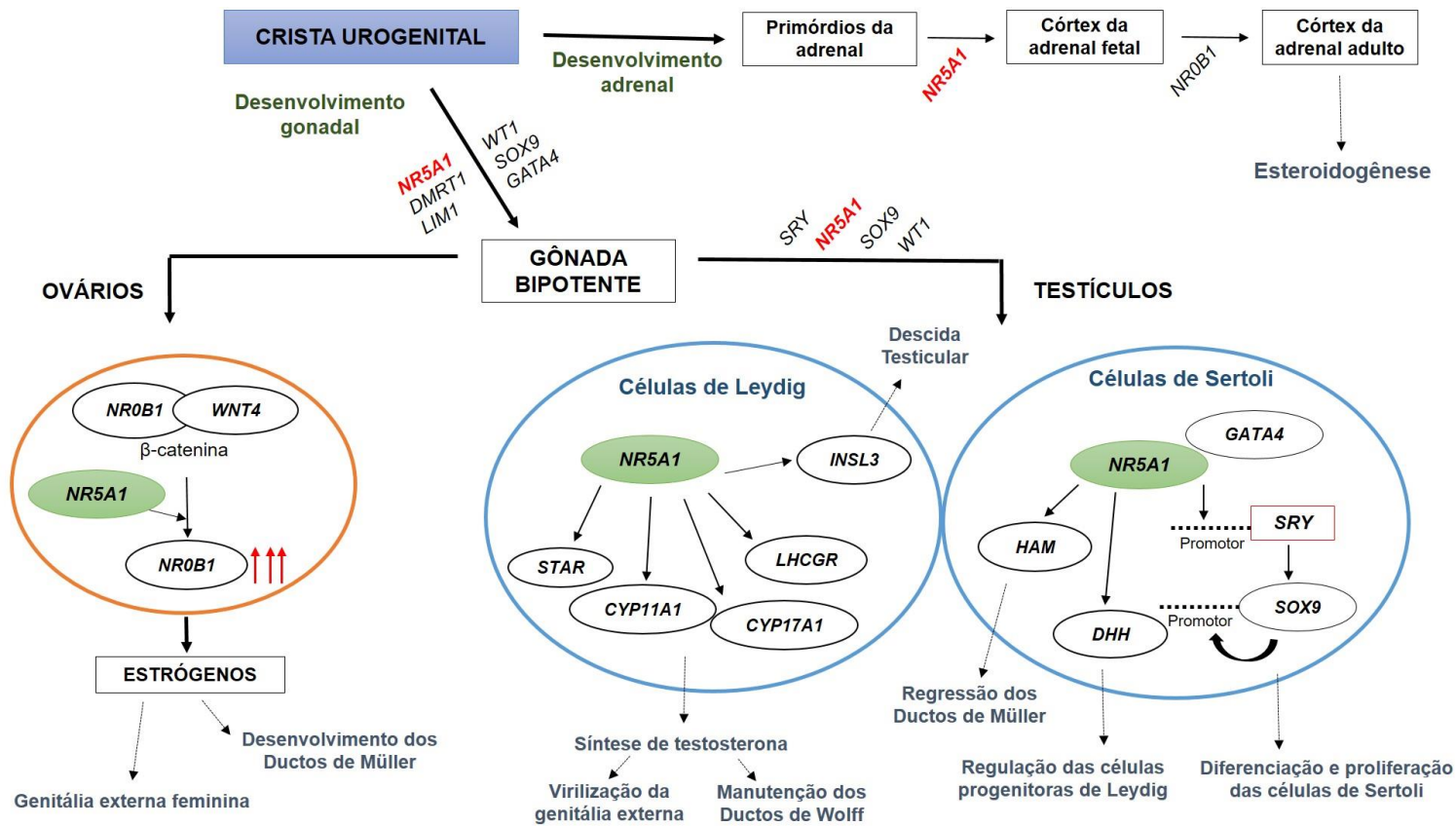


Figura 5. Vias do desenvolvimento adrenal e gonadal.

Esquema representando as vias do desenvolvimento adrenal e gonadal, nas quais o gene *NR5A1* atua. A partir da crista urogenital, o *NR5A1* será expresso e, juntamente com outros genes, irá regular o processo de esteroidogênese durante o desenvolvimento adrenal, bem como, a diferenciação ovariana e testicular, no desenvolvimento gonadal. Nos testículos, o gene *NR5A1*, atua tanto nas células de Sertoli quanto nas células de Leydig, regulando diversos genes envolvidos na produção de hormônios androgênicos. Nos ovários, o *NR5A1* também atua, participando do processo de produção de estrógenos.

Dessa maneira, é possível observar que o gene *NR5A1* regula a atividade de diversos genes, tanto no processo de diferenciação gonadal como adrenal, bem como no eixo hipotálamo-hipófise. Por essa razão, vale ressaltar que, um dos motivos pelo qual a correlação genótipo-fenótipo para mutações no *NR5A1* se torna tão difícil é devido a este amplo grupo de genes alvos regulados por ele. A tabela 2 indica alguns dos genes alvos regulados pelo *NR5A1* nos diferentes tecidos.

Tabela 2. Genes alvos regulados pelo SF-1 nos diferentes tecidos. Adaptado de (HOIVIK et al., 2010).

Tecidos	Células/ estruturas	Genes alvos
Córtex da adrenal	Zona glomerulosa	<i>CYP11B2, CYP21, NR0B1, NR0B2, CYP11A1, CYP17, HSD3B, StAR, SCP2, SRB1, NPC1</i>
	Zona fasciculada	<i>CYP11B2, CYP21, NR0B1, NR0B2, MC2R, AKR1B7, CYP11A1, CYP17, HSD3B, StAR, SCP-2, SRB1, NPC1</i>
	Zona reticular	<i>CYP11B1, CYP21, NR0B1, NR0B2, MC2R, SULT2A1, CYP11A1, CYP17, HSD3B, StAR, SCP2, SRBI, NPC1</i>
Ovário	Células da Teca	<i>INHA, NR0B1, CYP11A1, CYP17, HSD3B, StAR, SCP2, SRBI, NPC1, WNT4</i>
	Células da Granulosa	<i>CYP19, HAM, CYP11A1, CYP17, HSD3B, StAR, SCP2, SRBI, NPC1, WNT4</i>
	Corpo lúteo	<i>CYP19, OXT, CYP11A1, CYP17, HSD3B, StAR, SCP2, SRBI, NPC1</i>
Testículo	Células de Leydig	<i>CYP19, INSL3, PRL-R, NR0B1, SRY, VNN1, HMGC2, CYP11A1, CYP17, HSD3B, StAR, SCP2, SRBI, NPC1, LHCGR, INSL3</i>
	Células de Sertoli	<i>CYP19, HAM, FSHR, SRY, SOX9, VNN1, DHH</i>
Hipófise	Gonadotrofinas	<i>LHB, FSHB, GNRHR, CGA, NOS1, INHA</i>
Hipotálamo	Ventromedial	<i>NMDAR, BDNF</i>

1.3.2. A estrutura do gene e da proteína

Em 1992, dois grupos de pesquisa independentes, estudando citocromos da família P450, encontram um fator de transcrição que exercia um papel muito importante na regulação de alguns genes esteroideogênicos e que se assemelhava com outros genes da família dos receptores nucleares. O grupo de K. L. Parker (LALA; RICE; PARKER, 1992) isolou esse fator de transcrição de células tumorais adrenocorticais de camundongo (Y1) e o nomeou como SF-1 (*Steroidogenic fator 1*). Em paralelo, o laboratório de T. Omura (MOROHASHI et al., 1992), denominou-o como Ad4BP (*Adrenal 4-binding protein*), baseados na interação que o elemento Ad4 estabelecia com o promotor da proteína bovina CYP1B1. Atualmente, o mais usual na literatura são os termos *NR5A1* para referir-se ao gene, e SF-1, para mencionar a proteína.

Nos anos subsequentes após a sua descoberta, muitas pesquisas foram realizadas para melhor caracterização e compreensão sobre este fator de transcrição. Os estudos demonstraram que a proteína SF-1 é extremamente conservada entre as espécies, chegando a 95% de similaridade entre humanos e camundongos (HOIVIK et al., 2010). Inclusive, uma região do domínio de ligação ao DNA da proteína SF-1, denominada FTZ-F1, é idêntica à região homóloga de camundongos e a região *ftz homeobox* de *Drosophila melanogaster* (LALA; RICE; PARKER, 1992). Através dessa região, identificou-se que este gene se localizava no braço longo do cromossomo 9, mais precisamente na posição 9q33 (OMIM +184757), e que era transcrito da esquerda para direita, no sentido centrômero para telômero (Figura 6A) (SCHIMMER; WHITE, 2010; TAKETO et al., 1995). Sua estrutura é formada por 7 éxons, incluindo o éxon 1 não codificante, correspondendo a um tamanho genômico de 30 kb (Figura 6B) (OBA et al., 1996).

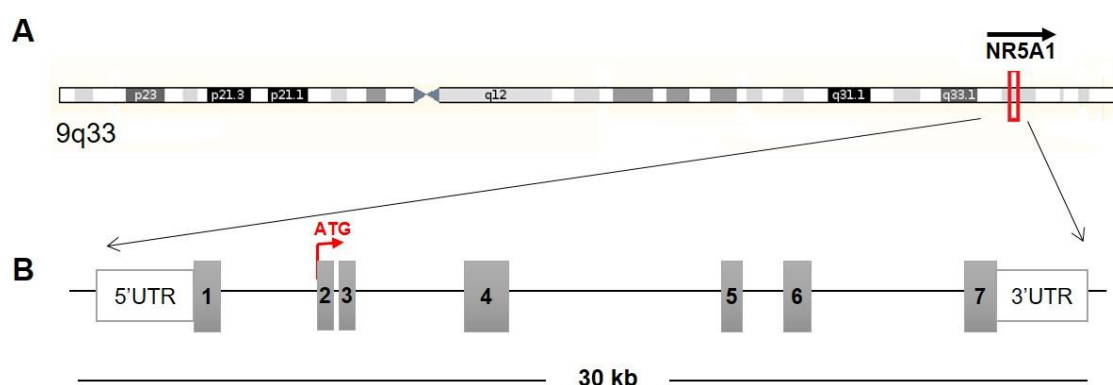


Figura 6. Estrutura do gene *NR5A1*.

A) Ilustração representativa da estrutura do gene *NR5A1*, localizado braço longo do cromossomo 9 (9q33); a seta preta representa o sentido da transcrição do gene, da esquerda para direita, sentido centrômero para telômero. **B)** O gene *NR5A1* tem um tamanho de 30 kb e é formado por 7 éxons, dando-se o início da tradução (ATG) no éxon 2 (seta vermelha), sendo o éxon 1 transcrito, porém não traduzido.

A proteína SF-1 é formada por 461 aminoácidos. Assim como um típico receptor nuclear, contém um domínio de ligação ao DNA (DBD), uma região de dobradiça (*hinge*), um domínio de ligação ao ligante (LBD), e outros dois domínios de ativação funcional (AF-1 e AF-2) (Figura 7) (WONG et al., 1996). Ao contrário da maioria dos receptores nucleares, esta proteína se liga ao DNA como um monômero, com alta afinidade para a região 5'YCAAGGYCR'3 (sendo Y = T/C; R = G/A) (UEDA; HIROSE, 1991). A região DBD é composta por dois dedos de zinco e se estende por uma região acessória, denominada FTZ-F1, importante para a ancoragem do DNA; possui também a região *P-box*, no primeiro dedo de zinco, que auxilia na estabilidade da interação DNA-proteína, além de garantir a especificidade que SF-1 tem que se ligar ao DNA como um monômero (LITTLE et al., 2006a; WONG et al., 1996). Na porção C-terminal do LBD localiza-se a região AF-2, que é fundamental para a atividade transcricional e a interação com outros cofatores; já a AF-1 não segue os padrões dos outros receptores nucleares, e ao invés de se localizar na porção N-terminal, se encontra na região de dobradiça (HAMMER et al., 1999; HOIVIK et al., 2010). Esta última, é importante para a

capacidade transcricional da proteína SF-1, pois contém sítios específicos para fosforilação e sumoilação (HOIVIK et al., 2010).

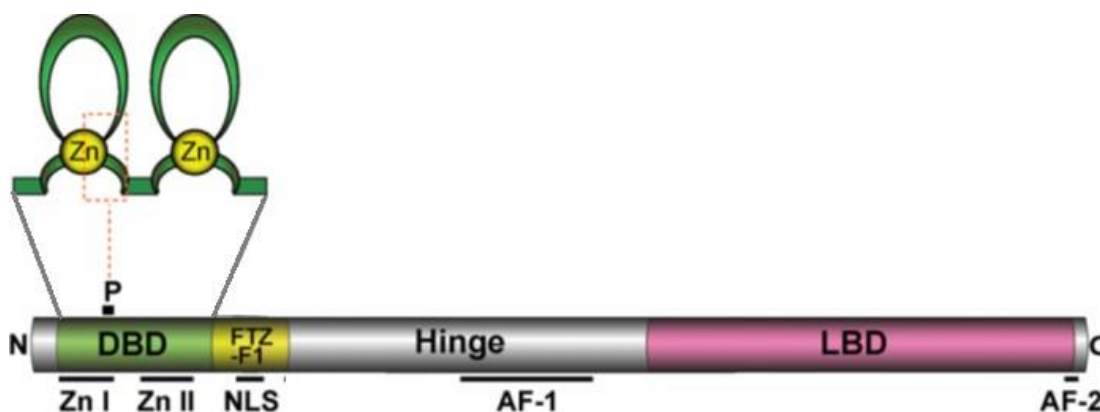


Figura 7. Estrutura da proteína SF-1.

Esquema representando a estrutura da proteína SF-1, que assim como um típico receptor nuclear, é formada por: um domínio de ligação ao DNA (DBD), uma região de dobradiça (*hinge*) e um domínio de ligação ao ligante (LBD). Dentro de seu DBD, existem dois dedos de zinco (Zn I, Zn II) e uma região denominada *P-box* (P), envolvida no reconhecimento de sequências de DNA alvo específicas pelos fatores nucleares. SF-1 também possui uma região acessória (FTZ-F1), contendo o sinal de localização nuclear (NLS), além de dois domínios de ativação funcional (AF-1 e AF-2). Adaptado de (HOIVIK et al., 2010).

Por muitos anos, a proteína SF-1 foi considerada como um receptor nuclear órfão, pelo fato de não ter sido encontrada nenhuma molécula que interagisse com seu domínio de ligação ao ligante e sua ativação fosse, dessa forma, constitutiva. Entretanto, alguns grupos identificaram alguns fosfolipídios e oxiesteróis (derivados do colesterol) interligados ao LBD e responsáveis por estimular a transcrição gênica (BERTHERAT, 1998; HOIVIK et al., 2010). Para comprovar isso, foram introduzidas algumas mutações pontuais na região em que o fosfolipídio se ligava, e isso fez com que tanto a atividade transcricional, quanto a capacidade de recrutar cofatores, fossem prejudicadas (WANG et al., 2005).

1.3.3. Região não codificante do gene *NR5A1*

A região não codificante do gene *NR5A1* é constituída pelo promotor proximal e o éxon 1, que não é traduzido. Até o momento, já foram identificados em ratos e camundongos, cinco diferentes éxons 1 (*Ia*, *Io*, *Ig*, *Ix* e *II*), localizados em regiões homólogas a de humanos. Esses diferentes éxons variam de acordo com cada espécie, dependendo do transcrito e do tecido a ser expresso (KIMURA et al., 2000). Segundo Kimura et al. (KIMURA et al., 2000), provavelmente nem todos esses éxons são expressos em humanos, sendo que o *Ia* é o que possui maior homologia entre as espécies, e é expresso em ratos e camundongos nos tecidos esteroideogênicos, fígado, hipotálamo e pituitária. Além disso, este grupo de pesquisadores acredita que possa haver diferentes promotores para cada um dos éxons 1, e que isso possa ser a base para explicar a capacidade que o gene tem em se expressar em diferentes tecidos; também presumem que esses múltiplos éxons possam fazer *splicing* alternativos, controlando a expressão do gene.

Os primeiros 110 pb da região flanqueadora 5' não contém uma região TATA *box* típica, como se é comum observar, porém possui alguns elementos regulatórios essenciais para a expressão do gene. O primeiro deles é o *E-box*, uma região reconhecida por fatores de transcrição da família bHLH (*basic helix-loop-helix*) que regulam a diferenciação muscular, neurogênese, hematopoiese e determinação sexual; o segundo elemento é o *CAAT-box*, um promotor proximal comum, que é reconhecido por diversas proteínas; e por último, a região *GA rich element*, à qual se liga o fator de transcrição *SP1* (WOODSON et al., 1997). Juntamente com esses elementos regulatórios, diversos outros fatores de transcrição também regulam a transcrição e a atividade transcricional do gene *NR5A1*, como por exemplo, o *GATA4*, *SOX9*, *WT1*, e *Lhx9* (Figura 8A) (HOIVIK et al., 2008).

Além disso, entre a região promotora do gene e o éxon 1, foram identificados 14 sítios de reconhecimento para CpGs, que quando metiladas fazem com que o promotor do SF-1 fique inativo, podendo explicar a expressão

específica que a proteína apresenta em diferentes tecidos (Figura 8B) (HOIVIK et al., 2008).

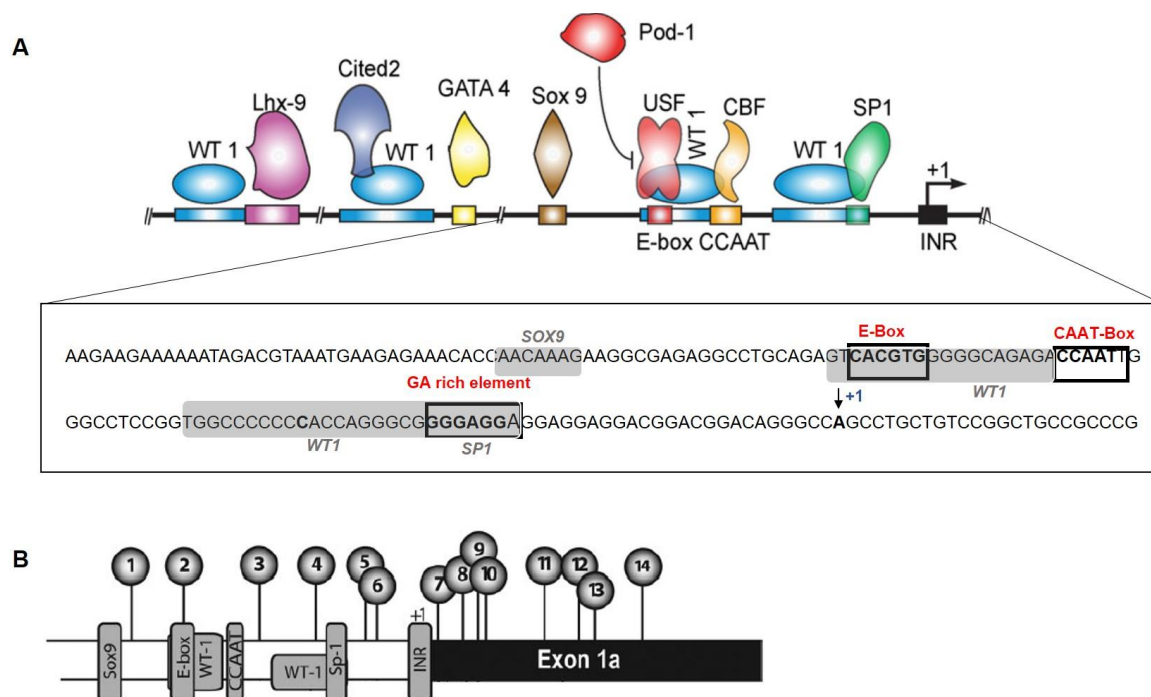


Figura 8. Elementos da região não codificante do gene *NR5A1*.

A) Esquema representando alguns dos fatores de transcrição que interagem com o promotor basal do *NR5A1* que antecede o início da transcrição do gene (INR) (HOIVIK et al., 2010). A caixa preta representa parte da sequência da região não codificante do gene *NR5A1*, contendo os três elementos regulatórios essenciais para atividade do SF-1, (E-box, CAAT-box e GA rich element), bem como sítios de reconhecimento para SOX9, WT1 e SP1 (em cinza). A seta indicando a posição +1, representa o início do éxon 1. **B)** Ilustração representando os 14 sítios CpGs encontrados entre a região 5' e parte do éxon 1, que estão envolvidos na regulação da expressão da proteína SF-1 em diferentes tecidos. [Adaptado de (HOIVIK et al., 2008)].

1.3.4. Os diferentes fenótipos relacionados a mutações no gene *NR5A1*

A primeira mutação descrita em seres humanos no gene *NR5A1* foi a alteração p.G35E em heterozigose, relatada em uma mulher 46,XY com

insuficiência adrenal primária, disgenesia gonadal completa e persistência dos dutos Müller (ACHERMANN et al., 1999). Posteriormente, foi descrita a mutação p.R92Q em uma criança com fenótipo similar ao da primeira paciente, mas neste caso a mutação foi encontrada em homozigose, e os heterozigotos identificados na mesma família não apresentavam nenhum quadro clínico de DDS (ACHERMANN et al., 2002). Devido as primeiras mutações terem sido encontradas em pacientes com fenótipos similares e sabendo do papel do *NR5A1* no desenvolvimento adrenal, por muito tempo acreditou-se que mutações neste gene estariam relacionadas sempre à insuficiência adrenal, porém hoje de acordo com o banco de dados *Human Gene Mutation Database* (HGMD), mais de 100 variantes foram identificadas, e apenas dois casos de insuficiência adrenal isolada foram reportados (BIASON-LAUBER; SCHOENLE, 2000; GURAN et al., 2016). Atualmente, mutações neste gene podem estar associadas a um espectro amplo de condições, incluindo disgenesia testicular com ou sem derivados de Müller, distúrbios na produção de andrógenos, hipospádia, infertilidade masculina, insuficiência ovariana primária, anorquia bilateral, amenorreia primária e alguns casos de tumores adrenais (FERRAZ-DE-SOUZA; LIN; ACHERMANN, 2011; PEDACE et al., 2014; SUNTHARALINGHAM et al., 2015).

A maior parte das mutações descritas no gene *NR5A1* até o momento foi identificada em heterozigose, indicando um padrão predominante de herança autossômica dominante para esse gene (MELLO et al., 2011; SUNTHARALINGHAM et al., 2015). Existe também um efeito de dose muito importante para o funcionamento do *NR5A1*, e em situações de heterozigose, é comum observar casos de haploinsuficiência associados a estas mutações (FABBRI et al., 2016; MALLET et al., 2004). Uma vez que apenas um dos alelos irá produzir a proteína normal, supõe-se que a quantidade produzida seja suficiente para permitir o desenvolvimento adrenal normal, porém insuficiente para o desenvolvimento gonadal, provavelmente pelo fato dos testículos serem mais sensíveis à perda de função de SF-1 do que as glândulas adrenais (JAMESON, 2004). Por esta razão, fenótipos de DDS podem estar associados a casos de haploinsuficiência de SF-1, uma vez que nenhum caso de efeito dominante negativo foi encontrado para mutações no

NR5A1 (CAMATS et al., 2012). Nesses casos, é comum observar a presença de testículos disgenéticos com células de Leydig produzindo testosterona o suficiente para que os pacientes entrem em puberdade espontânea, porém insuficiente para completar a masculinização da genitália externa, levando a quadros variados de genitália ambígua (KARPOVA et al., 2015).

Outro fator que pode influenciar na variedade fenotípica apresentada pelos indivíduos portadores de mutação no gene *NR5A1* é a posição em que esta se encontra na estrutura proteica. O domínio de ligação ao DNA é extremamente importante para a proteína, pois são os dedos de zinco e a região FTZ-F1 que garantem a estabilidade e a afinidade com o DNA, além de estar envolvido no reconhecimento de sequências de DNA alvo específicas por outros fatores nucleares (LIN; ACHERMANN, 2008). Por essa razão, mutações identificadas nesse domínio podem levar a fenótipos mais graves, por ter um impacto maior na função da proteína. Já as mutações identificadas no domínio de ligação ao ligante mostram efeitos bem diferentes entre si, dependendo da localização de cada uma e das alterações na especificidade e reconhecimento do ligante, assim os fenótipos encontrados podem variar desde mais leves até mais graves (CAMATS et al., 2012). Um exemplo claro que demonstra essa expressividade variável de mutações no *NR5A1*, é o caso da alteração p.D293N identificada tanto em heterozigose como em homozigose em cinco indivíduos de uma mesma família. Em homozigose ela foi responsável por levar aos fenótipos de DG Parcial 46,XY em um indivíduo, DG Completa 46,XX em outro e DG Completa 46,XY em mais dois membros da família (LOURENÇO et al., 2009); em heterozigose a mutação resultou no fenótipo de DG Parcial 46,XY em um indivíduo.

A maior parte das mutações descritas até hoje no gene *NR5A1* foram identificadas em pacientes DDS com cariótipo 46,XY, porém há alguns relatos de mulheres que, além de serem portadoras de mutação e a transmitirem para seus filhos, apresentam quadros de insuficiência ovariana e menopausa precoce, mas raramente com insuficiência adrenal associada (MCELREAVEY; ACHERMANN, 2016). Entretanto, recentemente, os fenótipos DDS ovário testicular 46,XX e DDS 46,XX testicular (“Homem XX”) também

foram associados com o gene *NR5A1*, mais precisamente devido mutação p.R92W em heterozigose (BAETENS et al., 2016; BASHAMBOO et al., 2016; IGARASHI et al., 2017; MCELREAVEY; ACHERMANN, 2016).

A tabela do anexo 1 aborda uma revisão das mutações já descritas até o momento (as mutações aparecem em ordem crescente, de acordo com a posição na proteína, e abrangem os anos de 1.999 até 2.017). A partir desta tabela, alguns gráficos foram gerados: primeiramente um com todos fenótipos associados (FIGURA 9); e em seguida, esses fenótipos foram agrupados de acordo com a posição em que as mutações se encontram nos diferentes domínios da proteína SF-1 (Figura 10). Através deste último, pode-se observar que casos mais graves, como os de DDS associado à insuficiência adrenal, se encontram no DBD da proteína; na região de dobradiça (*hinge*), os fenótipos parecem ser mais leves; enquanto que no LBD, são bem variados, indo desde quadros de DDS 46,XY, até síndrome de ovário policístico 46,XX.

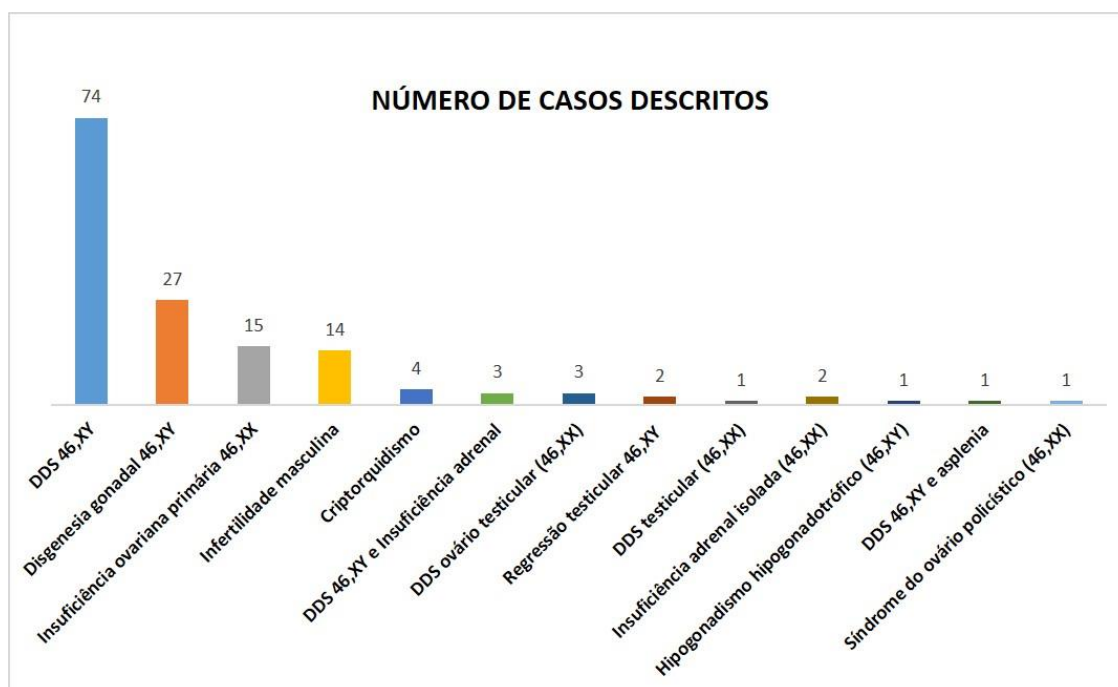


Figura 9. Casos associados à mutações no gene *NR5A1*.

Número de casos associados à mutações no gene *NR5A1* e seus respectivos fenótipos. Através de um levantamento bibliográfico, foram identificadas 131 variações associadas a 15 fenótipos de DDS diferentes.

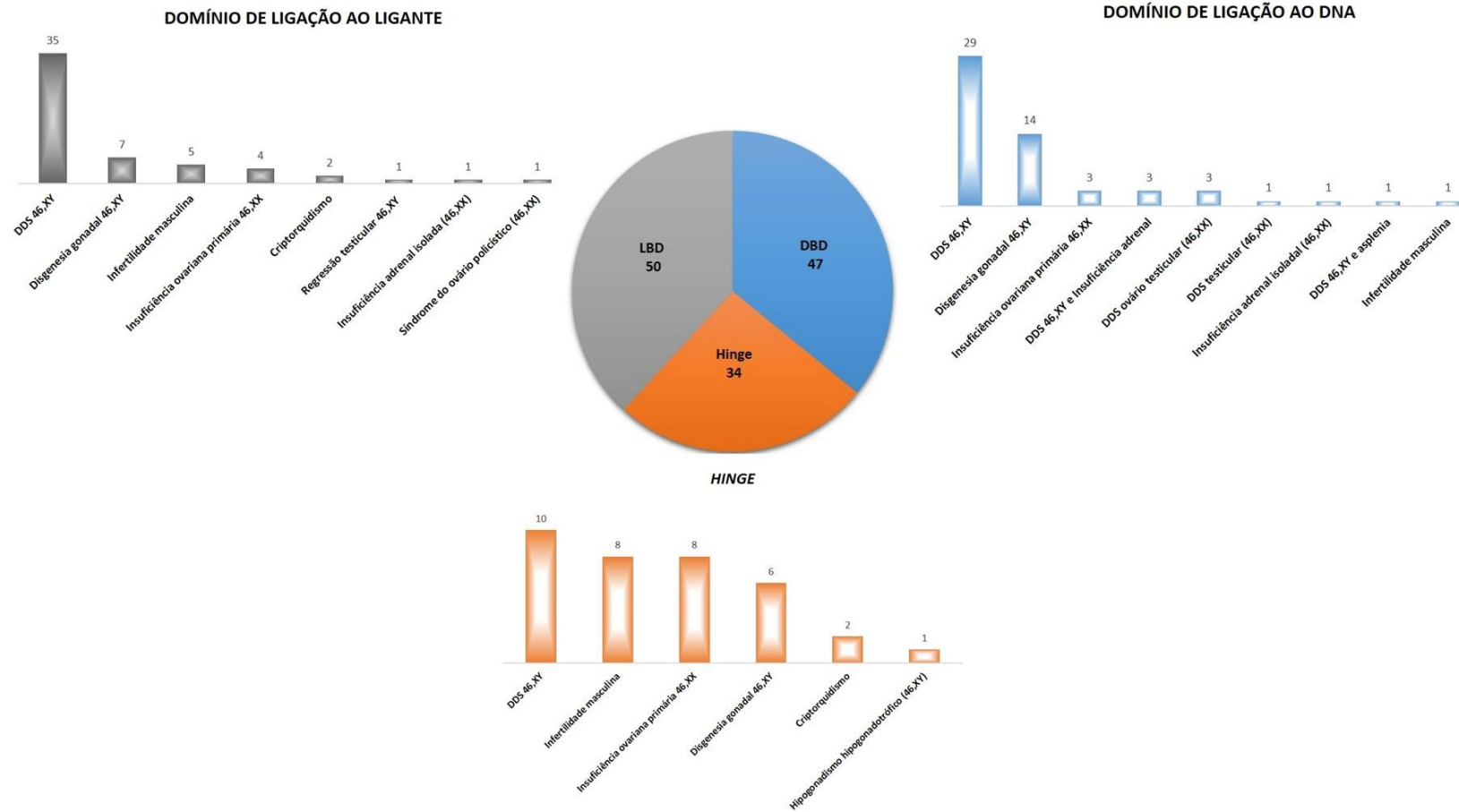


Figura 10. Número de mutações identificadas nos diferentes domínios da proteína SF-1.

O gráfico de pizza representa o número de mutações identificadas em cada domínio da proteína SF-1. Ao redor, os gráficos de barras, representam os fenótipos associados a estas mutações, dentro de cada domínio. DBD: Domínio de Ligação ao DNA; LBD: Domínio de Ligação ao Ligante.

1.4. JUSTIFICATIVA

Mesmo com o avanço da biologia molecular, o número de pacientes com DDS que permanece sem um diagnóstico preciso ainda é muito elevado. A análise genética é fundamental na maioria dos casos, porém são poucos os centros no Brasil que realizam esse tipo de pesquisa. São vários os genes que podem ser estudados nos casos de DDS, e especificamente o *NR5A1*, apresenta um papel importante. Primeiro porque ele atua em praticamente toda a cascata do desenvolvimento sexual; segundo, o número de mutações descritas neste gene vem crescendo nos últimos anos e tem possibilitado elucidar diversos casos que permaneciam sem diagnóstico definido.

A posposta inicial desse trabalho era a avaliação funcional de 10 mutações no gene *NR5A1*, porém esse estudo, na verdade, deu uma continuação à dissertação de mestrado (FABBRI; MELLO, 2013) que trouxe resultados muito significativos, indicando que o prosseguimento da triagem de mutações seria fundamental para dar seguimento a essa pesquisa.

Como discutido anteriormente, mutações no gene *NR5A1* podem levar a fenótipos muito variados, e por essa razão, a correlação genótipo-fenótipo ainda se torna elusiva na maioria dos casos. Sendo assim, o estudo funcional de novas mutações, pôde ajudar a compreender melhor o mecanismo no qual este gene atua, e o real impacto que estas alterações trouxeram na função da proteína, aproximando assim, os genótipos dos fenótipos dos indivíduos em questão. Além disso, a continuação da triagem molecular neste gene, possibilitou a identificação de novas mutações em pacientes que permaneciam classificados como DDS 46,XY idiopáticos.

Sendo assim, levando em consideração os diferentes fenótipos associados a mutações no *NR5A1*, bem como os diferentes papéis em que a proteína está envolvida, o aprofundamento da pesquisa no gene *NR5A1*, se torna cada vez mais promissora na área de DDS.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais:

- Elucidar o impacto que as mutações previamente encontradas no gene *NR5A1* geram na proteína traduzida e na expressão gênica, para possível associação aos fenótipos de DDS apresentados pelos pacientes;
- Identificar novas alterações moleculares no gene *NR5A1* em indivíduos com DDS 46,XY e infertilidade masculina.

Objetivos específicos:

- Para as mutações p.C65Y, p.R39C, p.S32N, p.C247* e p.K396Rfs*34 identificadas na região codificante do gene:
 - ✓ Avaliar a capacidade de transativação frente aos promotores *HAM* e *STAR*, através de ensaios de expressão do gene da Luciferase como repórter;
 - ✓ Avaliar a expressão das proteínas normal e mutantes no modelo experimental, através de *Western Blot*;
 - ✓ Avaliar a capacidade que a proteína mutante tem de se ligar ao DNA alvo, através de Ensaios de Deslocamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA).
- Para as mutações c.-133G>A, c.-156_-139dup, c.-413G>A, c.-207C>A e c.-762C>T, identificadas na região não-codificante do gene:
 - ✓ Avaliar se as alterações estão influenciando a transcrição do gene *NR5A1*, através de ensaios de expressão do gene da Luciferase como repórter.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

Dentre as 10 mutações que foram incluídas para investigar os respectivos impactos funcionais, nove foram previamente identificadas e descritas na dissertação de Mestrado de Helena Fabbri Scallet (FABBRI; MELLO, 2013), e uma foi identificada neste trabalho. Uma vez que nenhuma destas alterações havia sido depositada nos bancos de dados, o estudo funcional era essencial para melhor caracterizá-las.

Concomitante aos estudos funcionais, a triagem do gene *NR5A1* foi realizada para os pacientes encaminhados com DDS 46,XY e infertilidade masculina (excluindo os casos sindrômicos ou causados por fibrose cística), provenientes de quatro serviços:

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

Um total de 114 pacientes foi estudado, todos com cariótipo 46,XY, sendo que, 58 foram encaminhados como DDS 46,XY idiopáticos, 34 apresentavam queixa de infertilidade com azoospermia ou oligospermia, 18 tinham diagnóstico de disgenesia gonadal (14 DG Parcial e 4 DG Completa) e outros 4 foram encaminhados por outros motivos (ginecomastia, agonadismo, hipogonadismo hipogonadotrófico e insuficiência adrenal isolada) (Figura 11).

Diagóstico dos Pacientes

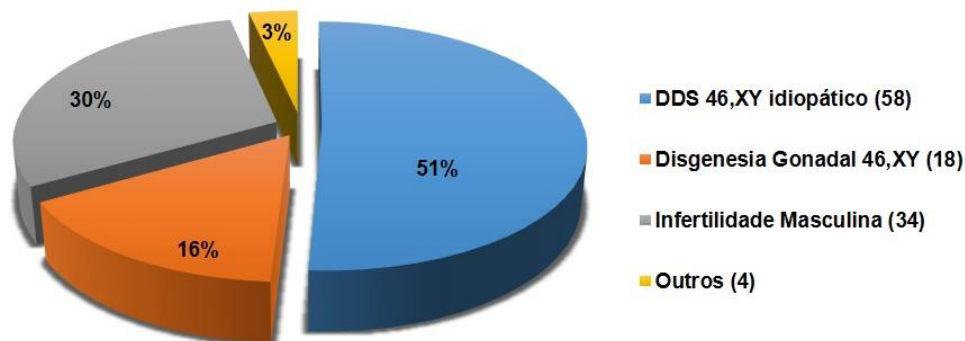


Figura 11. Porcentagem dos diagnósticos apresentados nesta casuística.

Gráfico mostrando a porcentagem de cada diagnóstico apresentado entre os 114 pacientes estudados. Destes, 58 foram encaminhados ao serviço como DDS 46,XY idiopáticos, 34 apresentavam queixa de infertilidade masculina, 18 tinham diagnóstico de disgenesia gonadal e outros 4 foram encaminhados por outros motivos.

Os critérios abaixo foram utilizados para definição dos diagnósticos dos pacientes estudados:

- DG Parcial Confirmada = genitália ambígua e pelo menos um dos critérios a seguir: presença de útero, concentração de FSH elevada, concentração de testosterona baixa. Quadro confirmado com a análise histológica das gônadas indicando testículos disgenéticos;
- DG Parcial Sugestiva = genitália ambígua, e pelo menos um dos critérios a seguir: presença de útero, concentração de FSH elevada, concentração de testosterona baixa. Mas sem análise histológica das gônadas;
- DG Pura = genitália feminina com presença útero, concentração de FSH elevada e concentração de testosterona baixa. Histologia revelando gônadas em fita;

- DDS idiopático = genitália ambígua, concentrações de FSH e testosterona normais, gônadas palpáveis, sem mutações nos genes *AR* e *SRD5A2*;
- Infertilidade = não sindrômico, quadro de azoospermia ou oligospermia grave, concentração de FSH normal ou aumentada, sem agenesia dos vasos deferentes.

Na triagem molecular destes 114 pacientes, duas novas mutações foram identificadas em dois pacientes classificados como idiopáticos. As 10 mutações estudadas *in vitro*, foram identificadas em 15 pacientes. Uma breve descrição clínica dos 17 pacientes portadores de mutação no gene *NR5A1* se encontra na Tabela 3.

Tabela 3. Descrição clínica dos pacientes que apresentaram mutações no gene *NR5A1*.

Caso	Sexo inicial – sexo final	Genitália	GD	GE	Útero	FSH	Testosterona	Diagnóstico	Mutação	Investigação familiar
1	M – M	Ambígua	TD	TD	-	Normal	Baixa	DG Parcial	p.S32N	Não realizada
2	F – M	Ambígua	NR	NR	-	Aumentado	Baixa	DG Parcial*	p.R39C	Mãe = portadora da mutação
3	F – M	Ambígua	NR	NR	-	Aumentado	Normal	DG Parcial*	p.C65Y	Irmão dos pacientes 5 e 6 Mãe = portadora da mutação. Pai = N
4	M – M	Ambígua	NR	NR	-	Aumentado	Normal	DG Parcial*	p.C65Y	Irmão dos pacientes 4 e 6 Mãe = portadora da mutação. Pai = N
5	M – M	Ambígua	NR	NR	-	Normal	Normal	DG Parcial **	p.C65Y	Irmão dos pacientes 4 e 5 Mãe = portadora da mutação Pai = N
6	M – M	Ambígua	T	T	-	Normal	Normal	Idiopático	p.C55S	Mãe = N; Pai = N
7	F – F	Ambígua	TD	TD	+	Aumentado	Baixa	DG Parcial	p.M98Gfs*44	Mãe = N
8	F – M	Ambígua	NR	NR	-	Aumentado	Normal	DG Parcial*	p.C247*	Não realizada
9	M – M	Ambígua	TD	TD	-	Normal	Baixa	DG Parcial	p.K396Rfs*34	Mãe = N
10	M – M	Ambígua	NR	NR	-	Aumentado	Baixa	DG Parcial	c.-133G>A	Mãe = N; Pai = portador da mutação; Irmão = portador da mutação

11	M – M	Masculina	T	T	-	Aumentado	Normal	Infertilidade	c.-156_-139dup	Não realizada
12	M – M	Masculina	T	T	-	Normal	Normal	Infertilidade	c.-156_-139dup	Não realizada
13	M – M	Masculina	T	T	-	Aumentado	Normal	Infertilidade	c.-156_-139dup	Mãe = portadora da mutação Pai = N
14	M – M	Ambígua	NR	NR	-	Normal	Normal	Idiopático	c.-156_-139dup	Mãe = N; Pai = portador da mutação
15	F – F	Ambígua	TD	TD	+	Aumentado	Baixa	DG Parcial	c.-156_-139dup	Não realizada
16	M – M	Ambígua	TD	TD	+	Normal	Normal	DG Parcial	c.-413G>A c.-207C>A	Não realizada
17	M – M	Ambígua	NR	NR	-	Normal	Normal	Idiopático	c.-762C>T	Não realizada

M: masculino; F: feminino; GD: gônada direita; GE: gônada esquerda; TD: testículo disgenético; T: testículo; NR: não realizado; FSH: hormônio folículo-estimulante; DG: disgenesia gonadal; N: normal.

*Diagnóstico sugestivo de DG Parcial (não realizado biópsia).

**Apesar de não se enquadrar nos critérios, o paciente recebeu o diagnóstico de DG Parcial por ser irmão dos casos 4 e 5.

3.2. MÉTODOS

O foco principal desta tese de doutorado foi o estudo molecular de novas mutações no gene *NR5A1*. Para isso, a seção a seguir será dividida em duas partes principais, uma para a análise funcional das mutações encontradas na região codificante e outra para a região não codificante do gene *NR5A1*. Entretanto, como nosso laboratório mantém constantemente a análise molecular para os pacientes encaminhados com DDS 46,XY, prosseguimos a triagem do gene *NR5A1* nestes casos. Para isso, foi realizada primeiramente a extração do DNA, amplificação das sequências através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), purificação dos fragmentos desejados e sequenciamento pelo método de Sanger. Todas essas etapas encontram-se detalhadas na dissertação de Mestrado da aluna (FABBRI; MELLO, 2013).

3.2.1. Análise funcional das mutações identificadas na região codificante do gene *NR5A1*

Todas as etapas descritas a seguir, a respeito da análise funcional das mutações na região codificante, foram realizadas no laboratório *Div. Paediatric Endocrinology & Diabetes, Center of Brain Behavior and Metabolism* (CBBM), da Universidade de Lübeck, na Alemanha, durante o período de doutorado sanduíche realizado pela aluna.

3.2.1.1. Construção dos clones mutantes

A técnica de mutagênese sítio-dirigida foi realizada a fim de inserir as mutações p.C65Y, p.R39C, p.S32N, p.C247* e p.K396Rfs*34 no vetor pMyc-SF1 contendo o cDNA do gene *NR5A1*, que foi gentilmente fornecido pelo professor Dr. Yukihiro Hasegawa, da universidade de Tokyo, e que foi

usado como *wild-type* (WT) para os experimentos. Para isso três PCRs distintas foram realizadas usando a enzima *Phusion High Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific). As PCRs 1 e 2 criaram dois produtos intermediários que foram separados em gel, purificados e posteriormente combinados e amplificados na PCR 3 (Figura 12A). Dessa forma foi gerado um fragmento do cDNA contendo a mutação de interesse. Esse fragmento, foi inserido em um vetor de clonagem, digerido com enzimas de restrição, e religado no vetor de expressão pMyc-SF1, possibilitando assim, a construção do cDNA completo do gene *NR5A1* contendo em sua sequência a mutação a ser estudada (Figura 12B).

As sequências dos *primers* utilizados, encontram-se na Tabela 4.

As condições utilizadas para a PCR encontram-se descritas abaixo.

Condições para PCR 1 e 2		Ciclo:	
	[μ L]	98°C ----- 3 min 98°C ----- 15 seg Tm ----- 30 seg 72°C ----- 30 seg 72°C ----- 10 min 8°C ----- ∞ } 30X	
5x Phusion HF Buffer (com 1,5 mM MgCL ₂)	10		
dNTP (10 mM)	1		
Primer sense (20 pmol/ μ L)	1,25		
Primer antisense (20 pmol/ μ L)	1,25		
Phusion Taq (2 U/L)	0,5		
DNA (pMyC – SF1)	1		
H ₂ O miliq q.s.p.	35		
Volume final	50		
Condições para PCR 3		Ciclo:	
	[μ L]	98°C ----- 3 min 98°C ----- 15 seg Tm ----- 30 seg 72°C ----- 30 seg 72°C ----- 10 min 8°C ----- ∞ } 30X	
5x Phusion HF Buffer (com 1,5 mM MgCL ₂)	10		
dNTP (10 mM)	1		
Primer sense (20 pmol/ μ L)	1,25		
Primer antisense (20 pmol/ μ L)	1,25		
Phusion Taq (2 U/L)	0,5		
DNA (PCR 1: 3 μ L; PCR 2: 3 μ L)	6		
H ₂ O miliq q.s.p.	30		
Volume final	50		

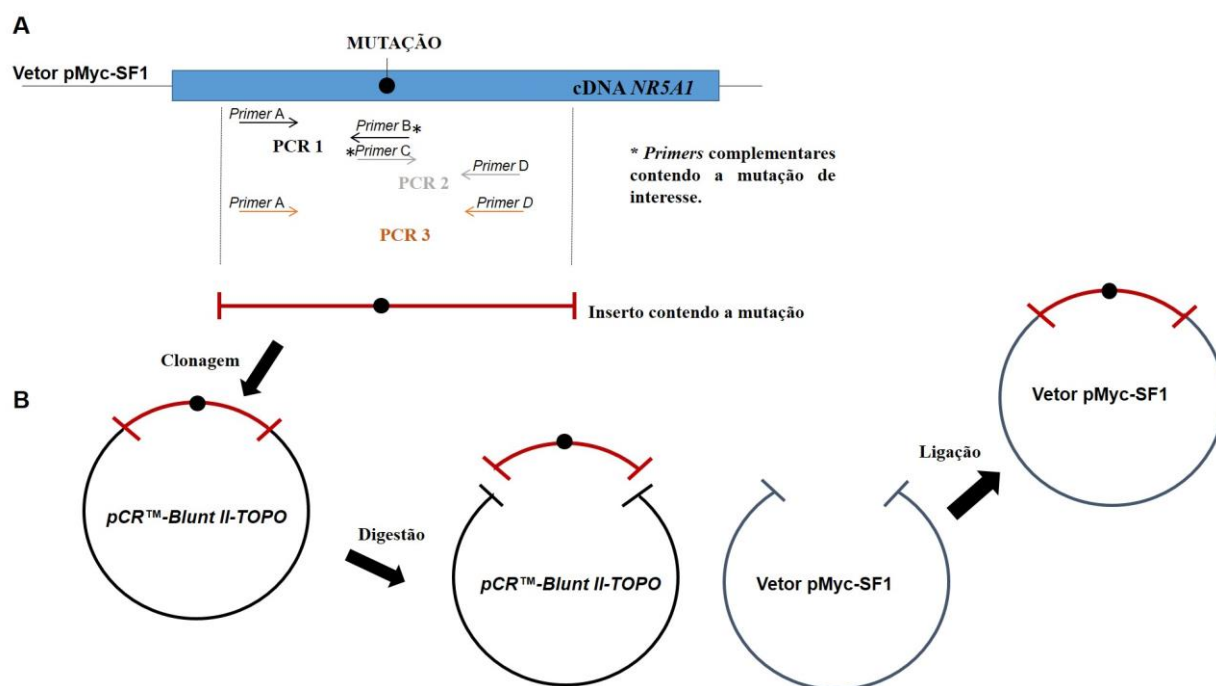


Figura 12. Estratégia para inserção da mutação no cDNA do gene *NR5A1*.

A) Sequência das três reações de PCRs realizadas. A partir do ponto em que a mutação se encontrava (círculo preto), três pares de *primers* foram desenhados. A PCR 1 (em preto) foi realizada com a combinação dos *primers* A (normal) e B (mutante); a PCR 2 (em cinza) com os *primers* C (mutante) e D (normal), e a PCR 3 (em laranja) com os *primers* A e D. Dessa maneira, um fragmento do cDNA contendo a mutação de interesse foi gerado. **B)** Etapas subsequentes para inserção este fragmento de volta no vetor de expressão. Primeiramente o inserto foi clonado no vetor pCR™-Blunt II-TOPO®, e em seguida digerido com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para digerir o vetor pMyc-SF1. Por último, foi realizada a ligação do inserto no vetor de expressão, obtendo o cDNA completo com a mutação desejada.

Tabela 4. Sequência dos primers utilizados para construção de cada clone mutante.

		p.C65Y	p.R39C	p.S32N
PCR 1	<i>Primer sense</i> (A)	CMV_forw	CMV_forw	CMV_forw
		GATCCGGTACTAGAGGAACTGAAAAAC	GATCCGGTACTAGAGGAACTGAAAAAC	GATCCGGTACTAGAGGAACTGAAAAAC
	<i>Primer antisense</i> (B)	p.C65Y-AS	NR5A1-R39C-AS	p.Ser32Asn-AS
		CGGCAGAAGGGATAGCGCTTGCGCTGCG	GTTCTGCACCGTGCACTTGAAGAAGCCCTTGC	GAAGCCCTTGCACTTCTCACACGTGAG
	T° Anelamento	58°C	58°C	58°C
	Fragmento	634 pb	557 pb	536 pb
PCR 2	<i>Primer sense</i> (C)	p.C65Y-S	NR5A1-R39C-S	p.Ser32Asn-S
		CGCAGCGCAAGCGCTATCCCTTCTGCCG	GCAAGGGCTTCTTCAAGTGCACGGTGCAGAAC	CTCACGTGTGAGAACTGCAAGGGCTTC
	<i>Primer antisense</i> (D)	SF1_Ex4intAS_RP	SF1_Ex4_intAS_RP	SF1_Ex4_intAS_RP
		GCAGCACGTAGTCCGGTG	GCAGCACGTAGTCCGGTG	GCAGCACGTAGTCCGGTG
	T° Anelamento	59°C	59°C	59°C
	Fragmento	243 pb	324 pb	412 pb
PCR 3	<i>Primer sense</i> (A)	CMV_forw	CMV_forw	CMV_forw
		GATCCGGTACTAGAGGAACTGAAAAAC	GATCCGGTACTAGAGGAACTGAAAAAC	GATCCGGTACTAGAGGAACTGAAAAAC
	<i>Primer antisense</i> (D)	SF1_Ex4intAS_RP	SF1_Ex4_intAS_RP	SF1_Ex4_intAS_RP
		GCAGCACGTAGTCCGGTG	GCAGCACGTAGTCCGGTG	GCAGCACGTAGTCCGGTG
	T° Anelamento	58°C	58°C	58°C
	Fragmento	849 pb	849 pb	849 pb

		p.C247*	p.K396Rfs*34
PCR 1	<i>Primer sense</i> (A)	SF1_Ex2-3_IntS_RP CAAGATCGACAAGACGCAG	NR5A1_Ex4s_582 GTCTGAGTACCCGGAGCCTTATGC
	<i>Primer antisense</i> (B)	p.Cis247*-AS GTGGGCTCCTGCAGTCAGCCCAAGATGCG	p.K396Rfs*34-AS CAGGGCGGCGTTGGCCTCTCCTGAGCGTCTTT
	T° Anelamento	60°C	62°C
	Fragmento	1183 pb	621 pb
PCR 2	<i>Primer sense</i> (C)	p.Cis247*-S CGCATCTTGGGCTGACTGCAGGAGCCAC	p.K396Rfs*34-S AAAGACGCTCAGGAGAGGCCAACGCCGCTTG
	<i>Primer antisense</i> (D)	NR5A1_E6as_1138 CCAGGCTGAAGAGGATGATG	p.CMV-Myc-as TACAAATAAAGCAATAGCAT
	T° Anelamento	60°C	52°C
	Fragmento	412 pb	334 pb
PCR 3	<i>Primer sense</i> (A)	SF1_Ex2-3_IntS_RP CAAGATCGACAAGACGCAG	NR5A1_Ex4s_582 GTCTGAGTACCCGGAGCCTTATGC
	<i>Primer antisense</i> (D)	NR5A1_E6as_1138 CCAGGCTGAAGAGGATGATG	p.CMV-Myc-as TACAAATAAAGCAATAGCAT
	T° Anelamento	60°C	55°C
	Fragmento	1566 pb	923 pb

3.2.1.2. Clonagem e transformação

Após a obtenção do fragmento contendo a mutação, foi realizada a ligação do inserto ao vetor de clonagem, seguindo uma razão 3:1 (inserto:vetor). Foi utilizado o vetor *pCR™-Blunt II-TOPO®* (Invitrogen), com algumas modificações em seu protocolo, para obter melhor eficiência na reação, conforme descrito abaixo:

Produto da PCR 0,5 – 4 μ L (~30 ng/ μ L)

Solução salina (kit) 1 μ L

Água (kit) q.s.p. 5 μ L

Vetor TOPO (10 ng/ μ L) 1 μ L

A reação foi incubada a 16°C por 1 hora.

A transformação foi realizada por choque térmico usando células competentes *E. coli TOP10* (Invitrogen), através do seguinte protocolo:

- Adicionar 2 μ L da ligação nas células competentes *TOP10* (reação deve ser realizada em gelo);
- Incubar no gelo por 30 minutos;
- Proceder o choque térmico nas células por 30 segundos a 42°C;
- Imediatamente transferir no gelo e incubar por 2 minutos;
- Adicionar 250 μ L de meio S.O.C. à temperatura ambiente;
- Agitar por 1 hora a 37°C (~ 1000 rpm);
- Plaquear 100 μ L e 200 μ L da transformação em placas com meio LB pré-aquecidas contendo canamicina como antibiótico;
- Incubar *overnight* a 37°C.

3.2.1.3. Seleção das colônias positivas

Para identificar quais das colônias continham o inserto, foi realizada uma reação de PCR utilizando *primers* flanqueadores do *polylinker* de clonagem do vetor. Simultaneamente, foi feita uma placa réplica das colônias selecionadas para a PCR. A condição para esta PCR encontra-se abaixo:

Volume dos reagentes:	Ciclo:
Tampão Invitrogen (10X) 2,5 µL	94°C ----- 2 minutos
MgCl ₂ (50 mM) 0,8 µL	94°C ----- 1 minuto
dNTPs (2 mM) 5 µL	55°C ----- 1 minuto
Primer M13 <i>Reverse</i> (0.1 µg/µL) 0,5 µL	72°C ----- 1 minuto
Primer M13 <i>Forward</i> (-20) (0.1 µg/µL) 0,5 µL	72°C ----- 7 minutos
Taq DNA polymerase (5 U/ µL) 0,2 µL	8°C ----- ∞
H ₂ O ultra-pura..... q.s.p. 20 µL	

30 X

3.2.1.4. Extração de plasmídeo em pequena escala (Miniprep)

O DNA plasmidial foi extraído das colônias que foram positivas para reação de PCR, utilizando o kit *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fischer Scientific). As etapas encontram-se descritas abaixo:

- Adicionar 5 mL de meio LB líquido com 5 µL de canamicina [50 mg/mL] em tubo de 15 mL;
- Com uma ponteira, pegar a colônia positiva da placa réplica e colocar no tubo preparado com o meio LB. Agitar por 16 horas a 37°C (300 rpm);
- Aliquotar 1.800 µL da cultura em três tubos de 2,0 mL;
- Centrifugar a 8.000 rpm por 2 minutos;
- Descartar o sobrenadante;

- Dos três tubos, armazenar o pellet de dois no freezer a -20°C, e prosseguir com miniprep usando apenas um, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

Para confirmar se a mutação estava presente no inserto e se este, estava inserido na orientação correta no vetor de expressão, dois procedimentos foram realizados concomitantemente. Para avaliar a presença da mutação, 1 µL da amostra obtida pela miniprep do DNA foi sequenciada, usando *primers* que abrangiam a região de interesse. Já para verificar se o fragmento havia sido inserido na orientação correta, foi realizado um teste por digestão com enzimas de restrição. Foi escolhida uma enzima que cortasse tanto o inserto, quanto o vetor *TOPO*. Uma alíquota de 1 µL da amostra foi digerida por 1 hora, seguindo as condições de temperatura e tampão de acordo com a enzima utilizada. As amostras foram observadas em um gel de agarose 1% após eletroforese a 60 V e, certificando-se os tamanhos dos fragmentos, foi possível verificar se estavam ou não, na orientação correta.

3.2.1.5. Digestão do inserto e ligação no vetor de expressão

As enzimas listadas abaixo foram utilizadas para liberar os insertos do vetor TOPO, bem como digerir o vetor de expressão pMyc-SF1:

Mutação	Enzima	Tampão	Temperatura	Nº de horas
p.C65Y, p.R39C e p.S32N	<i>Pvu</i> I-HF	CutSmart	37°C	2
	<i>Eco</i> RI-HF	2.1	37°C	3
	<i>Bsr</i> GI	2.1	37°C	3
p.K396Rfs*34	<i>Bst</i> EII-HF	CutSmart	37°C	2
	<i>Not</i> I-HF	4	37°C	3
	<i>Ale</i> I	4	37°C	3
p.C247*	<i>Eco</i> RI-HF	CutSmart	37°C	3
	<i>Bst</i> EII-HF	CutSmart	37°C	3
Vetor pMyc-SF1	<i>Eco</i> RI-HF	2.1	37°C	3
	<i>Bsr</i> GI	2.1	37°C	3

Reação para digestão:

Produto da Miniprep	2 - 5 µg de DNA
Enzima 1 (20 U)	2 µL
Enzima 2 (20 U)	2 µL
Tampão (10X)	5 µL
H ₂ O ultra-pura.....	q.s.p. 50 µL

As amostras foram aplicadas e separadas por eletroforese a 60 V em gel de agarose 1%, os fragmentos corretos foram recortados e purificados, utilizando o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega).

Após essa etapa, foi realizada a ligação do inserto no vetor de expressão (pMyc-SF1) previamente digerido com as respectivas enzimas de restrição, seguindo a proporção de 3:1 (inserto:vetor), conforme descrito abaixo:

T4 Ligase Buffer (10X)	2 µL
Vetor de expressão	4 µL
Inserto	12 µL
T4 DNA Ligase	1 µL
H ₂ O ultra-pura.....	q.s.p. 20 µL

A reação foi incubada *overnight* a 16°C. Uma alíquota de 10 µL da amostra foram transformados em células competentes *E. coli* DH5α, conforme protocolo descrito anteriormente. Alíquotas de 50 µL, 100 µL e 200 µL da transformação foram aplicadas em placas LB sólido contendo ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C *overnight*.

No dia seguinte, foi realizada a extração do DNA plasmidial (miniprep) de duas colônias a fim de realizar o sequenciamento das amostras. Essa etapa foi feita para verificar se as sequências estavam corretas antes de dar continuidade aos experimentos.

3.2.1.6. Extração de plasmídeo em grande escala (Maxiprep)

Para a extração em grande escala do DNA plasmidial, primeiramente foi realizado um pré-inóculo contendo 3 µL de meio LB com ampicilina e uma colônia positiva. Após 8 horas sob agitação em *shaker* a 37°C, todo o volume do pré-inóculo foi transferido para um frasco *Erlenmeyer* de 1 litro, contendo 200 mL de meio LB líquido e 300 µL de ampicilina. A amostra foi mantida sob agitação em *shaker* a 300 rpm por 16 horas a 37°C. No dia seguinte, uma alíquota de 200 µL do inóculo foi retirada e adicionada a 800 µL de glicerol, para obtenção de uma cultura permanente, que foi armazenada em freezer -80°C. Com o restante foi realizada a maxiprep com o kit *EndoFree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

A amostra foi novamente sequenciada, para averiguar se a sequência estava correta, antes de proceder com a transfecção em células HeLa, ensaios de Luciferase, *Western Blot* e EMSA.

3.2.1.7. Cultura de Células e Transfecção Transiente

Para os ensaios a seguir, foram utilizadas linhagens celulares de HeLa. Para tal, foi descongelada uma alíquota de 1 mL de células em 10 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino estéril (SBF) em um tubo de fundo cônico de 15 mL. Após centrifugação (8 minutos, 4.000 rpm), o meio foi descartado e o pellet ressuspendido em 10 mL de DMEM + 10% SBF. O volume foi transferido para um frasco de cultura de 75 cm² e então incubado a 37°C em estufa com 5% de CO₂. A primeira passagem foi realizada 48 horas após o descongelamento; para tal descartou-se o meio, as células aderidas foram lavadas com 5 mL de PBS que foram em seguida descartados, quando então 1 mL de tripsina foi adicionado. Após as células se desprenderem do frasco foram adicionados 5 mL de meio, sendo em seguida colhidas e

centrifugadas (8 minutos, 4.000 rpm), o meio foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 10 mL de DMEM + 10% SBF. Todo o volume foi repassado para um frasco de 175 cm² com 15 mL de DMEM + 10% SBF adicionais, e incubado a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após 48 horas, observando a confluência desejada, as células foram novamente tripsinizadas (10 mL de PBS para lavagem e 2 mL de tripsina). Após centrifugação, o pellet foi ressuspensionado em 10 mL de DMEM + 10% SBF, porém dessa vez, uma alíquota de 100 µL das células foi retirada para contagem em câmara de Neubauer.

Para os ensaios de expressão com o gene repórter de luciferase, 50.000 células HeLa, foram cultivadas em placas de 24 poços contendo meio DMEM + 10% SBF, por 24 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram transfectadas com 30 ng/poço de plasmídeo contendo cada uma das construções, bem como do controle positivo (WT NR5A1) ou do o controle negativo (pCMV-Myc) e 200 ng/poço do vetor contendo o gene repórter da luciferase de vagalume ligado a um promotor do SF-1 (*HAM* ou *StAR*). Para viabilizar a eficiência da transfecção 10 ng/poço do vetor pGL4.74 foi também co-transfectado com as construções e controles. Cada transfecção foi realizada com 0,72 µL de FuGene HD (Promega) por poço (razão FuGene:DNA = 3:1), seguindo as recomendações do fabricante. Para se obter o extrato nuclear, 300.000 células HeLa foram cultivadas em placas de 6 poços com meio DMEM + 10% SFB e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após 24 horas, 960 ng/poço de cada uma das construções, com os controle positivos ou negativos (pCMV-Myc) foram transfectados usando 2,88 µL FuGene HD (razão FuGene:DNA = 3:1).

3.2.1.8. Ensaios de Luciferase

Para comparar a capacidade dos SF-1 mutantes em ativar os promotores *HAM* e *StAR* em relação ao WT, foram realizados ensaios de

expressão do gene da luciferase como repórter usando o kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega).

Para isso, 24 horas após transfecção, as seguintes etapas foram realizadas:

- Descartou-se o meio com uma pipeta;
- Lavou-se duas vezes com 1 mL de PBS cada poço;
- Adicionou-se 100 µL/poço de *Passive Lysis Buffer* (kit);
- Deixou-se a placa em *shaker* horizontal por 90 minutos;
- Raspou-se as células de cada poço com uma ponteira;
- Adicionou-se 25 µL de cada construção em três poços (triplicata mecânica), em uma placa de fundo branco de 96 poços;
- Dois sinais de luciferase (*Renilla* e *Firefly*) foram quantificados a partir de uma mesma amostra, conforme recomendações do fabricante.

Três testes independentes foram realizados para validar esse experimento.

3.2.1.9. Western Blot

A fim de analisar se a proteína SF-1 estava sendo expressa, a técnica de *Western Blot* foi realizada após cada transfecção.

Para se obter o extrato proteico, 24 horas após a transfecção, as células foram lavadas com 500 µL de PBS gelado e lisadas com 100 µL de *Mammalian Protein Extraction Reagent* (M-Per, Thermo Scientific) suplementado com *Protease Inhibitor Complete Ultra Tablets*, Mini, EDTA-free (Roche). As placas foram colocadas sob agitação por 5 minutos em gelo e, em seguida, as células foram descoladas dos poços com auxílio de uma pipeta. Estas, foram então transferidas para uma coluna que possui um sistema de trituração de biopolímeros em tubo próprio para centrifuga (*Qiashredder*) e

centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto a 4°C. O lisado foi diluído 1:1 com 2X *sample buffer* (SDS 4%, Glicerol 20%, Tris-HCl 120 mM, Ditioneitol 200 mM / pH 6,8) e desnaturado a 95°C por 10 minutos. Uma alíquota de cada amostra foi separada para o experimento e o restante armazenadas em freezer -80°C.

Alíquotas de 40 µL de cada lisado foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% (SDS-Page). Usando uma voltagem de 100 V e amperagem de 400 mA, a eletroforese se desenvolveu durante cerca de 120 minutos. As proteínas foram então transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) em uma cuba de *Western Blot* por 80 minutos, usando uma voltagem de 100 V e amperagem de 400 mA. Depois de lavar a membrana com água, as proteínas foram coradas com reagente de *Ponceau*, a fim de se verificar a eficiência da transferência. Para se lavar e bloquear a membrana, foram preparados 200 mL de uma solução 5% *Skim Milk* (BD Biosciences) em PBS contendo 0,1% de *Tween-20* (Sigma-Aldrich). Primeiramente, a membrana foi lavada por 10 minutos à temperatura ambiente, e em seguida, bloqueada com a mesma solução por 1 hora a temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C. Posteriormente ao bloqueio, a membrana foi incubada por 10 minutos com o anticorpo primário (Anti-cMyc-Peroxidase, Roche) diluído em 10 mL de *Skim Milk* (diluição 1:1000) por 1 hora à temperatura ambiente. A membrana foi lavada por mais quatro vezes (15 minutos cada, 15 mL de *Skim Milk*). Para revelação das bandas específicas, foi utilizado 600 µL do substrato *Western Lightning Plus ECL* (Perkin Elmer). As imagens foram obtidas em um sistema de quimiluminescência *Fusion* (Vilber Lourmat). Um anticorpo anti-actina foi usado como controle de quantidade de proteína carregada em todos os casos.

Abaixo, encontram-se as condições para o preparo do gel SDS-page e os tampões de corrida utilizados:

	Gel de Separação 10 %	Gel de Empilhamento
Água destilada	4,5 mL	3,065 mL
5X Tampão respectivo	2 mL	930 µL
Acrilamida	3,5 mL	650 µL
PSA 10 %	90 µL	30 µL
TEMED	9 µL	10 µL

- Tampão de Separação: Tris-Cl 1,5 M, SDS 0,5%, pH 8,8
- Tampão de Empilhamento: Tris-Cl 1 M, SDS 0,5%, pH 6,8

Três testes independentes foram realizados para validar esse experimento.

3.2.1.10. Ensaios de Deslocamento da Mobilidade Eletroforética

Os Ensaios de Deslocamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA) foram realizados para avaliar a capacidade que cada proteína mutante mantinha em se ligar ao DNA alvo. Para isso, primeiramente 300.000 células HeLa, foram cultivadas em placas de 6 poços, contendo 3 mL de DMEM + 10% SFB a 37°C. Depois de 24 horas, as transfecções foram realizadas com 2,88 µL FuGene HD e 960 ng/poço do controle positivo (WT NR5A1), 960 ng/poço do controle negativo (pCMV-Myc) e 960 ng/poço de cada uma das construções. As placas foram gentilmente agitadas por 2 minutos e incubadas por 24 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Os extratos citoplasmáticos e nucleares foram isolados, usando os kits *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Scientific) e *Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail EDTA-Free* (Thermo Scientific), conforme instruções do fabricante. Alíquotas de 20 µL desses extratos foram armazenadas em freezer -80°C.

Para verificar a pureza dos extratos isolados, foi realizado primeiramente um *Western Blot*, usando anticorpos específicos para o cMyc-SF1, LaminA (sc-20680, Santa Cruz Biotechnology) para o extrato nuclear e anti-GAPDH (ab9485, abcam) para o extrato citoplasmático. O resultado obtido com o *Western Blot*, também possibilitou quantificar cada uma das bandas através da densitometria realizada pelo programa Bio1D (Bio-Rad), a fim de usar quantidades iguais de proteína para o EMSA.

Os ensaios de EMSA foram realizados com o kit *Light Shift Chemiluminescent EMSA* (Thermo Scientific). Para isso, três reações independentes foram realizadas:

		Reação 1	Reação 2	Reação 3
Extrato nuclear		3 µL	3 µL	3 µL
Tampão de ligação 10X (100 mM Tris, 500 mM KCl, 10 mM DTT, pH 7,5)		2 µL	2 µL	2 µL
Poly (dl-dC) (1 µg/µL em 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5)		1 µL	1 µL	1 µL
Primers (sense e antissense)	Sequências do DNA alvo marcadas com biotina (500 fmol) (5Bio-SF1_EMSA_mMISs /SF1_EMSA_mMISa)	1 µL de cada primer	1 µL de cada primer	1 µL de cada primer
	Sequências do DNA alvo não marcadas (5 pmol) (SF1_EMSA_mMISs/SF1_EMSA_mMISa)	-	2 µL de cada primer	-
	Sequências do DNA alvo mutadas não marcadas (5 pmol) (mMIS_mutS_EMSA/mMIS_mutA_EMSA)	-	-	2 µL de cada primer

As reações foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. Como controle da reação, uma sonda livre e o vetor vazio (pCMV-Myc) foram utilizados. Primeiramente foi realizada uma “pré-eletroforese”, na qual apenas o gel de poliácridamida 6% (15,2 mL de água destilada; 5,4 mL 0,5X de TBE; 5,2 mL de acrilamida; 180 µL de PSA 10% e 18 µL de TEMED) foi submetido a uma corrente de 100 V por 60 minutos. Para aplicação no gel, 5 µL de azul de bromofenol 5X foram adicionados a 20 µL de cada uma das reações. Em seguida, todas as amostras foram aplicadas no gel de poliácridamida 6% e submetidas à eletroforese a uma voltagem de 100 V, até que o azul de bromofenol migrasse até $\frac{3}{4}$ do comprimento do gel. O conteúdo do gel foi então transferido para uma membrana de nylon (Hybond-Nx, Amersham Pharmacia Biotech) por 60 minutos a 100 V em uma cuba de *Western Blot*. Em seguida, essa membrana foi colocada sobre um papel *whatman* seco e imediatamente exposto a luz UV para o *crosslinking* a 120 mJ/cm².

Para detectar as sondas marcadas com biotina foi seguido o protocolo sugerido pelo fabricante, utilizando todos os tampões fornecidos no kit. As imagens geradas no processo de revelação foram captadas em um sistema de quimiluminescência *Fusion* (Vilber Lourmat).

As sequências dos *primers* utilizados, encontram-se descritas abaixo:

SF1_EMSA_mMISs	5'-GCC AGG CAC TGT CCC CCA AGG TCA CCT TTG GTG TTG ATA-3'
SF1_EMSA_mMISa	5'-TAT CAA CAC CAA AGG TGA CCT TGG GGG ACA GTG CCT GGC-3'
5Bio-SF1_EMSA_mMISs	5'-Biotin-GCC AGG CAC TGT CCC CCA AGG TCA CCT TTG GTG TTG ATA-3'
mMIS_mutS_EMSA	5'-GCC AGG CAC TGT CCC CCA <u>ATT</u> TCA CCT TTG GTG TTG ATA-3'
mMIS_mutA_EMSA	5'-TAT CAA CAC CAA AGG TGA <u>AAT</u> TGG GGG ACA GTG CCT GGC-3'
5Bio-mMIS_mutS_EMSA	5'-Biotin-GCC AGG CAC TGT CCC CCA <u>ATT</u> TCA CCT TTG GTG TTG ATA-3'

Em negrito estão ressaltadas a sequência consenso reconhecida pelo *NR5A1*. Nos *primers* mutantes, as duas bases alteradas, encontram-se sublinhadas.

Três testes independentes foram realizados para validar esse experimento.

3.2.2. Análise funcional das mutações identificadas na região não codificante do gene *NR5A1*

A estratégia utilizada para estudar as alterações identificadas na região não codificante do gene foi clonar o fragmento contendo a região de interesse e inseri-lo em um vetor de expressão específico, para analisar, por ensaios de luciferase, o quanto essas alterações estavam influenciando a expressão gênica de um gene repórter, comparando com um controle normal.

3.2.2.2. Escolha dos vetores de expressão

Das cinco mutações estudadas na região não codificante, duas se encontram no éxon 1 transcrito e não traduzido (região 5'UTR) e três na região não transcrita (região 5'). Assim, construímos um fragmento de DNA que abrangesse toda essa região, para então inseri-lo no vetor escolhido. Optamos pelo uso de dois vetores diferentes para realizarmos os estudos funcionais (ambos vendidos pela empresa SwitchGear Genomics, Active Motif), o *pLightSwitch_5UTR* para estudarmos as mutações identificadas no éxon 1 e o vetor *pLightSwitch_Prom*, para estudarmos as mutações na região promotora e não transcrita do gene. A diferença principal entre eles é que o vetor *pLightSwitch_5UTR* possui seu próprio promotor ACTB (Actin, Beta), o que se faz necessário, uma vez que precisamos de um promotor constitutivo para expressar o éxon 1, e assim analisarmos o efeito das mutações nessa região na estabilidade do RNA e na tradução da proteína. Já o vetor *pLightSwitch_Prom*, não possui essa sequência, sendo então indicado para verificar se as mutações afetam especificamente o promotor do gene e o processo de transcrição (Figura 13).

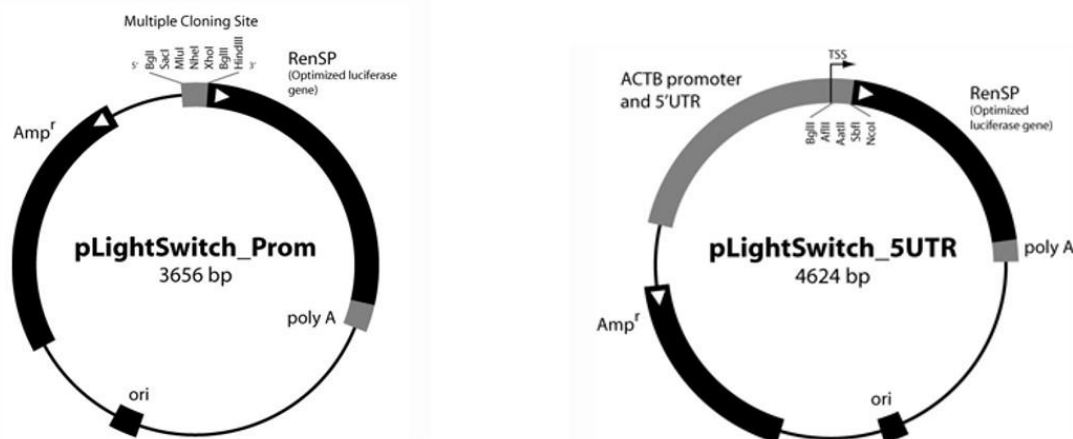


Figura 13. Vetores escolhidos para os estudos funcionais da região não codificante do gene.

Para o estudo das mutações identificadas na região não codificante do gene *NR5A1*, dois vetores diferentes foram utilizados. A esquerda, o vetor *pLightSwitch_Prom*, para expressão das mutações na região promotora e não transcrita do gene. A direita, o vetor *pLightSwitch_5UTR*, para expressão das mutações identificadas no éxon 1 do gene *NR5A1*. A principal diferença entre eles, é que o vetor *pLightSwitch_5UTR* possui seu próprio promotor constitutivo em sua sequência.

3.2.2.3. Amplificação da região de interesse

Foram desenhados *primers* contendo sítios para enzimas de restrição nas suas extremidades 5' que depois seriam utilizados para a subclonagem do inserto no vetor de expressão. Através de técnica de PCR, usando esses *primers*, o DNA genômico dos pacientes e a enzima *Phusion High Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific), as regiões não codificantes do gene, contendo as alterações, foram amplificadas. Os produtos das PCRs foram purificados utilizando o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega). A sequência dos *primers* utilizados, encontram-se na tabela abaixo, assim como as condições da reação de PCR:

Região do gene	Sequência dos <i>Primers</i>	Sítios de restrição
Promotora (5')	Sense - 5' CTT ACGCGT GCTACCCTGTCCTATCCTGG 3' Antisense – 5' CGC AGATCT CTCACTTACGAAGCGGAAGC 3'	<i>Mlu</i> I / <i>Bgl</i> II
Exon 1 (5'UTR)	Sense - 5' GAGATCT GGAGGACGGACGGACAGGGCCA 3' Antisense – 5' GGACGTC GAAGCGGAAGCAGCGCTCTCACA 3'	<i>Bgl</i> II / <i>Aat</i> II

Em negrito, nas sequências dos *primers*, estão ressaltados os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição utilizadas.

Reação de PCR - Volume dos reagentes:	Ciclo:
Tampão High-fidelity (5X) 10 µL	98°C ----- 30 segundos
dNTPs (10 mM) 5 µL	98°C ----- 10 segundos
Primer <i>Reverse</i> (20 pmol/µL) 1,5 µL	T _m ----- 30 segundos
Primer <i>Forward</i> (20 pmol/µL) 1,5 µL	72°C ----- 40 segundos
<i>Phusion HF polymerase</i> (2 U/ µL) 0,5 µL	72°C ----- 10 minutos
H ₂ O ultra-pura..... q.s.p. 50 µL	4°C ----- ∞

} 30X

3.2.2.4. Clonagem, transformação, seleção de colônias positivas e extração de plasmídeo em pequena escala

Todas essas etapas foram realizadas como descrito anteriormente nas seções 3.2.1.2 a 3.2.1.4.

3.2.2.5. Digestão do inserto e ligação ao vetor de expressão

O inserto e o vetor de expressão foram digeridos usando enzimas de restrição, conforme protocolo abaixo:

Para o vetor pLightSwitch_5UTR:

Produto da Miniprep 2 - 5 µg de DNA

Enzima *Aat* II (20 U) 2 µL

Enzima *Bgl* II (20 U) 2 µL

Tampão 3.1 (10X) 5 µL

H₂O ultra-pura..... q.s.p. 50 µL

Para o vetor pLightSwitch_Prom:

Produto da Miniprep 2 - 5 µg de DNA

Enzima *Mlu* I (5 U) 2 µL

Enzima *Bgl* II (5 U) 2 µL

Tampão 3.1 (10X) 5 µL

H₂O ultra-pura..... q.s.p. 50 µL

As reações foram incubadas a 37°C por 3 horas. As amostras foram aplicadas e separadas em gel de agarose 1% a 60 V, os fragmentos corretos

foram recortados e purificados, utilizando o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega).

A reação de ligação, plaqueamento, confirmação por sequenciamento e posterior maxiprep, foram realizadas como descrito anteriormente nas seções 3.2.1.5 e 3.2.1.6.

3.2.2.6. Cultura de Células e Transfecção Transiente

As células utilizadas para esses ensaios foram as HEK-293. A princípio alguns testes foram realizados tanto com células esteroideogênicas (NCI-H295R), que expressavam SF-1, como com células não esteroideogênicas (HEK-293). Os resultados obtidos para ambas foram muito semelhantes, e por essa razão, considerando a facilidade de manuseio das células HEK-293, optamos por realizar os experimentos com esta linhagem celular.

Para tal, a etapa de descongelamento e cultivo, foram iguais as descritas anteriormente na seção 3.2.1.7. Porém, alguns testes para padronizar a transformação e aumentar a eficiência do experimento, foram realizados. Foram três testes, um variando o número de células cultivadas (15 mil, 50 mil, 80 mil e 200 mil), outro a razão de FuGene utilizada (3:1 ou 6:1) e outro a razão de Lipofectmanina utilizada (3:1 e 6:1). Alíquotas de 30 ng/poço do vetor pFlagGFP foi co-transfectado em cada um dos ensaios para que a fluorescência fosse visualizada em um microscópio de fluorescência.

3.2.2.7. Ensaios de expressão da Luciferase

Para realização desse experimento, foi utilizado o kit *Lightswitch Assay Reagent* (Active Motif), que utiliza o gene repórter da luciferase *RenSP* e é indicado para estudos da regulação gênica em eventos transcripcionais e pós-

transcrpcionais, mensurando a atividade funcional da região promotora. Foram uma sequência de quatro dias conforme descritos abaixo:

Dia 1: 50.000 células HEK-293, foram cultivadas em placas de 12 poços contendo meio DMEM + 10% SBF, por 24 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

Dia 2: As células foram transfectadas com 250 ng/poço de DNA de cada construção, mais 1,5 µl de FuGene HD por poço (razão 3:1). As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

Dia 3: O meio foi descartado e 100 µL de PBS foi acrescentado em cada poço. As placas foram vedadas e congeladas em freezer -80°C (6 a 24 horas).

Dia 4: As células foram despregadas do poço e transferidas para um tubo de 1,5 mL. Alíquotas de 100 µL de *buffer* + substrato específico para usar com *RenSP* (fornecidos no kit) foram adicionados a cada tubo. As amostras ficaram no escuro por 30 minutos e em seguida, as medições foram iniciadas em um luminômetro (Glomax® 20/20 - Promega).

Três testes independentes foram realizados para validar esse experimento.

3.2.3. Estudos in silico

As análises estruturais para algumas das mutações encontradas também foram realizadas para melhor compreensão dos efeitos da troca de aminoácido na proteína SF-1. Para os estudos do domínio de ligação ao DNA, o modelo resolvido em solução por ressonância magnética nuclear utilizado foi PDB ID: 2FF0 de camundongo com 100% de similaridade com a proteína SF-1 humana (LITTLE et al., 2006a). Foi solicitada a modelagem da estrutura da proteína normal e mutante no software Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) para fins comparativos de estrutura. A

visualização e manipulação das estruturas foram realizadas através da interface gráfica gerada pelo programa de acesso *STING Millennium* (<http://sms.cbi.cnptia.embrapa.br/SMS/STINGm/>) e pelo programa *PyMOL Viewer*.

Para as alterações encontradas na região não traduzida do gene, foram realizadas análises *in silico* utilizando o programa *AliBaba2.1 Gene Regulation* (<http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>), que avalia a existência de motivos reguladores. Inserindo a sequência normal e a mutante no programa, foi possível avaliar se a região da alteração está localizada em um sítio de reconhecimento para fatores de transcrição, e se, com a troca nucleotídica, estes sítios foram alterados ou não.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi identificado um total de 12 mutações no gene *NR5A1*. Destas, cinco estão localizadas na região não codificante do gene, cinco estão no domínio de ligação ao DNA (DBD) e outras duas se encontram no domínio de ligação ao ligante (LBD).

A tabela abaixo e a Figura 14 reúnem e ilustram as 12 mutações, com suas respectivas posições no gene e/ou proteína. Os dados clínicos de cada paciente foram descritos anteriormente na Tabela 3.

Tabela 5. Alterações encontradas no gene *NR5A1*.

PACIENTE	TROCA NUCLEOTÍDICA	POSIÇÃO NO GENE	ALTERAÇÃO PROTÉICA	POSIÇÃO NA PROTEÍNA
1	c.95G>A	Éxon 2	p.S32N	DBD
2	c.115C>T	Éxon 3	p.R39C	DBD
3 - 5	c.195G>A	Éxon 3	p.C65Y	DBD
6	c.164G>C	Éxon 3	p.C55S	DBD
7	c.288_304del	Éxon 4	p.M98Gfs*44	DBD
8	c.741C>A	Éxon 4	p.C247*	LBD
9	c.1187delA	Éxon 7	p.K396Rfs*34	LBD
10	c.-133G>A	Éxon 1 (5'UTR)	-	Não codificante
11 - 15	c.-156_-139dup	Éxon 1 (5'UTR)	-	Não codificante
16	c.-413G>A c.-207C>A	5'	-	Não codificante
17	c.-762C>T	5'	-	Não codificante

Os resultados foram divididos em alguns tópicos principais e serão apresentados na seguinte ordem:

- Mutações identificadas no Domínio de Ligação ao DNA;
- Mutações identificadas no Domínio de Ligação ao Ligante;
- Mutações identificadas na região não codificante do gene *NR5A1*;

- Visão geral das mutações no gene *NR5A1*.

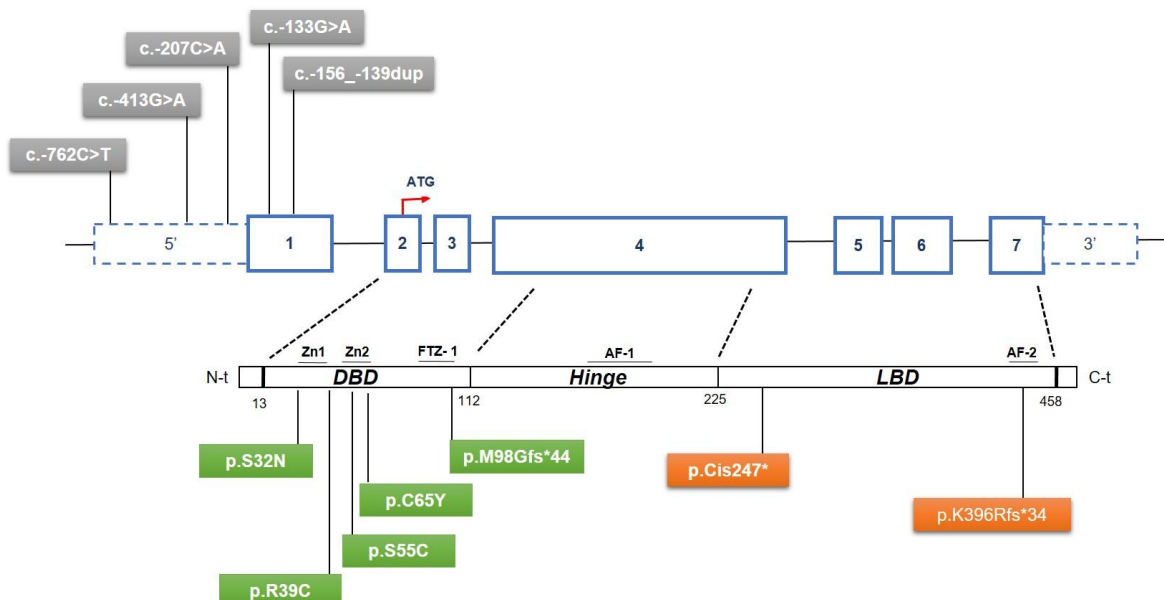


Figura 14. Distribuição das mutações identificadas no gene *NR5A1* e respectiva posição na proteína SF-1.

Ilustração mostrando a posição de cada um dos éxons do gene *NR5A1*, em relação aos domínios da proteína SF-1, ressaltando a posição de cada uma das mutações apresentadas neste trabalho. Nos quadros em cinza, encontram-se as cinco mutações identificadas na região não codificante do gene (éxon 1 e região 5'); em verde, estão as cinco mutações identificadas no domínio de ligação ao DNA (DBD), e em laranja, as duas mutações localizadas no domínio de ligação ao ligante (LBD) da proteína SF-1.

4.1. MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO DNA

4.1.1. Descrição das mutações p.S32N, p.R39C e p.C65Y

Três mutações localizadas no DBD tiveram seu impacto funcional avaliado através de estudos *in vitro*. A primeira delas foi resultado da troca nucleotídica em heterozigose de uma guanina por uma adenina (c.95G>A) no

éxon 2 (Figura 15A), levando a substituição de uma serina por uma asparagina no resíduo 32 da proteína. O paciente 1 foi encaminhado ao serviço com 4 meses de idade apresentando genitália ambígua, *falus* de 4 cm com *chordde*, abertura uretral penoscrotal, gônadas palpáveis na bolsa e cariótipo 46,XY. Valores hormonais revelaram testosterona total de 20 ng/dL e após estímulo com hCG de 80 ng/dL (considerado uma resposta parcial). Ultrassonografia revelou vagina em fundo cego e ausência de útero. Os resultados histológicos mostraram testículos disgenéticos bilateralmente, confirmando o diagnóstico de DG Parcial. O sexo masculino foi mantido, as gônadas preservadas e a correção da hipospádia foi feita aos 6 anos de idade. O paciente tem sido acompanhado pelos últimos 29 anos e mostrou crescimento normal, puberdade espontânea e produção de testosterona normal.

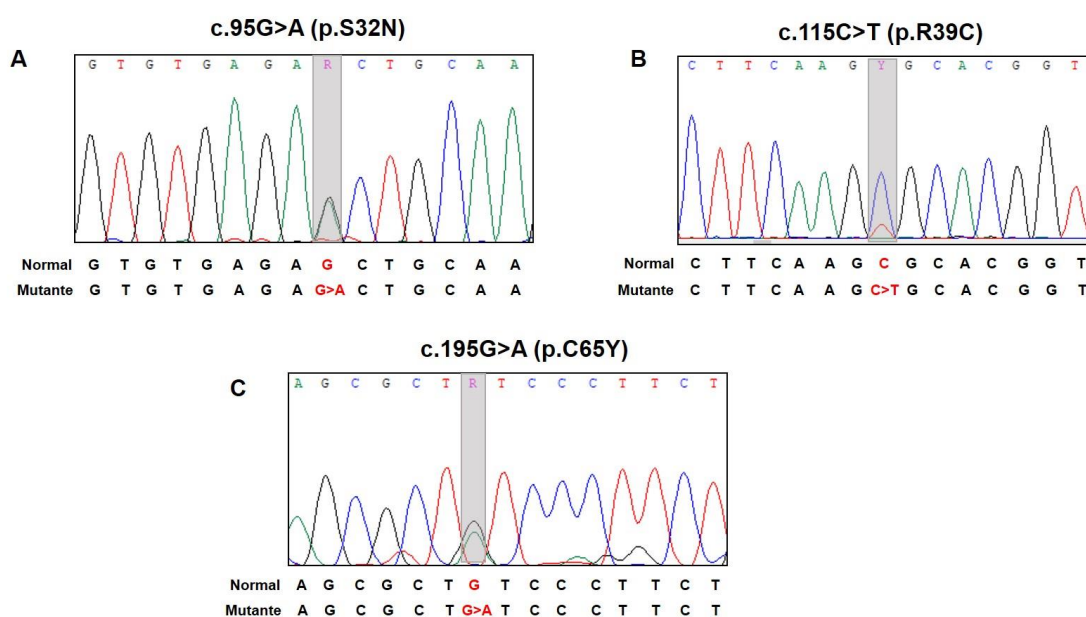


Figura 15. Parte dos eletroferogramas referentes a cada mutação identificada no DBD.

A) Substituição em heterozigose de uma guanina por uma adenina no éxon 2 (c.95G>A), levando à mutação p.S32N, identificada em um paciente 1 com DG Parcial 46,XY. **B)** Substituição em heterozigose de uma citosina por uma timina no éxon 3 (c.115C>T), levando à mutação p.R39C, identificada no paciente 2 com diagnóstico clínico sugestivo de DG Parcial 46,XY. **C)** Substituição em heterozigose de uma guanina por uma adenina no éxon 3 (c.195G>A), levando à mutação p.C65Y, identificada em três irmãos (pacientes 3-5) com diagnóstico clínico sugestivo de DG Parcial 46,XY.

Em relação à proteína, o resíduo 32 se localiza no primeiro dedo de zinco do DBD. De acordo com os estudos *in silico*, o resíduo S32 na proteína normal, estabelecia contatos internos com quatro outros resíduos, R69 (5.53 Å), F36 (5.94 Å), E31 (5.58 Å) e C33 (4.9 Å); na proteína mutante, o contato R69 foi perdido, e os outros três foram mantidos, apenas com modificações entre suas distâncias [F36 (5.29 Å), E31 (5.74 Å) e C33 (5.47 Å)]. Também foi observado que a ligação com o dedo de zinco foi perdida, fazendo com que a proteína mudasse sua conformação para poder estabelecer um novo contato com o resíduo D18 (5.55 Å). Essa mudança provavelmente afeta a conformação da proteína nessa região, prejudicando a interação com o DNA (Figura 16).

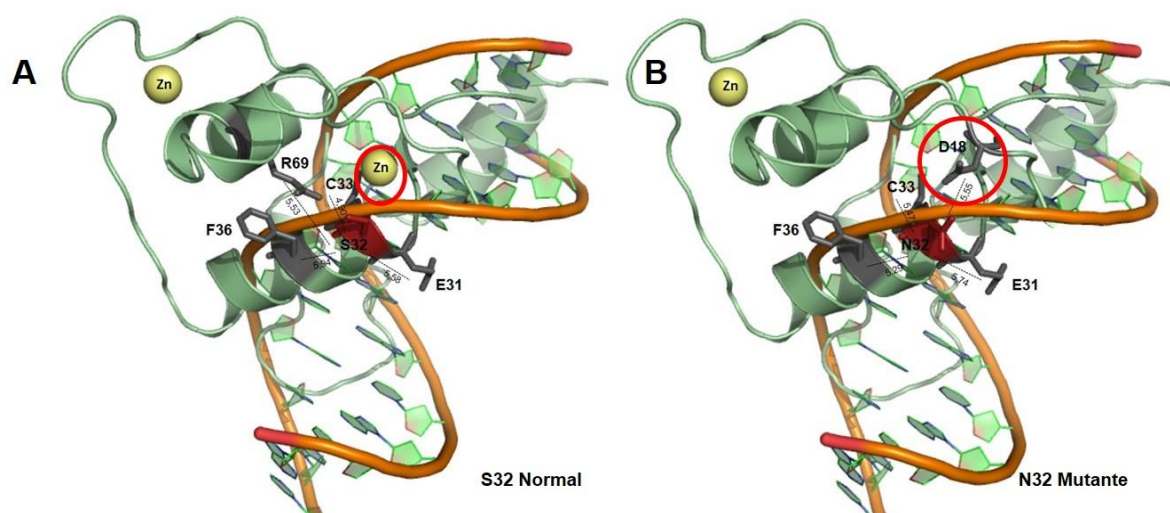


Figura 16. Análise estrutural da mutação p.S32N.

A) No modelo gerado para a proteína normal, o resíduo S32 (em vermelho) estabelece quatro contatos internos com diferentes aminoácidos (em cinza), R69, C33, E31 e F36, além de se ligar ao átomo de zinco. **B)** Na proteína mutante, N32 perde o contato com R69 e mantém os outros três. Além disso, a ligação com o átomo de zinco também é desfeita, e no lugar cria-se um novo contato interno com o aminoácido D18 (círculo vermelho), indicando uma possível mudança conformacional na estrutura da proteína.

A segunda mutação foi identificada no éxon 3, se trata de uma troca em heterozigose de uma citosina por uma timina na posição 115 do gene

(Figura 15B), levando a uma substituição de uma arginina por uma cisteína no resíduo R39, localizado entre o primeiro e o segundo dedo de zinco da proteína SF-1. O paciente 2 foi encaminhado com 37 dias de vida apresentando genitália ambígua, gônadas palpáveis no canal inguinal e registro feminino. O cariótipo era 46,XY e com 5 meses de vida a família decidiu mudar o registro de criação da criança para o masculino e hoje ela espera por cirurgia de reparo da hipospádia. A mutação p.R39C também foi encontrada na mãe da criança.

A análise estrutural demonstrou poucas variações entre a proteína normal e a proteína mutante. A proteína nativa (R39) e a proteína mutante (C39) estabeleceram os mesmos contatos internos com quatro diferentes resíduos (G35, K38, N43 e T40), apenas com algumas variações nas distâncias entre os aminoácidos (Figura 17). Os dois dedos de zinco também foram preservados, o que já era de se esperar uma vez que o resíduo 39 não está diretamente ligado ao átomo de zinco. Estes modelos sugerem que talvez não tenha havido mudança conformacional significativo na estrutura da proteína.

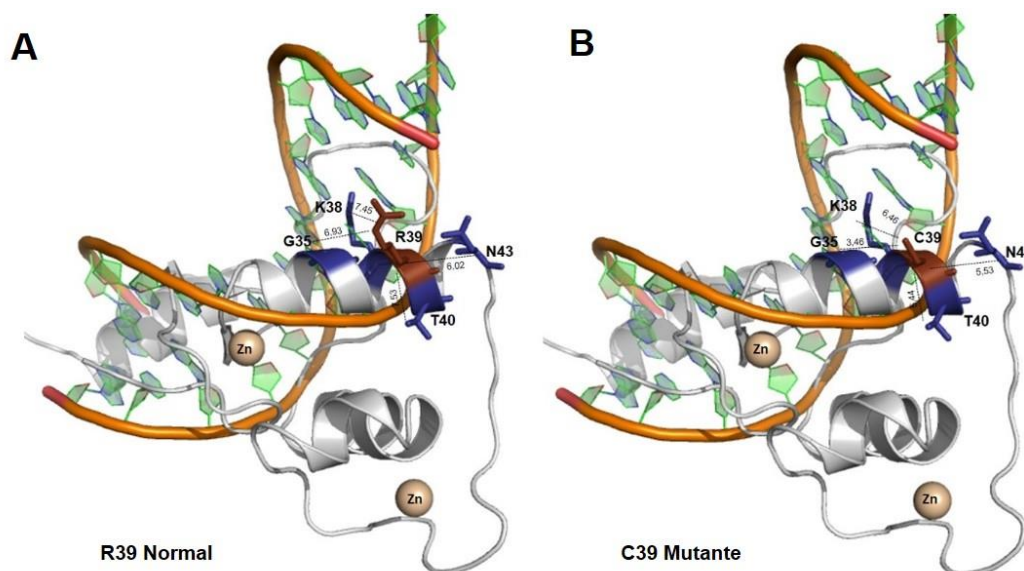


Figura 17. Análise estrutural da mutação p.R39C.

A) No modelo gerado para a proteína normal, o resíduo R39 (em marrom), estabelece quatro contatos internos com diferentes aminoácidos (em azul), G35, K38, N43 e T40. **B)** No modelo da proteína mutante, é possível observar que mesmo após a mutação, o resíduo C39 manteve os quatro contatos internos, bem como a ligação com os dois dedos de zinco.

A terceira mutação foi identificada em três irmãos (pacientes 3-5) com diagnóstico clínico sugestivo de DG Parcial 46,XY. Trata-se de uma troca de uma guanina por uma arginina no éxon 3 (Figura 15C), levando à substituição na proteína de uma cisteína por uma tirosina no resíduo 65, localizado no segundo dedo de zinco do DBD. O caso índice (paciente 3), hoje com 18 anos, foi encaminhado ao serviço com 9 meses, apresentando genitália ambígua e sexo feminino, que posteriormente foi alterado para masculino. O segundo irmão (paciente 4), hoje com 10 anos, nasceu também com genitália ambígua, hipospádia penoscrotal, gônadas palpáveis na bolsa e tinha registro no sexo masculino. O terceiro irmão (paciente 5), atualmente com 9 anos, nasceu com genitália ambígua, abertura uretral perineal, gônadas palpáveis no canal inguinal e também foi registrado no sexo masculino. Todos tinham cariótipo 46,XY, tiveram correção de hipospádia e estão bem adaptados ao sexo de criação.

Em relação à proteína, os estudos *in silico* mostraram que a proteína normal estabelecia quatro contatos internos com diferentes resíduos [R64 (5.82 Å), R69 (9.36 Å), P66 (4.34 Å) e C68 (4.57 Å)], e após a mutação, Y65 manteve esses contatos, porém perdeu a ligação com o átomo de zinco e criou, em seu lugar, um novo contato com o aminoácido C55 (6.19 Å), indicando uma mudança significativa na conformação da proteína nessa região (Figura 18).

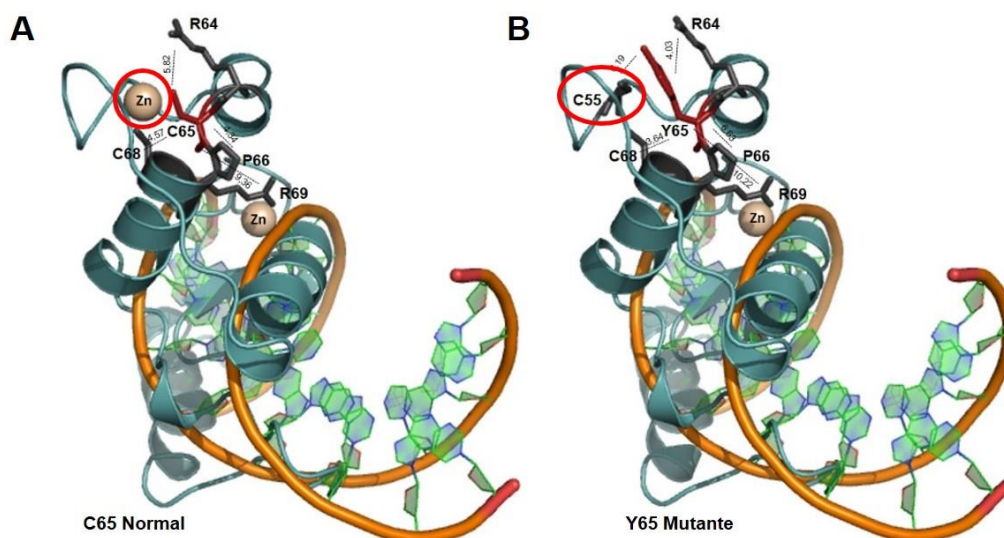


Figura 18. Análise estrutural da mutação p.C65Y.

A) No modelo gerado para a proteína normal, o resíduo C65 (em vermelho) estabelece quatro contatos internos com diferentes aminoácidos (em cinza), R64, C68, P66 e R69, além de se ligar ao átomo de zinco. **B)** Na proteína mutante, Y65 manteve todos esses contatos, porém perdeu a ligação com o átomo de zinco e estabeleceu no lugar um novo contato com o resíduo C55 (círculo vermelho), indicando uma possível mudança conformacional na estrutura da proteína.

4.1.2. Estudos funcionais das mutações no DBD

4.1.2.1. Atividade transcricional através do gene da luciferase e Western Blot

Os primeiros experimentos realizados foram os ensaios de expressão de Luciferase, que tinham por finalidade testar a capacidade que as proteínas mutantes tinham de transativar dois promotores específicos, *HAM* e *STAR* clonados em *cis* com o gene da luciferase usado como repórter em células HeLa. Estes promotores foram escolhidos pelo fato de que a proteína

SF-1 regula tanto a expressão do *HAM* nas células de Sertoli, como algumas enzimas esteroidogênicas (exemplo a *STAR*) nas células de Leydig (Figura 8).

Dessa maneira, comparando-se os SF-1 mutantes com o WT (pMyc-SF1), observou-se que em todos os casos, a capacidade de transativação da proteína mutante foi reduzida drasticamente frente a ambos os promotores (Figura 19A). Frente ao promotor *STAR* as atividades foram um pouco mais elevadas quando comparada com o *HAM*, porém em ambos os casos o prejuízo na capacidade de transativação variou entre 85% e 98%. Através dos resultados do *Western Blot*, foi possível observar que todas as proteínas foram expressas em quantidades semelhantes pelas células HeLa (Figura 19B).

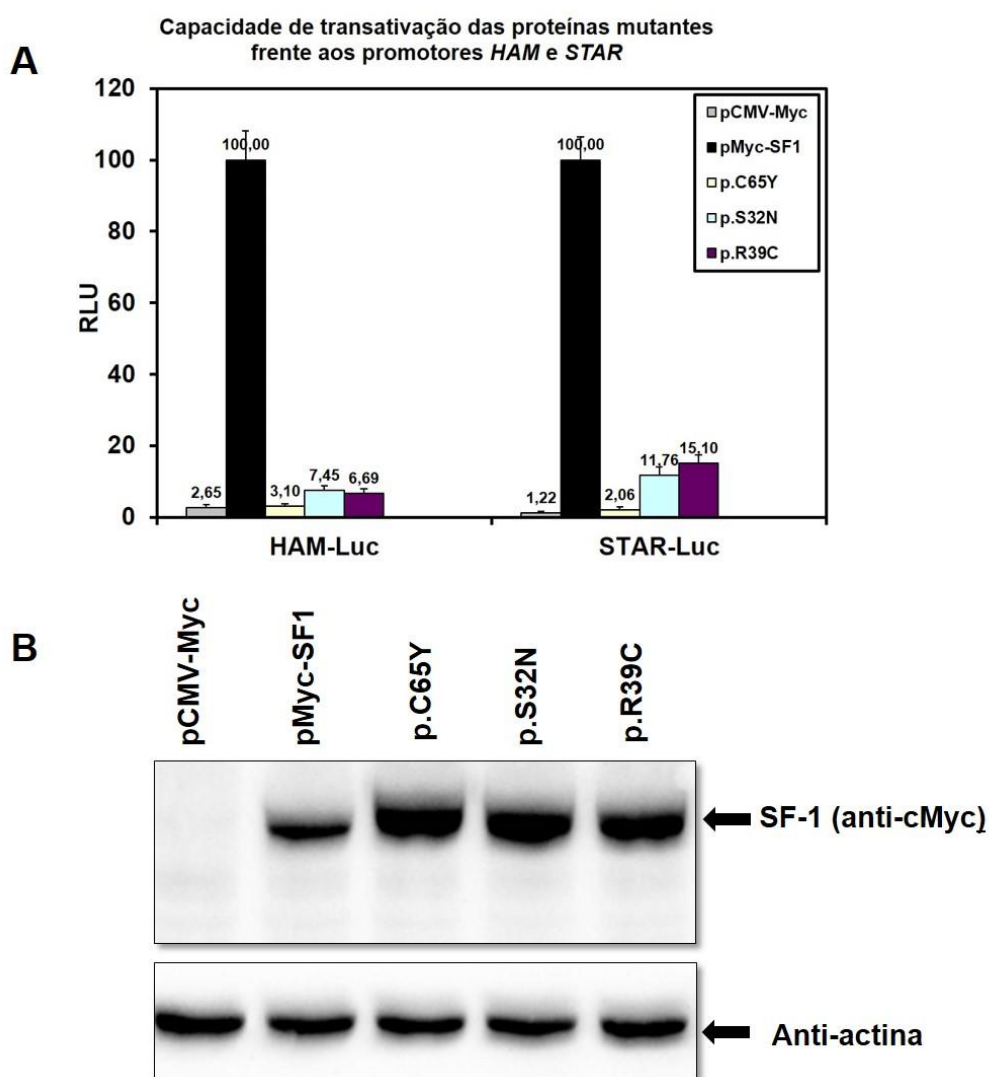


Figura 19. Resultados obtidos através dos estudos funcionais para as mutações identificadas no DBD da proteína SF-1.

A) Resultados obtidos da normalização de três experimentos independentes para testar a capacidade de transativação de NR5A1 normal e mutantes frente aos promotores *HAM* e *STAR*. As três mutações localizadas no DBD demonstraram uma drástica redução da atividade em todos os casos (atividade transcricional observada dos mutantes foi de apenas 2 – 15%). RLU: *relative luciferase activity*. **B)** Resultados obtidos através do *Western Blot*, mostrando que as células HeLa expressaram todas as proteínas mutantes testadas. Actina foi usada como um controle de carregamento.

4.1.2.2. Ensaios de Deslocamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA)

Em seguida, foi testada a capacidade que estas proteínas mutantes tinham em se ligar ao DNA alvo. Para tal, após a transfecção, foi realizado primeiramente um *Western Blot*, usando anticorpos específicos para o extrato nuclear e para o extrato citoplasmático, a fim de verificar a pureza dos extratos isolados (Figura 20). Uma vez confirmada a expressão da proteína mutantes em todos os casos, os Ensaios de Deslocamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA) foram realizados.

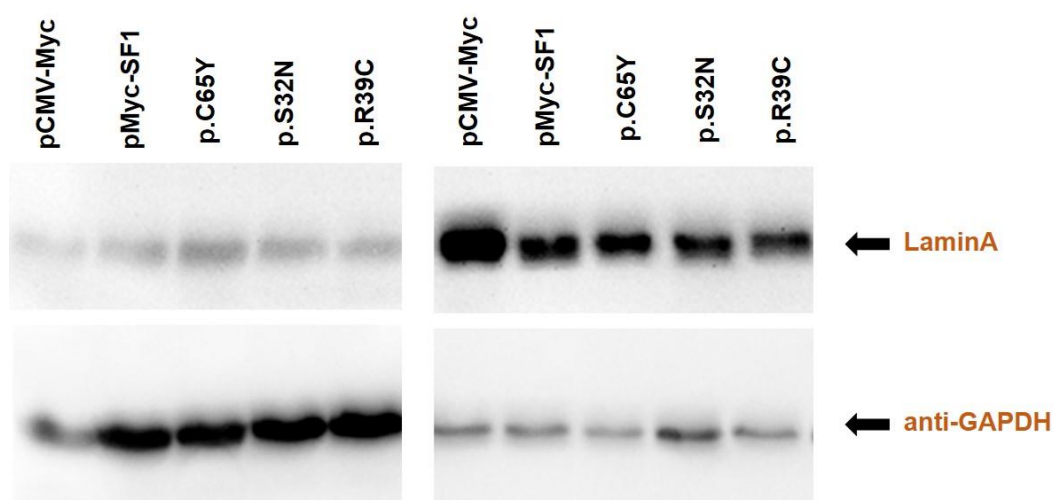


Figura 20. Western Blot realizado a partir dos extratos celulares para as mutações identificadas no DBD.

Resultados obtidos a partir do Western Blot, mostraram que houve expressão proteica tanto no extrato nuclear quanto no citoplasmático. Utilizou-se o anticorpo LaminA para revelar os extratos nucleares, e anti-GAPDH, para revelar os extratos citoplasmáticos.

Através do EMSA observou-se para todos os casos, que as mutações fizeram com que a proteína mutante não fosse mais capaz de reconhecer e se ligar ao DNA alvo (Figura 21), não formando assim o complexo DNA-proteína, visto apenas no caso do WT. Considerando a importante localização que os

resíduos afetados ocupam no domínio de ligação ao DNA, esses resultados já poderiam ser esperados, à exceção da mutação p.R39C que no modelamento não demonstrou efeito significativo. No entanto, no ensaio de ativação transcricional demonstrou um efeito importante retendo apenas cerca de 7% e 15% da atividade transcricional frente aos promotores de *HAM* e *STAR*, respectivamente. Ainda, no ensaio de ligação ao DNA, embora demonstrasse um sinal fraco de ligação ao DNA-alvo, seu efeito foi significativamente negativo.

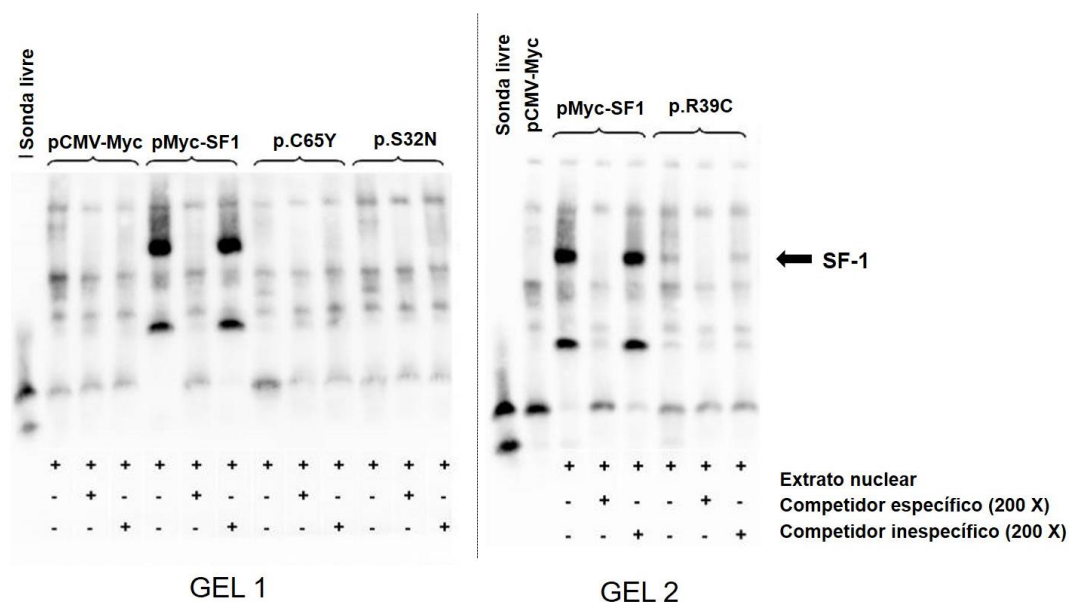


Figura 21. Resultados obtidos através do EMSA para as mutações no identificadas no DBD.

Para esse experimento, pCMV-Myc foi usado como controle negativo e WT pMyc-SF1 como controle positivo. Foram três reações independentes, a primeira contendo o extrato nuclear e somente a sonda do DNA marcada com biotina; a segunda, com o extrato nuclear, a sonda do DNA marcada com biotina e uma sonda de DNA alvo não marcado (competidor específico) em altas concentrações; e a terceira, com o extrato nuclear, a sonda do DNA marcada com biotina e uma sonda de DNA alvo mutada, também não marcada (competidor inespecífico) em altas concentrações. Nos casos das mutações p.S32N e p.C65Y, o complexo DNA-proteína não foi formado. Para a p.R39C observa-se a formação do complexo DNA-proteína bem reduzida.

4.1.3. O impacto das mutações no DBD na proteína formada

O domínio de ligação ao DNA (DBD) é formado por dois dedos de zinco e uma região acessória conhecida por FTZ-F1. O primeiro dedo de zinco contém uma região proximal (*P-box*) que está envolvida no reconhecimento de sequências de DNA alvo específicas pelos fatores nucleares, e também é responsável pela interação com o sulco maior da molécula do DNA (EVANS, 1988; LIN; ACHERMANN, 2008). Neste trabalho foram estudadas três mutações localizadas em importantes aminoácidos desse domínio: p.S32N localizada no primeiro dedo de zinco, mais precisamente dentro do *P-box*; p.C65Y identificada em uma das quatro cisteínas que coordenam o átomo de zinco no segundo dedo; e p.R39C, localizada em uma arginina conservada entre os dois dedos de zinco (Figura 22).

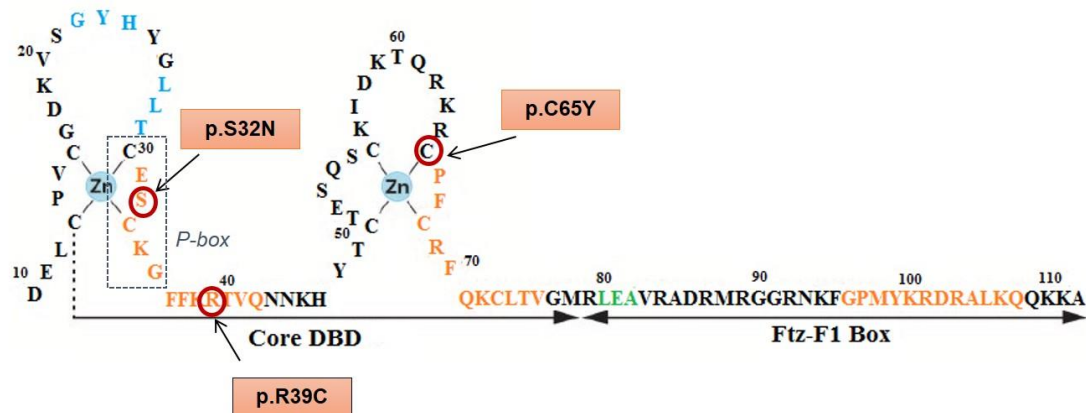


Figura 22. O domínio de ligação ao DNA da proteína SF-1.

Esquema ilustrando o DBD da proteína SF-1 com os dois dedos de zinco e a região acessória FTZ-F1. Os círculos vermelhos representam os aminoácidos onde se localizam as mutações aqui estudadas: p.S32N, localizada no resíduo S32 dentro do *P-box*, do primeiro dedo de zinco; p.R39C, localizada na arginina 39, entre os dois dedos de zinco; e p.C65Y, identificada na cisteína C65 do segundo dedo de zinco, uma das quatro cisteínas que coordenam o átomo de zinco [adaptado de (LITTLE et al., 2006b)].

Considerando a importância dessas regiões para a proteína, já poderia se esperar que qualquer alteração em um desses aminoácidos pudesse desestabilizar a conformação dos dedos de zinco ou afetar a interação DNA-proteína. Os estudos *in silico* para as mutações p.S32N e p.C65Y, demonstraram que houve uma provável mudança na estrutura da proteína, na região da mutação uma vez que a ligação com um dos átomos de zinco foi perdida. Esse efeito deletério foi confirmado pelos estudos *in vitro*, que mostraram através do EMSA, que as proteínas mutadas realmente não eram mais capazes de reconhecer e se ligar aos DNAs alvos. Por outro lado, não foi verificada mudança significativa na análise estrutural para a mutação p.R39C, o que indicaria que a conformação da proteína não foi alterada na região da mutação. Talvez isso justifique o sinal fraco remanescente observado na altura da banda que correspondente ao complexo DNA-proteína (Figura 21) no gel do EMSA para essa mutação. Porém outros fatores devem ser considerados: primeiro, comparado com o sinal do complexo formado pelo WT, este sinal está bastante reduzido podendo ser considerado praticamente perdido; segundo, os resultados do modelamento podem não refletir a realidade porque, de acordo com Little *et al.* (LITTLE *et al.*, 2006b), as cadeias laterais dos resíduos K38 e R39 são um pouco distorcidas e por consequência, suas interações podem não terem sido detectadas no processo de resolução da estrutura por ressonância magnética. Sendo assim, a modelagem estrutural pode não corresponder aos resultados de estudos funcionais, assim como no caso aqui apresentado, onde os ensaios de ativação da expressão de luciferase mostraram uma extrema redução na capacidade de transativação de ambos os promotores testados semelhante às outras duas mutações no DBD. Por essas razões, pode-se afirmar que os resultados *in vitro* demonstram que a mutação p.R39C prejudicou significativamente a capacidade de transativação dos promotores testados, bem como a ligação com o DNA alvo testado.

Diversas mutações já foram identificadas no DBD da proteína SF-1, inclusive a primeira descrita no gene *NR5A1*, a p.G35E (ACHERMANN *et al.*, 1999) que se localiza no *P-box* do primeiro dedo de zinco, assim como a nossa p.S32N. Aquela mutação levava a um fenótipo bem severo, incluindo

insuficiência adrenal, disgenesia gonadal completa e persistência dos ductos de Müller. No aminoácido 39 outra mutação também já foi descrita, mas nesse caso se tratava de uma troca de uma arginina por uma prolina (p.R39P) em um paciente com DDS 46,XY (PHILIBERT et al., 2010b). Nosso grupo de pesquisa também publicou outras duas mutações nesse domínio, a p.K38* localizada entre os dois dedos de zinco, e a p.L80Tfs*8 identificada na região acessória FTZ-F1; embora, em ambos os casos, se tratem de mutações que levavam a um códon de parada prematuro no início da proteína, levando a haploinsuficiência do SF-1, associado ao fenótipo de DG Parcial 46,XY apresentado por ambos os pacientes (FABBRI et al., 2016). Em geral, na maior parte dos casos reportados, mutações no DBD levam a fenótipos mais graves e o impacto na função da proteína é maior (CAMATS et al., 2012; PEDACE et al., 2014; SUNTHARALINGHAM et al., 2015).

Sendo assim, conclui-se através dos estudos *in vitro* e *in silico*, que as mutações p.S32N, p.R39C e p.C65Y prejudicam a função da proteína e podem ser responsáveis pelos fenótipos de DDS apresentados pelos pacientes.

4.1.4. Mutações recentemente identificadas no gene *NR5A1* (p.C55S e p.M98Gfs*44)

Recentemente duas mutações ainda não descritas na literatura foram identificadas entre os pacientes triados. A primeira delas foi identificada em heterozigose no exon 3. Trata-se de uma troca de uma guanina por uma citosina na posição 164 do cDNA (Figura 23A), resultando em uma substituição de uma cisteína por uma serina no aminoácido 55, dentro do domínio de ligação ao DNA da proteína. A amostra de DNA do paciente foi encaminhada de Belo Horizonte para análise. O paciente 6 foi avaliado com 2 anos de idade, apresentando genitália ambígua, abertura uretral penoscrotal, gônadas palpáveis na bolsa, cariótipo 46,XY, sexo masculino e valores de FSH, LH e

testosterona normais. Os pais foram analisados, e não apresentaram a mutação, caracterizando-a como uma mutação *de novo*.

A segunda mutação se trata de uma deleção de 17 nucleotídeos (c.288_304del) no final do éxon 4 (Figura 23B), ainda dentro do DBD da proteína SF-1, resultando na mutação p.M98Gfs*44. A paciente 7 foi encaminhada com 17 anos de idade por queixa inicial de amenorreia primária, o cariótipo era 46,XY e o sexo de criação feminino. Ela apresentava tecido mamário e genitália externa feminina, com útero presente. Os resultados histológicos mostraram gônadas bilaterais constituídas por testículo contendo túbulos seminíferos revestidos por células de Sertoli e escassas células germinativas e células de Leydig, presença de epidídimo e ausência de tecido ovariano, confirmando o diagnóstico de DG Parcial 46,XY para essa paciente.

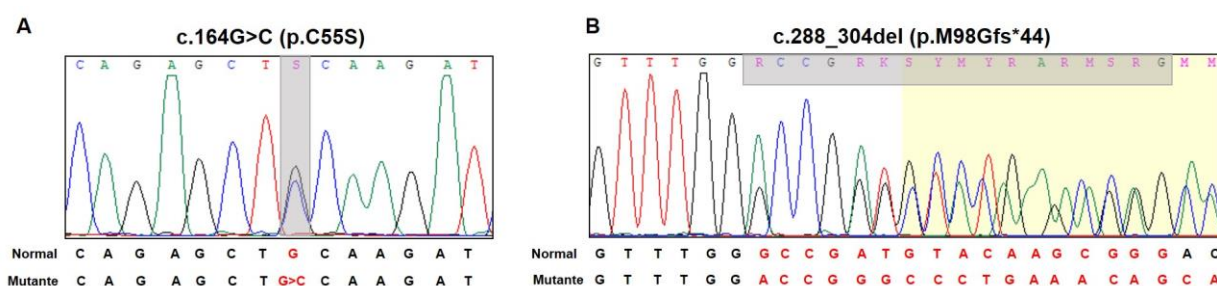


Figura 23. Parte dos eletroferogramas referentes as duas mutações recentemente identificadas no DBD.

A) Resultados obtidos a partir do sequenciamento do éxon 3, mostrando a substituição em heterozigose de uma guanina por uma citosina (c.164G>C), levando à mutação p.C55S identificada no paciente 6 classificado como DDS 46,XY idiopático. **B)** Parte do eletroferograma mostrando a deleção em heterozigose de 17 nucleotídeos no éxon 4 (c.268_285del), levando à mutação p.M98Gfs*44 identificada no paciente 7 com DG Parcial 46,XY.

A análise estrutural foi realizada apenas no caso da mutação p.C55S, uma vez que a outra se trata de uma deleção que elimina cerca de ¾ dos resíduos inviabilizando a modelagem.

A cisteína da posição 55 se localiza no segundo dedo de zinco e faz contato direto com o átomo de zinco. Na proteína normal, a cisteína C55 estabelece contatos internos com os aminoácidos K56, I57 e S54; quando mutada, a serina 55, manteve os mesmos contatos da proteína normal, porém perdeu a ligação com o átomo de zinco, e estabeleceu um novo contato com uma outra serina na posição 52 (S52), indicando uma possível mudança conformacional na proteína na região da mutação (Figura 24). Esses resultados foram semelhantes aos encontrados nos estudos *in silico* para as mutações p.S32N e p.C65Y, nos quais a ligação com um dos átomos de zinco foi perdida e um novo contato foi estabelecido. Levando esses resultados em consideração e a importante posição em que o aminoácido se localiza no DBD, pode-se supor, mesmo sem estudos funcionais, que a mutação afete a proteína formada e provavelmente não seja capaz de se ligar ao DNA, levando ao fenótipo de DDS apresentado pelo paciente 6.

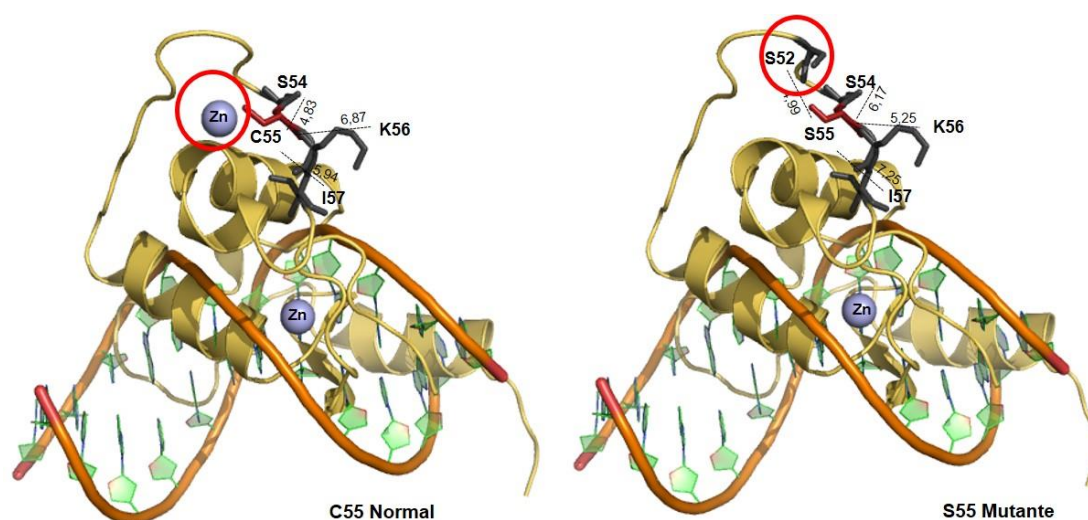


Figura 24. Análise estrutural da mutação p.C55S.

A) Modelo gerado para a proteína normal, mostrando que o resíduo C55 (em vermelho) estabelece três contatos internos com diferentes aminoácidos (em cinza), S54, K56 e I57, além de se ligar ao átomo de zinco. **B)** No modelo da proteína mutante, S55 mantém todos esses contatos internos, porém perde a ligação com o átomo de zinco e estabelece no lugar um novo contato com o resíduo S52 (círculo vermelho).

No caso da mutação p.M98Gfs*44, a deleção em heterozigose gera um *frameshift* com um códon de parada prematuro 44 aminoácidos a frente (Figura 25A), ou seja a proteína é interrompida dentro da região *hinge*, perdendo todo o domínio de ligação ao ligante, incluindo os domínios de ativação funcional AF-1 e AF-2 (Figura 25B). Provavelmente, esse é mais um caso em que o alelo mutante da proteína não será produzido, entrando na via de mRNA *decay*, levando a haploinsuficiência de SF-1. Nosso grupo já descreveu duas mutações que também levavam a haploinsuficiência e resultaram em um fenótipo de DG Parcial 46,XY (FABBRI et al., 2016), assim como a paciente aqui referida.

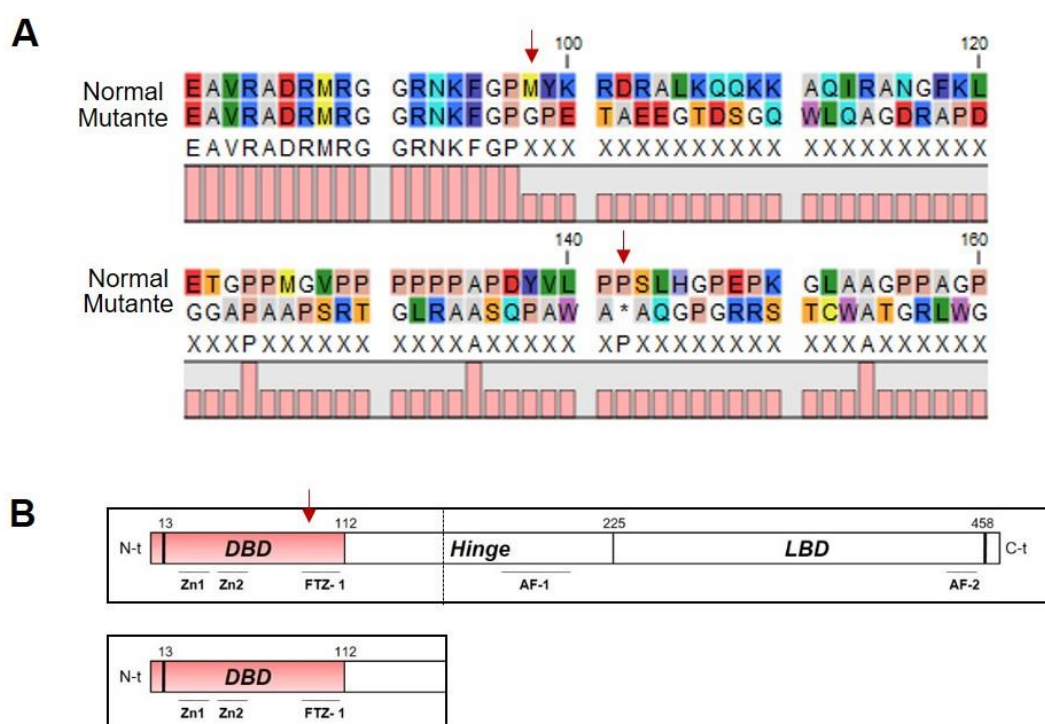


Figura 25. Representação da mutação p.M98Gfs*44 na estrutura da proteína SF-1.

A) Alinhamento da sequência da proteína normal com a proteína mutante. A mutação p.M98Gfs*44 está indicada na seta vermelha, assim como o códon de parada prematuro gerado pela mutação, localizado a 44 aminoácidos a frente. **B)** Ilustração mostrando os domínios da proteína SF-1. A mutação está dentro do DBD (seta vermelha), mas com o *stop* códon gerado metade da porção da região *hinge* e todo LBD seriam perdidos, levando a crer que provavelmente a proteína não seja traduzido.

4.2. MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO LIGANTE

4.2.1. Descrição das mutações p.C247* e p.K396Rfs*34

Duas mutações foram identificadas no domínio de ligação ao ligante (LBD) da proteína SF-1. O primeiro caso se trata de uma troca em heterozigose de uma citosina por uma adenina no final do éxon 4 (Figura 26A), levando a substituição de um códon de cisteína por um *stop* códon na posição 247 da proteína, resultando na mutação *nonsense* p.C247*. O paciente 8 foi encaminhado ao serviço apenas com 20 anos de idade devido a uma genitália ambígua e um caso de recorrência na família, relatando que primeiramente fora registrado no sexo feminino, e ainda durante a infância, mudou para o sexo masculino. Ele apresentava uma abertura uretral penoscrotal, gônada direita palpável no canal inguinal e a esquerda localizada na bolsa escrotal. A ultrassonografia revelou ausência de útero e ausência de derivado de Müller. O paciente recebeu o diagnóstico clínico sugestivo de DG Parcial 46,XY.

A segunda mutação foi identificada no éxon 7 do gene *NR5A1* (Figura 26B). Trata-se de uma deleção em heterozigose de uma adenina na posição 1.187 do cDNA, resultando na substituição de uma lisina por uma arginina no resíduo 396 da proteína, fazendo o deslocamento do quadro de leitura que gera um códon de parada prematuro na posição 430 da proteína, portanto acarreta a mutação em *frameshift* denominada p.K396Rfs*34. O paciente 9 entrou para o serviço com 7 anos de idade, apresentado genitália ambígua, abertura uretral perineal, gônadas palpáveis na bolsa escrotal e registro no sexo masculino. Ele apresentou altos níveis de FSH e LH, indicando um possível quadro de DG Parcial, que foi posteriormente confirmado pela presença de testículos disgenéticos bilateralmente, através da análise histológica. O paciente está bem adaptado ao sexo masculino, teve correção da hipospádia, e atualmente com 9 anos, apresenta crescimento normal, sem

sinais de desenvolvimento puberal. A mãe também foi analisada e não carrega a mutação.

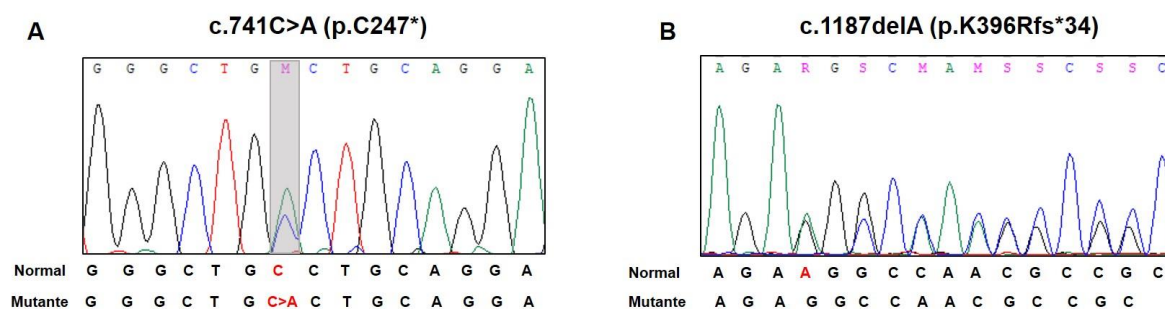


Figura 26. Parte dos eletroferogramas referentes as duas mutações identificadas no LBD.

A) Resultado obtido através do sequenciamento, revelando uma heterozigose de uma citosina e uma adenina no éxon 4 (c.741C>A), levando à mutação *nonsense* p.C247* que foi identificada no paciente 8 diagnóstico clínico sugestivo de DG Parcial 46,XY. **B)** Eletroferogramana mostrando a deleção em heterozigose de uma adenina no éxon 7 (c.1187delA), levando à mutação em *frameshift* p.K396Rfs*34, identificada no paciente 9 também com DG Parcial 46,XY.

4.2.2. Estudos funcionais das mutações no LBD

As duas mutações encontradas no LBD causam códons de parada prematuro nas proteínas formadas, e só por esse fato, em teoria, já seria possível presumir que seus efeitos seriam deletérios para a função proteica. Porém, como discutido anteriormente, os efeitos causados por mutações nesse domínio podem ser muito variáveis (CAMATS et al., 2012), sendo assim, estudá-las funcionalmente seria muito importante para entender melhor seus reais efeitos na função da proteína formada. Além disso, uma das alterações, a p.K396Rfs*34, se localiza na porção final da proteína, fazendo com que se torne ainda mais difícil de se prever o efeito que a perda de apenas 34 aminoácidos possa causar. Por essa razão, tanto a capacidade de transativar

os promotores alvos, quanto a de se ligar ao DNA, foi testada em ambos os casos.

4.2.2.1. Atividade transcricional através do gene da luciferase e Western Blot

Os resultados obtidos através dos estudos funcionais condizem com os descritos na literatura, uma vez que cada mutação gerou um efeito diferente na proteína formada, e o mais interessante, foi que a mutação localizada no final da proteína (p.K396Rfs*34) teve o efeito mais deletério comparada com todas as outras descritas anteriormente, inclusive as do domínio de ligação ao DNA.

Nos ensaios de luciferase, a mutação p.C247* apresentou uma atividade de transativação de cerca de 15-33%, sendo um pouco maior frente ao promotor *STAR* (33%) do que frente ao *HAM* (15%). Já no caso da mutação p.K396Rfs*34, a atividade de transativação de ambos os promotores foi praticamente nula (1%) (Figura 27A).

Os resultados obtidos no *Western Blot* demonstraram que as proteínas foram expressas pelas células HeLa em ambos os casos, porém com tamanhos e intensidades diferentes quando comparadas ao WT. A proteína SF-1 normal (WT) tem 461 aminoácidos, e em ambos os casos, houve a formação de um códon de parada prematuro, gerando uma proteína com 246 aminoácidos (p.C247*) e outra com 429 aminoácidos (p.K396Rfs*34). A proteína SF-1 tem um peso molecular de 53 KDa, e devido ao tamanho das proteínas mutantes geradas, pode-se observar que a proteína p.C247* migrou a uma altura de aproximadamente 27 kDa, enquanto que a p.K396Rfs*34 migrou a 47 kDa, sendo apenas um pouco menor que o WT (Figura 27B).

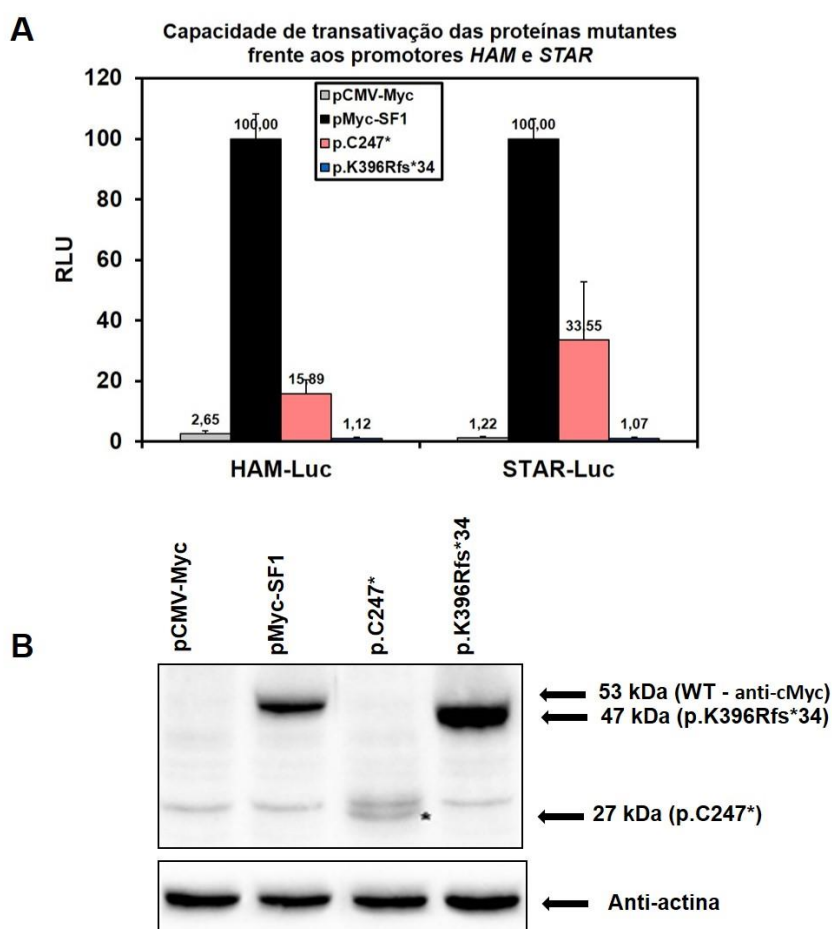


Figura 27. Resultados obtidos através dos estudos funcionais para as mutações identificadas no LBD da proteína SF-1.

A) Resultados obtidos da normalização de três experimentos independentes para testar a capacidade de transativação de NR5A1 normal e mutantes frente aos promotores *HAM* e *STAR*. As duas mutações localizadas no LBD demonstraram uma redução para 15 - 30% de atividade no caso da p.C247*, enquanto que no caso da mutação p.K396Rfs*34, esta atividade foi praticamente nula frente a ambos promotores. RLU: *relative luciferase activity*. **B)** Resultados do *Western Blot*, mostrando a expressão das proteínas normal e mutantes pelas células HeLa. Em ambos os mutantes, o tamanho das proteínas são menores do que o WT pMyc-SF1, pois se tratam de mutações que criam códons de parada prematuro, deixando a proteína menor. A proteína normal apresenta um peso molecular de aproximadamente 53 kDa, a mutante p.C247* de 27 kDa, e a p.K396Rfs*34 de 47 kDa. Também é possível observar pela intensidade das bandas que a proteína p.C247* apresentou menor eficiência de expressão que as outras duas. Actina foi usada como um controle de quantidade de proteína carregada em cada canaleta do gel.

4.2.2.2. Ensaios de Deslocamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA)

Antes dos ensaios de EMSA, a pureza dos extratos nucleares e citoplasmáticos foram testadas através de um *Western Blot*, e observou-se que em ambos os casos os extratos isolados foram devidamente expressos pelas células HeLa (Figura 28).

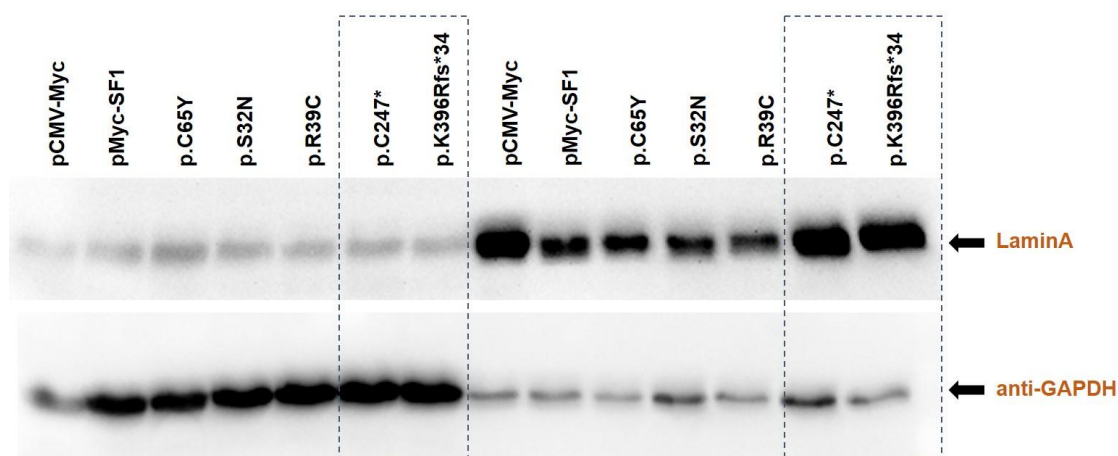


Figura 28. Western Blot realizado a partir dos extratos celulares obtidos para as mutações identificadas no LBD.

Resultados obtidos a partir do Western Blot, mostraram que houve expressão proteica tanto no extrato nuclear quanto no citoplasmático. Utilizou-se o anticorpo LaminA para revelar os extratos nucleares, e anti-GAPDH, para os extratos citoplasmáticos. Os retângulos pontilhados servem para destacar as duas mutações discutidas no LBD, p.C247* e p.K396Rfs*34.

Em seguida, realizou-se o ensaio de EMSA, que demonstrou mais uma vez, um maior impacto para a mutação em *frameshift* ao final do proteína, do que para a mutação *nonsense* no aminoácido 247. Observou-se que na mutação p.C247* a proteína ainda foi capaz de reconhecer e se ligar a molécula de DNA, enquanto que no mutante p.K396Rfs*34, essa capacidade foi perdida e o complexo DNA-proteína não foi mais formado (Figura 29).

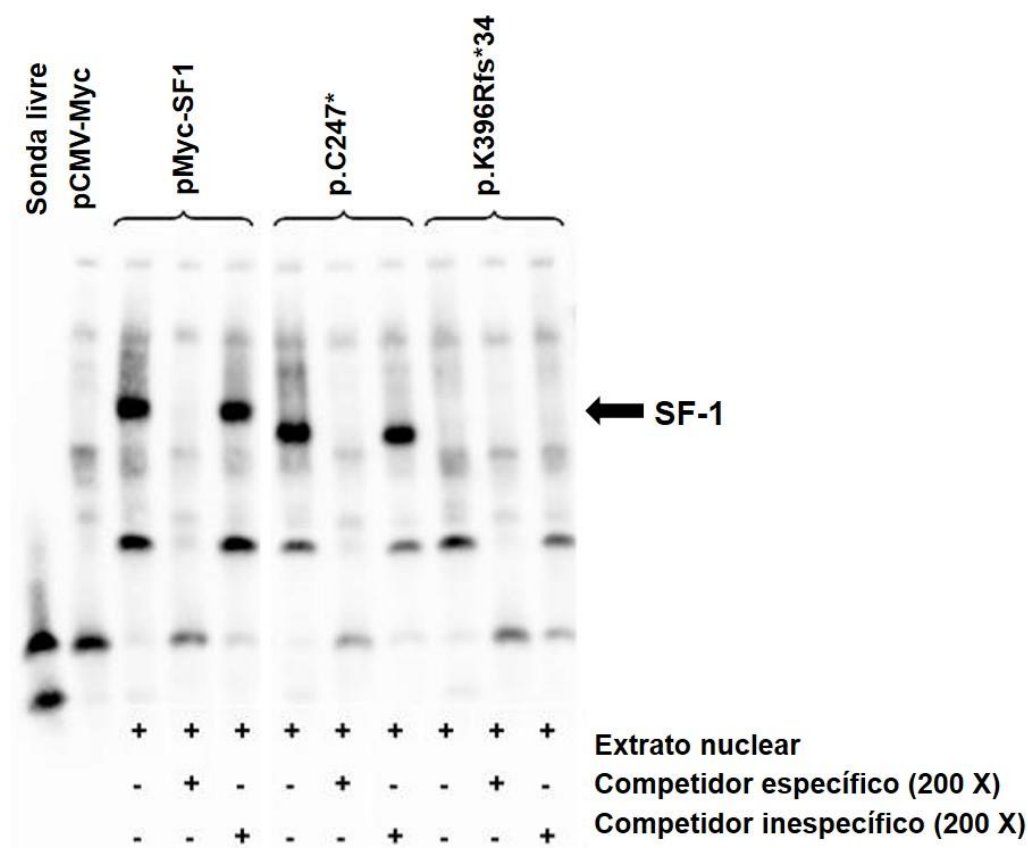


Figura 29. Resultados obtidos através do EMSA para as mutações identificadas no LBD.

Para esse experimento, pCMV-Myc foi usado como controle negativo e WT pMyc-SF1 como controle positivo. Foram três reações independentes, a primeira contendo o extrato nuclear e somente a sonda do DNA marcada com biotina; a segunda, com o extrato nuclear, a sonda do DNA marcada com biotina e uma sonda de DNA alvo não marcado (competidor específico) em altas concentrações; e a terceira, com o extrato nuclear, a sonda do DNA marcada com biotina e uma sonda de DNA alvo mutada, também não marcada (competidor inespecífico) em altas concentrações. Observa-se que para o mutante p.C247* a ligação ao DNA não foi prejudicada, mantendo a formação do complexo proteína-DNA, visualizado no gel como uma banda menor do que o WT, pois se trata de uma mutação com códon de parada prematuro formando uma proteína de menor tamanho. Já para o mutante p.K396Rfs*34 não se observa a banda correspondente ao complexo proteína-DNA indicando que a mutação faz com que a proteína perca a capacidade de ligação ao DNA.

4.2.3. O impacto das mutações no LBD na proteína formada

Ao contrário das três mutações descritas no DBD nas quais observou-se resultados funcionais parecidos entre si, as duas mutações no LBD geraram efeitos bem diferentes na proteína formada.

A proteína mutante p.C247*, apresentou uma atividade de transativação mais alta que a p.K396Rfs*34, provavelmente por se tratar de uma mutação no domínio LBD, que conserva o DBD; entretanto, comparado com o WT, a proteína mutante perde mais de 80% de sua atividade frente ao promotor de *HAM* e mais de 60% frente ao promotor de *STAR* (Figura 27A), o que já é suficiente para indicar que essa mutação tem um efeito deletério para a proteína formada.

Por outro lado, no caso da p.K396Rfs*34, a capacidade de transativação dos promotores foi nula, mesmo com o DBD intacto. Em ambos os casos, houve a formação de um códon de parada prematuro, resultando em uma proteína sem o domínio AF-2. Esse domínio é necessário para a atividade transcricional do gene e pela interação com outros cofatores (HAMMER et al., 1999; HOIVIK et al., 2010; KÖHLER; ACHERMANN, 2010), o que poderia explicar o prejuízo em ambos os casos. Outra hipótese para justificar tal diferença entre ambas as mutações no LBD é que no caso p.C247* a proteína perdeu o domínio LBD inteiro, se tornando uma proteína pequena com um DBD livre para entrar no núcleo e se ligar ao DNA, mesmo com algum dano. Por outro lado, a mutante p.K396Rfs*34, tem grande parte de seu LBD, porém com os últimos 35 aminoácidos completamente diferentes da proteína normal, o que pode interferir na conformação global da proteína, inclusive na formação do domínio de ligação ao DNA. Outra hipótese, é que este domínio anômalo possa estar encobrindo a região do DBD, não permitindo assim, que ele se ligue ao DNA, o que explicaria a não formação do complexo DNA-proteína e a atividade nula de transativação para essa mutação.

Camats e colaboradores descreveram 10 mutações no gene *NRA51* distribuídas entre todos os domínios da proteína e obtiveram resultados

semelhantes aos desse estudo. Para as mutações encontradas no DBD, o impacto na proteína formada foi prejudicial em todos os casos; já para as mutações no LBD, os resultados foram bem distintos, e dependiam da localização de cada uma delas, bem como das alterações que poderiam gerar na especificidade e reconhecimento deste domínio, levando a fenótipos de espectros bem variados, partindo desde mais leves até mais graves (CAMATS et al., 2012). Um outro trabalho foi recentemente publicado descrevendo seis mutações no LBD; o grupo de pesquisadores testou a energia de ligação dessas moléculas em quatro casos através de estudos *in silico*, e em três deles essa energia de ligação aumentou, enquanto que em uma a energia diminuiu, comparadas com o WT. Os fenótipos também variaram, três casos eram de indivíduos que apresentavam clitoromegalia, sexo de criação feminino e cariótipo 46,XY; enquanto que os outros três casos, eram de meninos que apresentavam hipospádia (dois com cariótipo 46,XY e um 46,XX) (DOMENICE et al., 2016). Nos casos aqui apresentados, ambos os pacientes tinham fenótipos parecidos, com um quadro de DG Parcial 46,XY, porém como estamos avaliando apenas dois casos, fica difícil chegar a conclusões precisas sobre o que mutações podem causar quando encontradas nesse domínio. Entretanto, pode-se concluir, a partir dos estudos funcionais e dos resultados apresentados na literatura, que correlacionar genótipo-fenótipo para o domínio de ligação ao ligante pode se tornar uma tarefa ainda mais difícil do que para o restante da proteína.

4.4. MUTAÇÕES IDENTIFICADAS DA REGIÃO NÃO CODIFICANTE DO GENE NR5A1

4.4.1. Descrição das alterações c.-762C>T, c.-413G>A, c.-207C>A, c.-156_-139dup e c.-133G>A

Cinco alterações foram identificadas na região não codificante do gene *NR5A1*, sendo três localizadas na região promotora 5' e duas no éxon 1 não traduzido (Figura 30).

ACGCGTGCTACCCTGTCCTATCCTGGACTAGCTTCATACTTGGTTCAACCTGGGGCCACTATAGCCACCACTTGGC
 CTCAGAGGCAGTCTCAGCCCAGCCTCAGTTTTTCCAGCCATCGACTGGGAACATCAGCAGCCCACAGCAGATGA
 GGACATTCAGAGGCCAC¹C¹GTGGCATGCACGCACCAAGGTGTCCAGGCCGCTCACCTGCTCCCCCTCCGGCCCCC
 CTCTTCTTCCACCTGATGGAAGAGGAAAAAGAGGTGGAAGCAGCAGGCCGCTAGTCAAGTCGCCATGGCCTTG
 CCTCCGCACTGGCCTGTCCTGACTCTACTCCAATGTCCGGGTGGGCCAGACCATGCCAGGCCAGGCCCCAGG
 GAGGTAGCCATTCAACAAGGAGAGAGGAGCAGGCCGGCAGGCCGGGTGGGGGAGCAGCCATAAATCAAGCCCCA
 CTCCCACCCGGTTTCTAACAAGCGGGGCTGCCTACCCGCCTCTGTGGGGTCCCTGCCTCTGGGCTCCACAGC²G²
 GGCCTGGAACAGCCAGCTGGCCAAGGCCTCTGCAGTGCCTTGGCCTCCGCCCCACCCCTCAGCCCCCAGATAG
 ATAGGGGTATTTTTTTCTTTTAGGAGAAGAAGAAAAATAGACGTAAATGAAGAGAAACACCAACAAAGAAGGCGA
 GAGGCCTGCAGAGT^{E-Box}CACGTG³GGGGCAGAGAC^{CAAT-Box}CCAATTGG³GCCTCCGGTGGCCCCC³CACCAGGGCG^{GA rich element}GGGAGGA⁴
 GGAGGAGGACGGACGGACAGGGCCAGCCTGCTGTCCGGCTGCCGCCCGCCGT⁴CCGGCTGCCGCCCGCCGT⁴
 GTGT⁵G⁵AGGGGGTTTCTGCGCACCCACAGTCGCCACCGTCCCACCTGGGCTGCCGGAGCCTCCCCCTGGACCCC
 TGGTGCCCACTGCCACCCTCATCCGGTGTGAGAGCGCTGCTTCCGCTTCGTAAGTGAGAGATCT

Figura 30. Parte da região não codificante do gene NR5A1.

Na sequência em preto encontram-se os três elementos regulatórios essenciais para a expressão do SF-1 (*E-box*, *CAAT-box* e *GA rich element*); enquanto que na sequência em azul, está representado o éxon 1 não traduzido. Nas caixas em vermelho estão as mutações encontradas; 3 delas se localizam na região 5' (em preto) e 2 na região 5'UTR (em azul): 1) c.-762C>T encontrada em um paciente; 2) e 3) c.-413G>A e c.-207C>A, respectivamente, identificadas no mesmo paciente; 4) inserção de 18 nucleotídeos (c.-156_-139dup) identificada em 5 pacientes; 5) c.-133G>A, identificada em um paciente.

Iniciando a presente descrição pelas alterações encontradas no éxon 1 não codificante do gene, uma delas foi identificada em heterozigose e consiste na substituição de uma guanina por uma adenina (c.-133G>A) (Figura 31A). O portador da alteração (paciente 10) foi encaminhado com 1 mês de idade apresentando genitália ambígua, abertura uretral penoscrotal, gônadas palpáveis na bolsa e *falus* de 2 cm com *chordee*. O cariótipo era 46,XY, não apresentava derivados de Müller e devido aos elevados níveis de FSH e LH durante a minipuberdade, o diagnóstico de DG Parcial foi inferido. O pai e o irmão do paciente também apresentam a mutação, porém não foram avaliados clinicamente.

A outra variação do éxon 1, c.-156_-139dup, foi identificada em heterozigose em cinco indivíduos com fenótipos bem diferentes, sendo três pertencentes ao grupo de pacientes com infertilidade masculina (pacientes 11-13), um classificado como DDS 46,XY idiopático (paciente 14), e o um com DG Parcial 46,XY (paciente 15). Essa alteração consiste na duplicação de 18 nucleotídeos (Figura 31B).

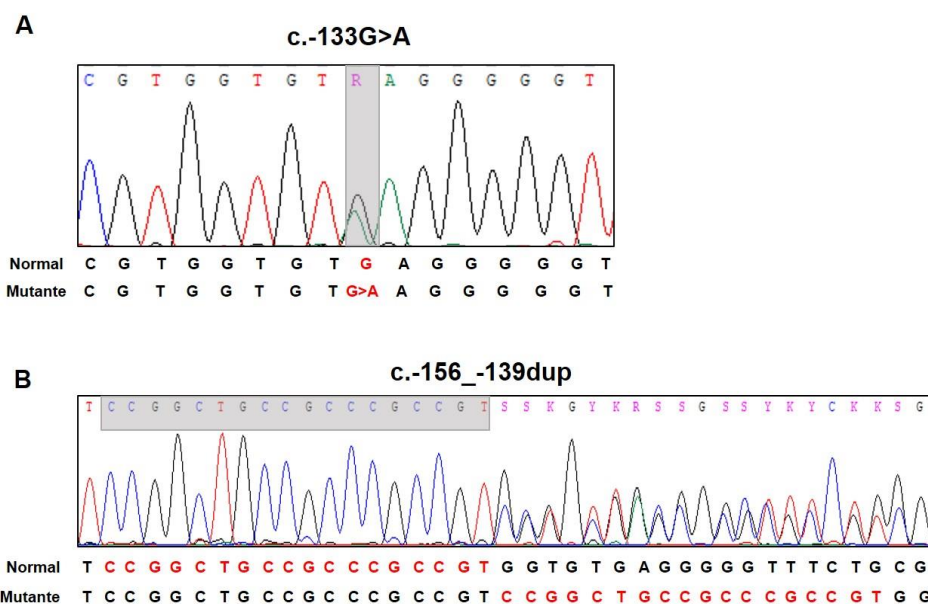


Figura 31. Parte dos eletroferogramas referentes as duas mutações identificas no éxon 1.

A) Resultados obtidos a partir do sequenciamento do éxon 1, mostrando a heterozigose de uma guanina e uma arginina (c.-133G>A) identificada no paciente 10 com DG Parcial 46,XY. **B)** Ainda no éxon 1, foi identificada a duplicação em heterozigose de 18 nucleotídeos (c.-156_-139dup), em cinco pacientes (10-15) com diferentes diagnósticos.

Já na região promotora outras três alterações foram encontradas. Duas delas foram identificadas no paciente 16, sendo a primeira a substituição de uma guanina por uma adenina na posição -413 e a segunda a troca de uma citosina por uma adenina na posição -207 em relação ao início do gene (Figura 32A). Este paciente foi encaminhado ao serviço com 7 meses de idade apresentando genitália ambígua, abertura uretral perineal e gônadas palpáveis no canal inguinal. O sexo de criação era masculino e o cariótipo 46,XY. Testes histológicos revelaram a presença de testículos disgenéticos bilateralmente e derivados de Müller presentes apenas na gônada direita. O diagnóstico de DG Parcial 46,XY foi estabelecido.

A terceira alteração identificada nesta região se trata de uma troca de uma guanina por uma adenina na posição -762 do gene (Figura 31B). O paciente 17 foi encaminhado ao serviço aos 2 meses de idade apresentando genitália ambígua, abertura uretral perineal e gônadas palpáveis na bolsa escrotal. Tinha um *falus* de 2 cm com *chordee*, sexo de criação masculino e cariótipo 46,XY.

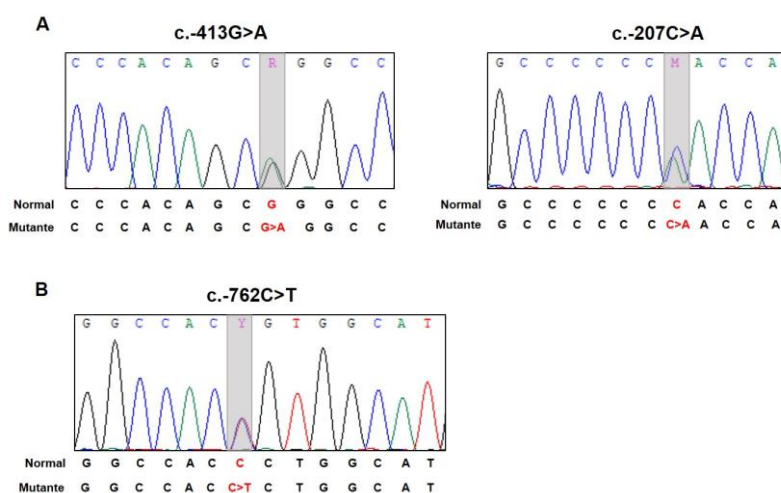


Figura 32. Parte dos eletroferogramas referentes as três mutações identificas na região promotora.

A) Duas substituições em heterozigose foram identificadas no mesmo paciente com DG Parcial 46,XY, a primeira com a troca de uma guanina por uma arginina na posição -413 (c.-413G>A) e a segunda com a substituição de uma citosina por uma adenina na posição -207 (c.-207C>A). **B)** Substituição em heterozigose de uma citosina por uma timina no nucleotídeo -762 do gene, identificada no paciente 17 classificado como DDS 46,XY idiopático.

4.4.2. Predições *in silico* para as alterações da região não codificante

Através do site de predição *Alibaba2.1 Gene Regulation*, foi possível avaliar se a região da alteração estava localizada em um sítio de reconhecimento para fatores de transcrição, e se, com a troca nucleotídica, estes sítios estavam alterados ou não. Dessa maneira, foi possível verificar que em todos os casos as mutações fizeram com que algum sítio de reconhecimento para fatores de transcrição fosse alterado. A troca c.-762C>A fez com que um sítio de reconhecimento para o fator de transcrição NF-muE1 fosse perdido, enquanto que a c.-207C>A aboliu dois sítios, Egr-1 e NF-1 (Figura 33A e B).

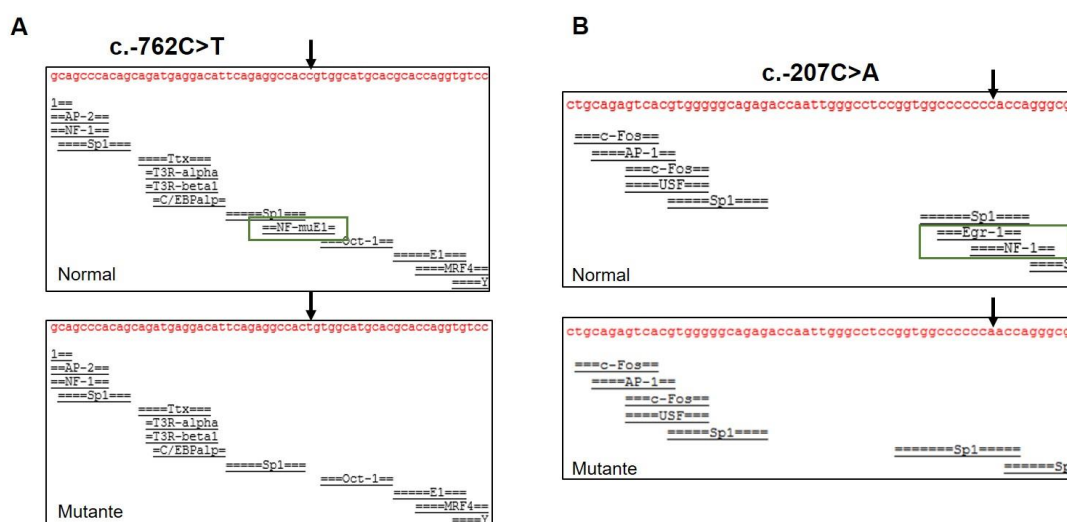


Figura 33. Análises *in silico* realizadas através do programa de predição *Alibaba2.1 Gene Regulation*.

A) Na alteração c.-762C>T, a região em que a citosina (seta preta) da sequência normal se encontrava, era reconhecida por três fatores de transcrição; após a mutação, a timina (seta preta), perdeu um sítio de reconhecimento para a proteína NF-muE1 (retângulo verde). **B)** Na sequência normal da alteração c.-207C>A, a região da citosina (seta preta), era reconhecida por três fatores de transcrição, e após a mutação, dois deles foram perdidos, Egr-1 e NF-1 (retângulo verde).

A proteína SP1, é um importante fator de transcrição que se liga ao DNA e interage com sítios ricos em GC, sendo um dos fatores mais

4.4.3. Estudos funcionais para as alterações da região não codificante

A fim de avaliar o efeito sobre a expressão gênica causado pelas alterações identificadas, ensaios de ativação transcricional usando o gene de luciferase como repórter foram realizados utilizando vetores específicos para cada construção. O vetor *pLightSwitch_Prom* foi utilizado para expressão das mutações na região promotora e não transcrita e o vetor *pLightSwitch_5UTR*, para expressão das mutações no éxon 1 do gene *NR5A1*.

Avaliando a atividade transcricional dos elementos de transcrição presentes no éxon 1 do gene *NR5A1*, observou-se que com a mutação c.-133G>A essa atividade aumentou atingindo um valor de cerca de 400%, sendo muito maior do que o controle normal (WT); por outro lado, a mutação c.-156_-159dup não gerou grande variação, apenas uma redução de aproximadamente 15% da atividade de transcrição dessa região (Figura 35).

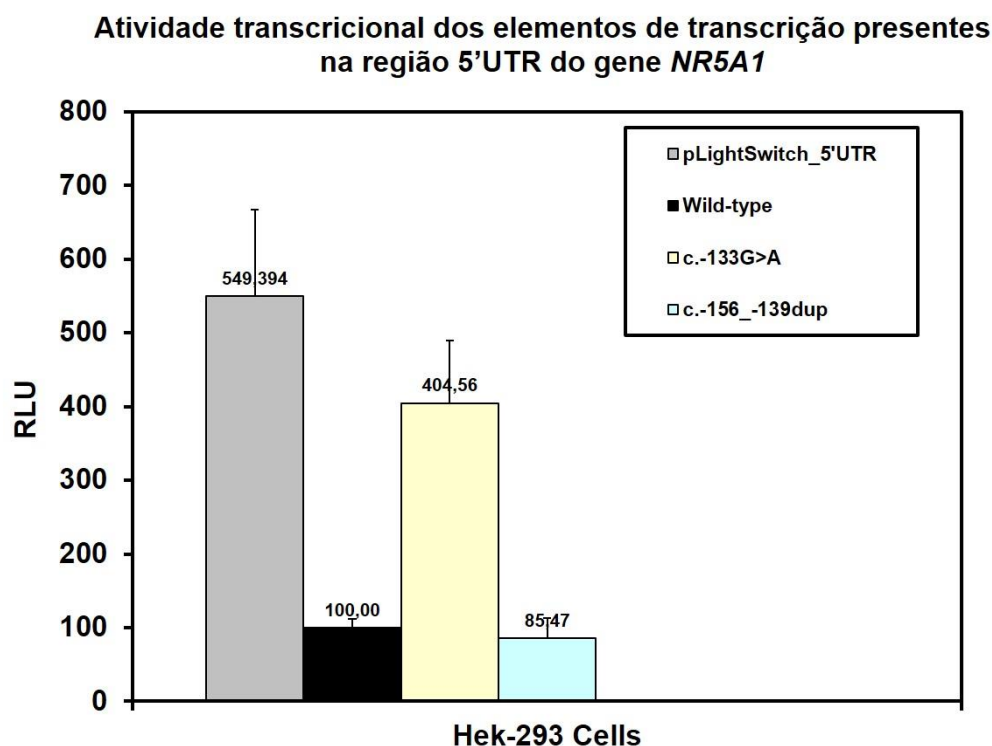


Figura 35. Resultados obtidos através dos ensaios de Luciferase para as alterações identificadas no éxon 1 do gene *NR5A1*.

A atividade transcricional após a mutação c.-133G>A foi drasticamente aumentada, indicando uma possível superexpressão da proteína após a mutação. Já no caso da duplicação de 18 nucleotídeos (c.-156_-159dup), observa-se apenas uma pequena redução da atividade de transcrição quando comparada ao WT. O vetor vazio, usado como controle negativo, aparece mais expresso que o WT, pois ele possui um promotor constitutivo em sua própria sequência. RLU: *relative luciferase activity*.

Assim como observado para as alterações no éxon 1, quando avaliada a capacidade transcricional dos elementos regulatórios encontrados na região promotora do gene, também obteve-se resultados diferentes para cada alteração. A combinação das alterações c.-413G>A e c.-207C>A identificadas em *cis* em um alelo do paciente 16 [verificado por sequenciamento das colônias contendo as mutações (Figura 36)] levaram a uma redução de aproximadamente 50% da atividade transcricional comparado

com o controle normal. Já no caso da alteração c.-762C>T, observou-se que a atividade transcricional nesta região dobrou após a mutação (Figura 37).

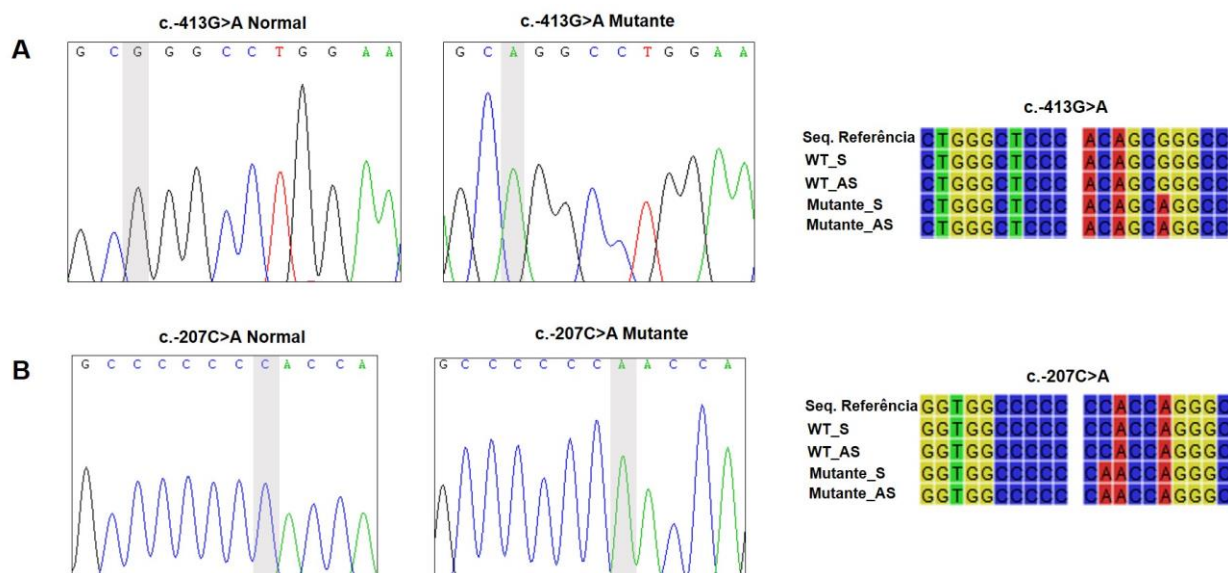


Figura 36. Parte dos eletroferogramas referente ao sequenciamento dos clones mutantes contendo as alterações c.-413G>A e c.-207C>A.

A) A esquerda: Resultados obtidos através do sequenciamento do PCR de colônia, mostrando o alelo normal e o alelo mutante para a mutação c.-413G>A. A direita: alinhamento do clone mutante, com o clone normal (WT) e a sequência referência retirado do banco de dados *Ensembl*. **B)** A esquerda: Resultados obtidos através do sequenciamento do PCR de colônia, mostrando o alelo normal e o alelo mutante para a mutação c.-207C>A. A direita: alinhamento do clone mutante, com o clone normal (WT) e a sequência referência retirado do banco de dados *Ensembl*. Ambas as mutações foram identificadas no mesmo alelo do paciente.

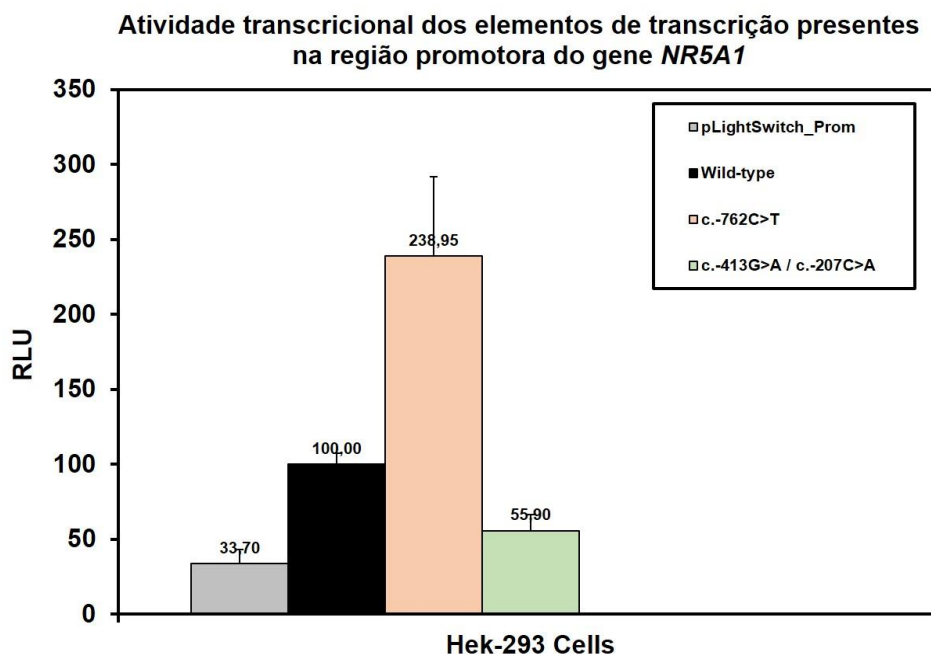


Figura 37. Resultados obtidos através dos ensaios de Luciferase para as alterações identificadas na região promotora do gene *NR5A1*.

A atividade transcricional após a mutação c.-762C>A foi maior de 200%, dobrando do que o observado no controle normal (WT). Já no caso da combinação das mutações c.-413G>A + c.-207C>A identificada no mesmo alelo de uma paciente, observa-se uma redução na atividade em aproximadamente 50%. RLU: *relative luciferase activity*.

4.4.4. O impacto das alterações identificadas na região não codificante para a expressão do gene *NR5A1*

O estudo da região não codificante de um gene pode ser extremamente complexo, uma vez que nem todos os mecanismos de regulação que ativam ou inibem a expressão gênica e geralmente estão encontrados nesta região, são bem caracterizados. Por essa razão, estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo para alterações identificadas neste local também se torna uma tarefa bastante difícil. Nos casos aqui relatados, foram obtidos resultados bastante variados, com mutações que levaram a redução da atividade transcricional, outras que fizeram com que

essa atividade fosse drasticamente aumentada, e um caso em que quase nenhuma alteração foi observada. Porém, mesmo que o diagnóstico não seja completamente explicado por essas variações, algumas considerações podem ser feitas para cada um dos casos.

A combinação das alterações c.-413G>A + c.-207C>A identificadas na região promotora do gene *NR5A1* aparentemente causa um impacto mais evidente na expressão gênica por pelo menos três motivos: primeiro por abolir um sítio de reconhecimento para um importante fator de transcrição (SP1); segundo, por reduzir a atividade transcricional dessa região em quase 50% de acordo com os ensaios de luciferase; e terceiro, por a alteração c.-207C>A encontrar-se diretamente dentro do promotor basal e onde diversas ilhas de metilação foram identificadas (Figura 8). Sendo assim, espera-se que uma redução na capacidade que essa região tem em ser transcrita, possa acarretar em um efeito na estabilidade e produção do mRNA ou até mesmo na eficiência da tradução da proteína, o que poderia explicar o fenótipo de DG Parcial 46,XY apresentado pelo paciente.

Os próximos dois casos, já mostraram um efeito contrário ao descrito anteriormente. As variações c.-133G>A (identificada no éxon 1) e c.-762C>A (localizada na região promotora) levaram a um aumento da atividade transcricional, atingindo valores de 400% e 200%, respectivamente. Sabe-se que o processo de ativação ou inibição da expressão gênica é finamente regulado por diversos fatores, e se uma mutação causa um aumento da atividade de transcrição de uma região isso poderá acarretar em um desequilíbrio dentro da célula. Um região que está sendo induzida a ser superexpressa pode levar a um acúmulo de produção de mRNA, e por consequência de proteína. Especificamente no caso do *NR5A1*, que se trata de um fator de transcrição, este acúmulo de proteína pode também influenciar diretamente na ativação de outros cofatores, que são alvos do SF-1. Vale também ressaltar, que as proteínas tem um importante processo de *turnover*, que se caracteriza pelo balanço entre o quanto ela é produzida e o quanto ela é degradada, sendo assim, se uma mutação faz com que haja uma maior produção de proteína, provavelmente não haverá tempo hábil para ela ser

degradada, prejudicando não apenas seu *turnover*, mas também o relógio molecular que a célula tem para realizar esse processo (O'MALLEY; QIN; LANZ, 2008; SASSONE-CORSI, 1998). Concluindo, é de se esperar que essas mutações que estão levando a um aumento da atividade de transcrição, influenciem direta e indiretamente no funcionamento de várias proteínas dentro da célula, e por consequência, na formação do fenótipo apresentado pelos pacientes.

Por último, no caso da duplicação de 18 pares de base (c.-156_-159dup), os resultados obtidos foram pouco significativos, sendo que houve apenas a criação de mais um sítio de reconhecimento para SP1 segundo os estudos *in silico*, e a atividade de transcrição foi pouco reduzida (cerca de 15%) quando comparada ao WT. Essa alteração, apesar de não ser descrita em nenhum banco de dados, foi identificada em cinco pacientes (mais alguns familiares) com diagnósticos bem variados, indo desde um quadro de infertilidade masculina até uma DG Parcial 46,XY. Sendo assim, apenas essa alteração isolada provavelmente não deve ser a causa dos fenótipos apresentados, porém ela não deve ser descartada, uma vez que se encontra em uma importante região do gene e não foi identificada no resto da casuística estudada. Talvez essa alteração esteja associadas a algum outro fator, como por exemplo, mutações em outros genes, interação com outros cofatores ou até mesmo fatores epigenéticos, e que juntas expliquem o fenótipo dos pacientes. Outro fator interessante é que essa duplicação foi a única encontrada no grupo de pacientes inférteis estudados. A expansão de nossa casuística para estudar pacientes com essa condição se deu ao fato de recentes publicações associarem mutações no *NR5A1* com o quadro de infertilidade masculina (FERLIN et al., 2015; RÖPKE et al., 2013; ZARE-ABDOLLAHI et al., 2015), sendo esse mais um motivo pelo qual não deva-se considerar essa alteração como nula.

Maiores estudos seriam apropriados para elucidar melhor o real efeito que essas alterações causam na transcrição do gene e na expressão da proteína, porém vale ressaltar, que no geral essas variações foram

identificadas em 8 dos 114 indivíduos estudados, evidenciando a importância do estudo da região não codificante do gene *NR5A1* para os casos de DDS.

4.5. VISÃO GERAL DAS MUTAÇÕES NO GENE *NR5A1*

Neste trabalho foram descritas 12 mutações no gene *NR5A1*, sendo sete delas identificadas na região codificante e cinco na região não codificante do gene. Essas 12 alterações foram encontradas em 17 pacientes com fenótipos variados de DDS, entretanto analisando a tabela 3, é possível observar algumas características em comum entre a maioria desses pacientes, como: presença de genitália ambígua ao nascimento, ausência de útero, níveis normais de testosterona e a tendência de criação no sexo masculino. Dados que corroboram os relatados na literatura para mutações no gene *NR5A1*.

Através dos estudos *in vitro* e *in silico* realizados, foi possível elucidar parte do papel que essas mutações exercem na função da proteína e/ou do gene; porém como o *NR5A1* atua em diversas vias e regula tantos outros genes, o real impacto dessas mutações é muito difícil de se elucidar por completo.

Analisando especificamente as mutações da região codificante do gene, uma observação importante é que em todos os casos a função adrenal dos pacientes estava preservada, e as mutações geraram apenas um impacto no desenvolvimento ou na função gonadal. Entretanto, os ensaios de Luciferase para as mutações do domínio de ligação ao DNA, mostraram um efeito drástico na capacidade de transativar o promotor *STAR*, e considerando que a função dessa proteína é fundamental para mediar a transferência do colesterol e, por consequência, regular a biossíntese dos hormônios esteroides (STOCCO, 2000), nós poderíamos esperar um efeito na função adrenal, o que não foi observado em nenhum caso. Isso pode ser explicado pelo fato de que todas as mutações aqui descritas foram identificadas em heterozigose, e esse efeito de dose de SF-1 é mais acentuado nas gônadas do que nas adrenais (JAMESON, 2004). Além disso, pensando em toda cascata do

desenvolvimento sexual que o gene *NR5A1* atua, já poderíamos prever esse prejuízo para as gônadas por pelo menos dois motivos: primeiro devido ao fato que a interação que entre o *NR5A1* e o *SOX9* provavelmente tenha sido prejudicada. O gene *SOX9* é fundamental na diferenciação testicular, e seu produto associado ao *NR5A1* e ao *SRY*, se liga ao seu próprio promotor para manter seus altos níveis de expressão, que são essenciais para a proliferação e diferenciação das células de Sertoli (ARBOLEDA et al., 2015); sendo assim, a mutação no *NR5A1* pode acarretar em um menor número de células de Sertoli encontradas nos testículos. O segundo fator envolve a interação entre SF-1 e HAM, que também muito provavelmente tenha sido interrompida mediante as mutações. Junto com outras proteínas como, *SOX9*, *GATA4*, *WT1* e *DAX1*, o SF-1 regula a expressão do HAM (LASALA et al., 2011), e por essa razão pode-se esperar que uma mutação no *NR5A1* afete a expressão desse hormônio em diferentes níveis, o que poderia inclusive explicar o fato de alguns pacientes 46,XY apresentem ductos de Müller e/ou útero, enquanto que em outros, essas estruturas estejam completamente ausentes.

Continuando por essa via, ainda existe uma relação entre SF-1 e DHH produzida nas células de Sertoli, e levando em consideração que a proteína DHH é essencial para o desenvolvimento das células fetais e adultas de Leydig (KARPOVA et al., 2015; SHIMA; MOROHASHI, 2017), uma mutação no *NR5A1* pode afetar a diferenciação das células de Leydig estimuladas pela DHH, e por consequência, a síntese de testosterona. SF-1 é expresso tanto nas células de Leydig fetais quanto adultas, porém estudos com modelo animal, mostraram que existe um efeito maior de SF-1 nas células fetais; isso pode explicar o fato dos pacientes nascerem com genitália ambígua e ao mesmo tempo, durante a puberdade, produzirem níveis suficientes de testosterona e apresentarem puberdade espontânea, indicando que SF-1 está prejudicando mais as células de Leydig fetais, do que as adultas. Sendo assim, quando se trata do *NR5A1* muitos outros fatores devem ser considerados, como por exemplo, efeito de dose, função residual, *background* genético e alterações na especificidade de genes alvos.

Para as alterações identificadas na região não codificante, apesar da dificuldade em compreender os inúmeros mecanismos que podem ser afetados após as mutações, pode-se pressupor que um aumento ou diminuição da atividade transcricional dessa região possa influenciar na quantidade e eficiência da proteína produzida, além de eventualmente inibir ou ativar a expressão de outros genes alvos reconhecidos pelo SF-1. Essas variações podem causar um desequilíbrio dentro das células, e por consequência, podem contribuir para a formação do fenótipo dos indivíduos.

Concluindo, todos esses fatores podem afetar diversas etapas do desenvolvimento sexual, como a esteroidogênese, a função e desenvolvimento das células de Sertoli e de Leydig, e até mesmo o equilíbrio entre as proteínas dentro da célula, evidenciando a complexidade do gene *NR5A1* e a difícil tarefa em correlacionar genótipo-fenótipo para esses casos.

5. CONCLUSÕES

- Através dos estudos funcionais realizados para as mutações p.S32N, p.R39C, p.C65Y, p.C247* e p.K396Rfs*34 identificadas na região codificante do gene *NR5A1*, algumas considerações puderam ser feitas:

- ✓ Em todos os casos, as mutações reduziram significativamente a capacidade de transativação dos promotores *HAM* e *STAR* testados;
- ✓ Todas as proteínas foram expressas, porém a capacidade de reconhecer e se ligar ao DNA foi perdida em quatro das cinco mutações estudadas. O complexo DNA-proteína foi formado apenas no caso da mutação p.C247*;
- ✓ Nos cinco casos estudados pode-se relacionar as mutações com os fenótipos de DDS apresentados pelos indivíduos.

- A triagem molecular do gene *NR5A1* para novos pacientes também possibilitou a identificação de outras duas novas variantes, a p.C55S e a p.M98Gfs*44, ambas no domínio de ligação ao DNA na proteína. Mesmo sem estudos funcionais, pressupõe-se que elas causem um grande impacto na proteína formada, o que se associaria ao fenótipo dos pacientes.

- Com os estudos das alterações identificadas na região não-codificante do gene (c.-133G>A, c.-156_-139dup, c.-413G>A, c.-207C>A e c.-762C>T), podemos observar que:

- ✓ Através das análises *in silico*, verificou-se que em todos os casos, um sítio de reconhecimento para algum fator de transcrição foi alterado;
- ✓ Os resultados obtidos através dos ensaios de luciferase foram bem diferentes para cada mutação. A combinação c.-413G>A + c.-207C>A fez com que atividade transcricional da região 5'UTR fosse reduzida em

quase 50%; já as mutações c.-133G>A e c.-762C>T, por sua vez, fizeram com que a atividade transcricional dessa região fosse drasticamente aumentada. Em ambos os casos, pode-se esperar que tanto uma redução quanto um aumento dessa atividade, possa influenciar diretamente no mRNA e na produção de proteína, o que poderia contribuir com o fenótipo dos pacientes. Por outro lado, a variação c.-156_-139dup não teve efeitos tão significativos quando comparada ao controle normal, sugerindo que a alteração por si só talvez não seja a causa do fenótipo. Outros fatores devem estar envolvidos e devem ser investigados

- ✓ Outros estudos funcionais poderiam esclarecer melhor o papel dessas variações, entretanto elas foram identificadas em 8 dos 114 indivíduos estudados, evidenciando a importância do estudo da região não codificante do gene *NR5A1* para os casos de DDS.

- Foram identificadas 12 mutações no gene *NR5A1* em 17 pacientes. Apesar da correlação genótipo-fenótipo ainda ser difícil para a maioria das mutações no *NR5A1*, estes resultados evidenciam a importância da análise molecular deste gene para todos os casos de DDS 46,XY, indo desde quadros mais leves, como infertilidade masculina, até os mais graves, como DG Pura associada a insuficiência adrenal.

6. REFERÊNCIAS

ACHERMANN, J. C. et al. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. **Nature genetics**, v. 22, n. 2, p. 125–6, jun. 1999.

ACHERMANN, J. C. et al. Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 87, n. 4, p. 1829–33, abr. 2002.

ALLALI, S. et al. Mutation analysis of NR5A1 encoding steroidogenic factor 1 in 77 patients with 46, XY disorders of sex development (DSD) including hypospadias. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e24117, jan. 2011.

ARBOLEDA, V. A et al. DSDs: genetics, underlying pathologies and psychosexual differentiation. v. 10, n. 10, p. 603–615, 2015.

BAETENS, D. et al. Extensive clinical, hormonal and genetic screening in a large consecutive series of 46,XY neonates and infants with atypical sexual development. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 9, n. 1, p. 209, 2014.

BAETENS, D. et al. NR5A1 is a novel disease gene for 46,XX testicular and ovotesticular disorders of sex development. **Genetics in Medicine**, n. April, 2016.

BASHAMBOO, A. et al. Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. **American journal of human genetics**, v. 87, n. 4, p. 505–12, 8 out. 2010.

BASHAMBOO, A. et al. A recurrent p.Arg92Trp variant in steroidogenic factor-1 (NR5A1) can act as a molecular switch in human sex development. **Human Molecular Genetics**, v. 0, n. 0, p. ddw186, 2016.

BASHAMBOO, A. et al. Anomalies in human sex determination provide

unique insights into the complex genetic interactions of early gonad development. **Clinical Genetics**, v. 91, p. 143–156, 2017.

BAXTER, R. M. et al. Exome sequencing for the diagnosis of 46,XY disorders of sex development. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 100, n. 2, p. E333-44, fev. 2015.

BERTELLONI, S. et al. NR5A1 gene mutations: Clinical, endocrine and genetic features in two girls with 46,XY disorder of sex development. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 81, n. 2, p. 104–108, 2014.

BERTHERAT, J. The nuclear receptor SF-1 (steroidogenic factor-1) is no longer an orphan. **European Journal of Endocrinology**, v. 138, n. 1, p. 32–33, 1998.

BIASON-LAUBER, A. Control of sex development. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 24, n. 2, p. 163–186, 2010.

BIASON-LAUBER, A.; SCHOENLE, E. J. Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor 1 (NR5A1/SF-1) and adrenocortical insufficiency. **American journal of human genetics**, v. 67, n. 6, p. 1563–8, dez. 2000.

BUAAS, F. W. et al. In vivo evidence for the crucial role of SF1 in steroid-producing cells of the testis, ovary and adrenal gland. **Development (Cambridge, England)**, v. 139, n. 24, p. 4561–70, dez. 2012.

BUCHER, P. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. **Journal of Molecular Biology**, v. 212, n. 4, p. 563–578, abr. 1990.

CALVO, R. M. et al. Screening for mutations in the steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic factor-1 genes, and in CYP11A and dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia gene on the X chromosome, gene-1 (DAX-1), in hyperandrogenic hirsute women. **Journal of Clinical**

Endocrinology and Metabolism, v. 86, n. 4, p. 1746–1749, 2001.

CAMATS, N. et al. Ten novel mutations in the NR5A1 gene cause disordered sex development in 46,XY and ovarian insufficiency in 46,XX individuals. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 97, n. 7, p. E1294-306, jul. 2012.

CIACCIO, M. et al. Preserved Fertility in a Patient with a 46,XY Disorder of Sex Development due to a New Heterozygous Mutation in the NR5A1/SF-1 Gene: Evidence of 46,XY and 46,XX Gonadal Dysgenesis Phenotype Variability in Multiple Members of an Affected Kindred. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 78, n. 2, p. 119–126, 2012.

COLSON, C. et al. SF1 and spleen development: New heterozygous mutation, literature review and consequences for NR5A1-mutated patient's management. **Clinical Genetics**, p. 1–5, 2017.

COOLS, M. et al. Pubertal androgenization and gonadal histology in two 46,XY adolescents with NR5A1 mutations and predominantly female phenotype at birth. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 166, n. 2, p. 341–9, fev. 2012.

CORREA, R. V et al. A Microdeletion in the Ligand Binding Domain of Human Steroidogenic Factor 1 Causes XY Sex Reversal without Adrenal Insufficiency. v. 89, n. 4, p. 1767–1772, 2004.

COUTANT, R. et al. Heterozygous mutation of steroidogenic factor-1 in 46,XY subjects may mimic partial androgen insensitivity syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 8, p. 2868–2873, 2007.

DAMIANI, D. et al. Genitalia ambígua: diagnóstico diferencial e conduta. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, p. 37–47, 2001.

DOMENICE, S. et al. Wide spectrum of NR5A1-related phenotypes in 46,XY and 46,XX individuals. **Birth Defects Res.C.Embryo.Today**, v. 108, p.

309–320, 2016.

EVANS, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, v. 240, p. 889–895, 1988.

FABBRI, H. C. et al. The novel p.Cys65Tyr mutation in NR5A1 gene in three 46,XY siblings with normal testosterone levels and their mother with primary ovarian insufficiency. **BMC medical genetics**, v. 15, n. 1, p. 7, jan. 2014.

FABBRI, H. C. et al. NR5A1 Loss-of-Function Mutations Lead to 46,XY Partial Gonadal Dysgenesis Phenotype: Report of Three Novel Mutations. **Sexual development: genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation**, 28 jul. 2016.

FABBRI, H. C.; MELLO, M. P. DE. **Análise molecular do gene NR5A1 em pacientes 46,XY com distúrbios da diferenciação do sexo**. [s.l: s.n.].

FERLIN, A. et al. Mutational screening of NR5A1 gene encoding steroidogenic factor 1 in cryptorchidism and male factor infertility and functional analysis of seven undescribed mutations. **Fertility and Sterility**, v. 104, n. 1, p. 163–169.e1, 2015.

FERRAZ-DE-SOUZA, B.; LIN, L.; ACHERMANN, J. C. Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 336, n. 1–2, p. 198–205, 10 abr. 2011.

GOODFELLOW, P. N.; DARLING, S. M. Genetics of sex determination in man and mouse. **Development (Cambridge, England)**, v. 102, p. 251–258, 1988.

GURAN, T. et al. Rare causes of primary adrenal insufficiency: Genetic and clinical characterization of a large nationwide cohort. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 101, n. 1, p. 284–292, 2016.

HAMMER, G. D. et al. Phosphorylation of the Nuclear Receptor SF-1 Modulates Cofactor Recruitment: Integration of Hormone Signaling in Reproduction and Stress. **Molecular Cell**, v. 3, p. 521–526, 1999.

HASEGAWA, T. et al. Testicular dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46,XY patient with a heterozygous inactive mutation of steroidogenic factor-1. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 12, p. 5930–5, dez. 2004.

HATTORI, A. et al. A novel C-terminal truncating NR5A1 mutation in dizygotic twins. **Human Genome Variation**, v. 4, n. October 2016, p. 17008, 2017.

HOIVIK, E. A. et al. Deoxyribonucleic acid methylation controls cell type-specific expression of steroidogenic factor 1. **Endocrinology**, v. 149, n. October, p. 5599–5609, 2008.

HOIVIK, E. A. et al. Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). **Molecular and cellular endocrinology**, v. 315, n. 1–2, p. 27–39, 5 fev. 2010.

HU, S. C. et al. Mutations in NR5A1 and PIN1 associated with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 11, n. 4, p. 4575–4584, 2012.

HUGHES, I. A. et al. Consensus statement on management of intersex disorders. **Journal of pediatric urology**, v. 2, n. 3, p. 148–62, jun. 2006.

HUSSAIN, S. et al. Two novel mutations in the NR5A1 gene as a cause of disorders of sex development in a Pakistani cohort of 46,XY patients. **Andrologia**, v. 48, n. 5, p. 509–517, 2015.

IGARASHI, M. et al. Identical NR5A1 Missense Mutations in Two Unrelated 46,XX Individuals with Testicular Tissues. **Human Mutation**, v. 38, n. 1, p. 39–42, 2017.

JAMESON, J. L. Editorial: Of mice and men. The tale of steroidogenic

factor-1. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 12, p. 5927–5929, 2004.

JANSE, F. et al. Limited contribution of NR5A1 (SF-1) mutations in women with primary ovarian insufficiency (POI). **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 1, 2012.

KARPOVA, T. et al. Steroidogenic factor 1 differentially regulates fetal and adult leydig cell development in male mice. **Biology of reproduction**, v. 93, n. August, p. 83, 2015.

KIMURA, R. et al. Identification of novel first exons in Ad4BP/SF-1 (NR5A1) gene and their tissue- and species-specific usage. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 278, n. 1, p. 63–71, 11 nov. 2000.

KÖHLER, B. et al. Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46,XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency. **Human mutation**, v. 29, n. 1, p. 59–64, jan. 2008.

KÖHLER, B. et al. The spectrum of phenotypes associated with mutations in steroidogenic factor 1 (SF-1, NR5A1, Ad4BP) includes severe penoscrotal hypospadias in 46,XY males without adrenal insufficiency. **European Journal of Endocrinology**, v. 161, p. 237–242, 2009.

KÖHLER, B.; ACHERMANN, J. C. Update - Steroidogenic Factor 1 (SF-1, NR5A1). **Minerva Endocrinol**, v. 35, n. 2, p. 73–85, 2010.

LALA, D. S.; RICE, D. A; PARKER, K. L. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 6, n. 8, p. 1249–1258, 1992.

LASALA, C. et al. SOX9 and SF1 are involved in cyclic AMP-mediated upregulation of anti-Mullerian gene expression in the testicular prepubertal Sertoli cell line SMAT1. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 301, p. E539–E547, 2011.

LEE, P. A. et al. Global Disorders of Sex Development Update since 2006: Perceptions, Approach and Care. **Hormone Research in Paediatrics**, p. 158–180, 2016.

LIN, L. et al. Heterozygous Missense Mutations in Steroidogenic Factor 1 (SF1/Ad4BP, *NR5A1*) Are Associated with 46,XY Disorders of Sex Development with Normal Adrenal Function. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 3, p. 991–999, 2007.

LIN, L.; ACHERMANN, J. C. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. **Sexual Development**, v. 2, p. 200–209, 2008.

LITTLE, T. H. et al. Sequence-specific deoxyribonucleic acid (DNA) recognition by steroidogenic factor 1: a helix at the carboxy terminus of the DNA binding domain is necessary for complex stability. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 20, n. 4, p. 831–43, abr. 2006a.

LITTLE, T. H. et al. Sequence-specific deoxyribonucleic acid (DNA) recognition by steroidogenic factor 1: a helix at the carboxy terminus of the DNA binding domain is necessary for complex stability. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 20, n. 4, p. 831–43, abr. 2006b.

LOURENÇO, D. et al. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 12, p. 1200–10, 19 mar. 2009.

LU, R. et al. New NR5A1 mutations and phenotypic variations of gonadal dysgenesis. **Plos One**, v. 1, n. Omim 184757, p. 1–18, 2017.

LUO, X.; IKEDA, Y.; PARKER, K. L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. **Cell**, v. 77, n. 4, p. 481–90, 20 maio 1994.

MACIEL-GUERRA, A.; GUERRA JÚNIOR, G. **Menino ou menina? Os distúrbios da diferenciação do sexo**. 2nd. ed. São Paulo: [s.n.].

MALIKOVA, J. et al. Human NR5A1/SF-1 mutations show decreased activity on BDNF (brain-derived neurotrophic factor), an important regulator of energy balance: testing impact of novel SF-1 mutations beyond steroidogenesis. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104838, 2014.

MALLET, D. et al. Gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46, XY patient heterozygous for the nonsense C16X mutation: a case of SF1 haploinsufficiency. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 10, p. 4829–32, out. 2004.

MAZEN, I. et al. Identification of NR5A1 mutations and possible digenic inheritance in 46,XY gonadal dysgenesis. **Sexual Development**, v. 10, n. 3, p. 147–151, 2016.

MCELREAVEY, K. et al. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. April, p. 3368–72, 1993.

MCELREAVEY, K.; ACHERMANN, J. C. Steroidogenic Factor-1 (SF-1, NR5A1) and 46,XX Ovotesticular Disorders of Sex Development: One Factor, Many Phenotypes. **Hormone Research in Paediatrics**, p. 4–5, 2016.

MELLO, M. P. DE et al. Multifunctional role of steroidogenic factor 1 and disorders of sex development. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 55, n. 8, p. 607–12, nov. 2011.

MOROHASHI, K. I. et al. A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 25, p. 17913–17919, 1992.

O'MALLEY, B. W.; QIN, J.; LANZ, R. B. CRACKING THE COREGULATOR CODES. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 76, n. October 2009, p. 211–220, 2008.

OBA, K. et al. Structural Characterization of Human Ad4bp (SF-1) Gene

specific transcription factor which regulates the expression of steroidogenic P450 hydroxylases in adrenocortical cells (1-4). This factor is a mammalian homologue of *Drosophila fushi tarazu* facto. **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS**, v. 267, p. 261–267, 1996.

OZISIK, G.; ACHERMANN, J. C.; JAMESON, J. L. The role of SF1 in adrenal and reproductive function : insight from naturally occurring mutations in humans. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 76, p. 85–91, 2002.

PASCAL, E.; TJIAN, R. Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. **Genes & development**, v. 5, n. 9, p. 1646–56, set. 1991.

PEDACE, L. et al. Longitudinal hormonal evaluation in a patient with disorder of sexual development, 46,XY karyotype and one *NR5A1* mutation. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 164, n. August, p. 2938–2946, 2014.

PHILIBERT, P. et al. Mutational analysis of steroidogenic factor 1 (NR5a1) in 24 boys with bilateral anorchia: a French collaborative study. **Hum Reprod**, v. 22, n. 12, p. 3255–3261, 2007.

PHILIBERT, P. et al. Predominant Sertoli cell deficiency in a 46,XY disorders of sex development patient with a new NR5A1/SF-1 mutation transmitted by his unaffected father. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 5, p. 5–9, 2010a.

PHILIBERT, P. et al. Steroidogenic factor-1 (SF-1) gene mutation as a frequent cause of primary amenorrhea in 46,XY female adolescents with low testosterone concentration. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 8, p. 28, jan. 2010b.

PHILIBERT, P. et al. **Hormonal and Genetic Basis of Sexual Differentiation Disorders and Hot Topics in Endocrinology: Proceedings of the 2nd World Conference**. [s.l: s.n.]. v. 707

REUTER, A. L. et al. A novel mutation in the accessory DNA-binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency. **European Journal of Endocrinology**, v. 157, n. 2, p. 233–238, 2007.

RÖPKE, A. et al. Comprehensive sequence analysis of the NR5A1 gene encoding steroidogenic factor 1 in a large group of infertile males. **European journal of human genetics : EJHG**, 9 jan. 2013.

SARACO, N. et al. Functional Characterization of Two Mutations Located in the Ligand Binding Domain in the Functional Characterization of Two Mutations Located in the Ligand Binding Domain in the SF1. **International Journal of Endocrinology and Metabolic Disorders**, n. July 2016, p. 1–8, 2015.

SASSONE-CORSI, P. Molecular clocks: mastering time by gene regulation. **Nature**, v. 392, n. 6679, p. 871–874, 1998.

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

SHIMA, Y.; MOROHASHI, K. Molecular and Cellular Endocrinology Leydig progenitor cells in fetal testis. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 445, 2017.

STOCCO, D. M. The role of the StAR protein in steroidogenesis: Challenges for the future. **Journal of Endocrinology**, v. 164, p. 247–253, 2000.

SUNTHARALINGHAM, J. P. et al. DAX-1 (NR0B1) and steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) in human disease. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 29, p. 607–619, 2015.

SWARTZ, J. M. et al. A 46,XX Ovotesticular Disorder of Sex Development Likely Caused by a Steroidogenic Factor-1 (NR5A1) Variant.

Hormone Research in Paediatrics, v. 87, n. 3, p. 191–195, 2017.

TAJIMA, T.; FUJIWARA, F.; FUJIEDA, K. A novel heterozygous mutation of steroidogenic factor-1 (SF-1/Ad4BP) gene (NR5A1) in a 46, XY disorders of sex development (DSD) patient without adrenal failure. **Endocrine journal**, v. 56, n. 4, p. 619–24, 2009.

TAKAGI, M. et al. Functional Characterization of c.870+3_6delGAGT Splice Site Mutation in NR5A1. **Hormone research in paediatrics**, v. 85, n. 1, p. 65–8, 2016.

TAKETO, M. et al. Homologs of *Drosophila Fushi-Tarazu* Factor 1 Map to Mouse Chromosome 2 and Human Chromosome 9q33. **Genomics**, v. 567, p. 565–567, 1995.

TANTAWY, S. et al. Testosterone production during puberty in two 46,XY patients with disorders of sex development and novel NR5A1 (SF-1) mutations. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 167, n. 1, p. 125–30, jul. 2012.

TANTAWY, S. et al. Analysis of the gene coding for steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in a cohort of 50 Egyptian patients with 46,XY disorders of sex development. **European Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 5, p. 759–767, 2014.

UEDA, H.; HIROSE, S. Defining the sequence recognized with BmFTZ-F1, a sequence specific DNA binding factor in the silkworm, *Bombyx mori*, as revealed by direct sequencing of bound oligonucleotides and gel mobility shift competition analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 13, p. 3689–3693, 1991.

VOICAN, A. et al. NR5A1 (SF-1) mutations are not a major cause of primary ovarian insufficiency. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 5, p. 1017–1021, 2013.

WANG, W. et al. The crystal structures of human steroidogenic factor-1

and liver receptor homologue-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 21, p. 7505–7510, 2005.

WARMAN, D. M. et al. Three new SF-1 (NR5A1) gene mutations in two unrelated families with multiple affected members: within-family variability in 46,XY subjects and low ovarian reserve in fertile 46,XX subjects. **Hormone research in paediatrics**, v. 75, n. 1, p. 70–7, jan. 2011.

WERNER, R. et al. Novel Insights into 46,XY Disorders of Sex Development due to NR5A1 Gene Mutation. **Sexual Development**, 2015.

WONG, M. et al. Cloning and sequence analysis of the human gene encoding steroidogenic factor 1. **Journal of molecular endocrinology**, v. 17, n. 2, p. 139–47, out. 1996.

WOO, K. H. et al. Novel heterozygous mutations of NR5A1 and their functional characteristics in patients with 46,XY disorders of sex development without adrenal insufficiency. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 84, n. 2, p. 116–123, 2015.

WOODSON, K. G. et al. Characterization of the promoter of SF-1, an orphan nuclear receptor required for adrenal and gonadal development. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 11, p. 117–126, 1997.

WU, J. Y. et al. A novel NR5A1 variant in an infant with elevated testosterone from an Australasian cohort of 46,XY patients with disorders of sex development. **Clinical endocrinology**, v. 78, n. 4, p. 545–50, abr. 2013.

YAGI, H. et al. Fertility preservation in a family with a novel NR5A1 mutation. **Endocrine Journal**, v. 62, n. 3, p. 289–295, 2015.

ZANGEN, D. et al. Testicular differentiation factor SF-1 is required for human spleen development. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 5, p. 2071–2075, 2014.

ZARE-ABDOLLAHI, D. et al. Mutational screening of the *NR5A1* in

azoospermia. **Andrologia**, v. 47, n. Mim 184757, p. 395–401, 2015.

ZIMMERMANN, S. et al. Transcription of the Leydig insulin-like gene is mediated by steroidogenic factor-1. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 12, n. May, p. 706–713, 1998.

7. ANEXOS

Anexo 1: Mutações previamente descritas na literatura no gene NR5A1.

<i>Mutação</i>	<i>Fenótipo</i>	<i>Referência</i>
p.M1V	DDS 46,XY (amenorreia primária e baixa concentração de testosterona)	(PHILIBERT et al., 2010b)
p.M1I	Disgenesia gonadal parcial 46,XY Insuficiência ovariana primária 46,XX	(LOURENÇO et al., 2009)
p.Y3*	DDS 46,XY	(COOLS et al., 2012)
p.Y3* + p.E7*	DDS 46,XY	(HUSSAIN et al., 2015)
p.D6fs*74	Disgenesia gonadal 46,XY	(HASEGAWA et al., 2004)
p.E7* + p.T296M	DDS 46,XY e Insuficiência adrenal	(MALIKOVA et al., 2014)
p.E11*	DDS 46,XY	(KÖHLER et al., 2009)
p.C13R	DDS 46,XY	(SUNT HARALINGHAM et al., 2015)
p.V15M	Disgenesia gonadal completa 46,XY	(LIN et al., 2007)
p.C16*	Disgenesia gonadal 46,XY	(MALLET et al., 2004)
p.D18_G22del	DDS 46,XY	(LU et al., 2017)
p.V20L	DDS 46,XY (hipospádia)	(CAMATS et al., 2012)
p.H24Y	DDS 46,XY	(CAMATS et al., 2012)
p.H24Tfs*51	DDS 46,XY	(CAMATS et al., 2012)
p.Y25C	DDS 46,XY (hipospádia)	(WU et al., 2013)
p.G26A	DDS 46,XY	(WOO et al., 2015)
p.G26E	DDS 46,XY	(DOMENICE et al., 2016)
p.T29R	DDS 46,XY	(PHILIBERT et al., 2011)
	DDS 46,XY	(DOMENICE et al., 2016)
p.C30W	DDS 46,XY	(CAMATS et al., 2012)
p.C33S	Disgenesia gonadal 46,XY	(KÖHLER et al., 2008)
c.103-3 C>A	Disgenesia gonadal parcial 46,XY	(KÖHLER et al., 2009)
p.G35E	Disgenesia gonadal completa 46,XY e insuficiência adrenal	(ACHERMANN et al., 1999)

p.L38*	Disgenesia gonadal parcial 46,XY	(FABBRI et al., 2016)
p.R39P	DDS 46,XY (amenorreia primária e baixa concentração de testosterona)	(PHILIBERT et al., 2010b)
	DDS 46,XY	(ALLALI et al., 2011)
p.T40P	DDS 46,XY	(LU et al., 2017)
p.V41G	Disgenesia gonadal 46,XY	(TAJIMA; FUJIWARA; FUJIEDA, 2009)
p.C49Hfs*39	DDS 46,XY	(ALLALI et al., 2011)
p.E51Rfs*23	DDS 46,XY (amenorreia primária e baixa concentração de testosterona)	(PHILIBERT et al., 2010b)
p.S54R	Insuficiência ovariana primária 46,XX	(VOICAN et al., 2013)
p.C55Y	DDS 46,XY (amenorreia primária)	(PHILIBERT et al., 2011)
p.R62C	DDS 46,XY (hipospádia)	(TANTAWY et al., 2014)
p.K63Q	DDS 46,XY	(PHILIBERT et al., 2011)
p.C65Y	DDS 46,XY	(FABBRI et al., 2014)
p.T75T	Insuficiência ovariana primária 46,XX	(JANSE et al., 2012)
p.M78I	Disgenesia gonadal completa 46,XY	(LIN et al., 2007)
p.Leu80Trpfs*8	Disgenesia gonadal parcial 46,XY	(FABBRI et al., 2016)
p.R84H	Disgenesia gonadal 46,XY	(KÖHLER et al., 2008)
p.R84C	Disgenesia gonadal 46,XY	(REUTER et al., 2007)
	DDS 46,XY	(BERTELLONI et al., 2014)
p.A85*	DDS 46,XY	(BAETENS et al., 2014)
p.G90R	DDS 46,XY	(CAMATS et al., 2012)
p.G91S	Disgenesia gonadal 46,XY	(LIN et al., 2007)
p.R92Q	Disgenesia gonadal completa 46,XY e insuficiência adrenal	(ACHERMANN et al., 2002)
	Insuficiência adrenal isolada (46,XX)	(GURAN et al., 2016)
	DDS ovário testicular (46,XX)	(SWARTZ et al., 2017)
p.R92W	DDS ovário testicular (46,XX)	(BASHAMBOO et al., 2016)
	Disgenesia gonadal parcial 46,XY	
	DDS ovário testicular (46,XX)	(BAETENS et al., 2016)
	DDS testicular (46,XX)	(IGARASHI et al., 2017)
p.P97T	Infertilidade masculina	(ZARE-ABDOLLAHI et al.,

		2015)
p.R103G	DDS 46,XY	(PHILIBERT et al., 2011)
p.R103Q	DDS 46,XY e asplenia	(ZANGEN et al., 2014)
p.Q107*	DDS 46,XY (hipospádia)	(KÖHLER et al., 2009)
p.R114Q	Regressão testicular 46,XY	(PHILIBERT et al., 2011)
p.R144W	Infertilidade masculina	(FERLIN et al., 2015)
p.G117G	Hipogonadismo hipogonadotrófico (46,XY)	(HU et al., 2012)
p.E121Afs*25	DDS 46,XY (hipospádia)	(TANTAWY et al., 2014)
p.G123A	Insuficiência ovariana primária 46,XX	(VOICAN et al., 2013)
p.G123A + p.P129L	Infertilidade masculina	(BASHAMBOO et al., 2010)
p.P124Pfs*24	DDS 46,XY (amenorreia primária e baixa concentração de testosterona)	(PHILIBERT et al., 2010b)
p.P129L	Insuficiência ovariana primária 46,XX	(VOICAN et al., 2013)
p.P130Rfs*165	DDS 46,XY	(CAMATS et al., 2012)
p.P131Rfs*165	DDS 46,XY	(LOURENÇO et al., 2009)
p.P131L	Infertilidade masculina	(BASHAMBOO et al., 2010)
p.P136L	Insuficiência ovariana primária 46,XX	(JANSE et al., 2012)
p.Y138*	Disgenesia gonadal 46,XY	(KÖHLER et al., 2008)
p.S143Tfs*7	Disgenesia gonadal completa 46,XY	(KÖHLER et al., 2008)
p.A154T	DDS 46,XY (hipospádia)	(TANTAWY et al., 2014)
p.G165R	Infertilidade masculina	(RÖPKE et al., 2013)
p.V173M	Infertilidade masculina	(FERLIN et al., 2015)
p.P179Hfs*116	DDS 46,XY	(COUTANT et al., 2007)
p.Y183*	DDS 46,XY	(WARMAN et al., 2011)
p.R191C	Infertilidade masculina	(BASHAMBOO et al., 2010)
p.A192F	Insuficiência ovariana primária 46,XX	(JANSE et al., 2012)
p.A192S	Insuficiência ovariana primária 46,XX	(JANSE et al., 2012)
p.A192V	Insuficiência ovariana primária 46,XX	(JANSE et al., 2012)
p.P198L	Insuficiência ovariana primária 46,XX	(VOICAN et al., 2013)
p.P200S	Criptorquidismo	(FERLIN et al., 2015)
p.Q206Tfs*20	DDS 46,XY	(CAMATS et al., 2012)
p.P210S	Criptorquidismo	(FERLIN et al., 2015)
p.Y211C	Infertilidade masculina	(FERLIN et al., 2015)

p.Y211Tfs*83	Disgenesia gonadal parcial 46,XY Disgenesia gonadal completa 46,XX	(LU et al., 2017)
p.Y211Pfs*12	DDS 46,XY Insuficiência ovariana primária 46,XX	(BAETENS et al., 2014)
p.Y211*	DDS 46,XY	(DOMENICE et al., 2016)
p.Q206Tfs*20	Disgenesia gonadal 46,XY	(MAZEN et al., 2016)
p.G212S	Infertilidade masculina	(BASHAMBOO et al., 2010)
p.N222Kfs*74	Disgenesia gonadal completa 46,XY	(LOURENÇO et al., 2009)
p.L230R	DDS 46,XY	(WERNER et al., 2015)
p.L231_L233dup	DDS 46,XY	(CAMATS et al., 2012)
	DDS 46,XY	(PEDACE et al., 2014)
p.P235L	Insuficiência ovariana primária 46,XX	(CAMATS et al., 2012)
p.E237K	Infertilidade masculina	(ZARE-ABDOLLAHI et al., 2015)
p.D238N	Infertilidade masculina	(BASHAMBOO et al., 2010)
	Infertilidade masculina	(FERLIN et al., 2015)
p.E245W	DDS 46,XY (hipospádia)	(SUNTARALINGHAM et al., 2015)
p.C247*	DDS 46,XY	(DOMENICE et al., 2016)
p.R255C	DDS 46,XY (amenorreia primária)	(PHILIBERT et al., 2011)
p.R255L	Insuficiência adrenal com desenvolvimento ovariano normal (46,XX)	(BIASON-LAUBER; SCHOENLE, 2000)
p.D257N	Infertilidade masculina	(RÖPKE et al., 2013)
p.R267L	Criptorquidismo	(FERLIN et al., 2015)
p.D270N	Criptorquidismo	(FERLIN et al., 2015)
p.S275S	Insuficiência ovariana primária 46,XX	(JANSE et al., 2012)
p.W279*	DDS 46,XY	(WARMAN et al., 2011)
p.W279R	DDS 46,XY (hipospádia)	(ALLALI et al., 2011)
p.R281P	DDS 46,XY	(PHILIBERT et al., 2010a)
p.C283R	DDS 46,XY	(WOO et al., 2015)
c.870+3_6delGAGT	DDS 46,XY	(TAKAGI et al., 2016)
p.D293N	Insuficiência ovariana primária 46,XX Disgenesia gonadal completa 46,XY	(LOURENÇO et al., 2009)

p.E299Hfs*87	DDS 46,XY	(HUSSAIN et al., 2015)
p.W302*	DDS 46,XY	(CAMATS et al., 2012)
p.W302C	DDS 46,XY	(DOMENICE et al., 2016)
p.S303R	DDS 46,XY	(SARACO et al., 2015)
p.E304K	DDS 46,XY	(YAGI et al., 2015)
p.R313H	DDS 46,XY (hipospádia)	(CIACCIO et al., 2012)
	Insuficiência ovariana primária 46,XX	(JANSE et al., 2012)
p.R313C	DDS 46,XY (hipospádia)	(ALLALI et al., 2011)
	Disgenesia gonadal 46,XY	(MAZEN et al., 2016)
p.Q316*	Disgenesia gonadal completa 46,XY	(PHILIBERT et al., 2011)
p.I323T	Infertilidade masculina	(RÖPKE et al., 2013)
p.G328V	DDS 46,XY	(TANTAWY et al., 2012)
p.A340V	DDS 46,XY	(DOMENICE et al., 2016)
p.A351V	DDS 46,XY (amenorreia primária)	(PHILIBERT et al., 2011)
p.E353Afs*31	Disgenesia gonadal completa 46,XY	(CORREA et al., 2004)
p.V355M	Regressão testicular 46,XY	(PHILIBERT et al., 2007)
p.L358P	DDS 46,XY	(DOMENICE et al., 2016)
p.L361P	Disgenesia gonadal completa 46,XY	(PHILIBERT et al., 2011)
p.R365P	Síndrome do ovário policístico (46,XX)	(CALVO et al., 2001)
p.C370W	DDS 46,XY	(BAETENS et al., 2014)
p.L376F	DDS 46,XY	(TANTAWY et al., 2012)
c.1138 + 1G>T	Disgenesia gonadal parcial 46,XY	(FABBRI et al., 2016)
p.D380Y	DDS 46,XY (amenorreia primária)	(PHILIBERT et al., 2010b)
p.L384Rfs*7	DDS 46,XY	(WOO et al., 2015)
p.Q394P	DDS 46,XY	(PHILIBERT et al., 2011)
p.E395del	DDS 46,XY	(DOMENICE et al., 2016)
p.Y404*	DDS 46,XY	(PHILIBERT et al., 2011)
	DDS 46,XY	(DOMENICE et al., 2016)
p.H408Pfs*159	DDS 46,XY	(MALIKOVA et al., 2014)
p.Y409*	DDS 46,XY	(COLSON et al., 2017)
p.C412*	DDS 46,XY	(DOMENICE et al., 2016)
p.Leu423Trpfs*7	DDS 46,XY	(HATTORI et al., 2017)

p.L437Q	Disgenesia gonadal 46,XY	(LIN et al., 2007)
p.V426Vext*140	Disgenesia gonadal 46,XY	(KÖHLER et al., 2008)
p.E445 *	DDS 46,XY	(WOO et al., 2015)

Anexo 2: Meios e Soluções.

<u>Meio Luria-Bertani (LB) Sólido – 500 mL</u> <ul style="list-style-type: none"> - 10 g de LB (Sigma) - 7,5 g de Ágar (Sigma) - 500 mL de Água destilada * Autoclavar 120°C por 20 minutos 	<u>Meio Luria-Bertani (LB) Líquido – 1 L</u> <ul style="list-style-type: none"> - 20 g de LB (Sigma) - 1000 mL de Água destilada * Autoclavar 120°C por 20 minutos
<u>Canamicina e Ampicilina [50 mg/mL]</u> <ul style="list-style-type: none"> - 500 ng de antibiótico - 10 mL de água destilada * Filtrar usando filtros 0,2 µM * Aliquotar 500 µL em tubos 1,5 mL * Freezer – 20°C 	<u>Meio S.O.C.</u> <ul style="list-style-type: none"> - 2 g de triptona - 0,5 g de extrato de levedura - 0,05 g de cloreto de sódio - Água mili-Q q.s.p 100 mL - 1 mL de KCl 250 mM - 1 mL de MgCl₂ 1 M - 20 mL de glicose 1 M filtrada * Aliquotar 400 µL em tubos 1,5 mL * Freezer – 20°C
<u>PBS (phosphate buffered saline) 10X</u> <ul style="list-style-type: none"> - 80 g de NaCl - 2 g de KCl - 14,4 g de Na₂HPO₄ - 2,4 g de KH₂PO₄ * Adicionar 800 mL de água destilada para homogeneizar a solução * Equilibrar o pH com HCl para 7,4 * Completar com água destilada para 1 litro * Autoclavar 120°C por 20 minutos 	

Anexo 3: Artigo Publicado.

13/09/2017

Gmail - Permission to Include a paper in my PhD thesis



Helena Fabbri <helenafabbri@gmail.com>

Permission to include a paper in my PhD thesis

Rights and Permissions <permission@karger.com>

7 de setembro de 2017 03:41

Para: Helena Fabbri <helenafabbri@gmail.com>

Dear Helena,

Thank you for your email. As to your request, we are pleased to inform you that permission is granted herewith to include your article

Fabbri H, C, Ribeiro de Andrade J, G, Maciel-Guerra A, T, Guerra-Júnior G, de Mello M, NR5A1 Loss-of-Function Mutations Lead to 46,XY Partial Gonadal Dysgenesis Phenotype: Report of Three Novel Mutations. Sex Dev 2016;10:191-199 (DOI 10.1159/000448013)

in your PhD thesis. This permission covers the right to have the PhD thesis including the above-mentioned article archived in the university's repository.

Please note that this is a non-exclusive permission, hence any further use, edition, translation or distribution, either in print or electronically, requires written permission again as this permission is valid for the above mentioned purpose only.

Thank you for your understanding and cooperation.

Hopefully, we have been of assistance to you with the above.

Best regards,

David

David Schaub

Legal Advisor

S. Karger AG

+41 61 306 12 55

permission@karger.com

NR5A1 Loss-of-Function Mutations Lead to 46,XY Partial Gonadal Dysgenesis Phenotype: Report of Three Novel Mutations

Helena C. Fabbri^a Juliana G. Ribeiro de Andrade^{b, c} Andréa T. Maciel-Guerra^{b, c}
Gil Guerra-Júnior^{c, d} Maricilda P. de Mello^a

^aCenter for Molecular Biology and Genetic Engineering – CBMEG, ^bDepartment of Medical Genetics, School of Medical Sciences, ^cInterdisciplinary Group for the Study of Sex Determination and Differentiation – GIEDDS, and ^dDepartment of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil

Key Words

Disorders of sexual development · Haploinsufficiency · NR5A1 mutation · SF1 protein

Abstract

Mutations in the *NR5A1* gene, which encodes the steroidogenic factor 1 (SF1), are responsible for different phenotypes of disorders of sex development (DSD), such as bilateral anorchia and hypospadias. Furthermore, they can be associated with primary amenorrhea, premature ovarian failure, male infertility, adrenal tumors, and endometriosis. Direct sequencing of the 7 *NR5A1* exons including ~1,000 bp of the 5'-upstream and 3'-downstream regions and all intron-exon boundaries was performed in patients with DSD. Three different in silico tools were used to assess the consequences of a splice site mutation. As a result, 3 novel *NR5A1* mutations were identified in 3 patients with 46,XY partial gonadal dysgenesis: p.Lys38* and p.Leu80Trpfs*8 lead to premature translation termination codons within the SF1 DNA-binding domain, and the intronic nucleotide substitution c.1138+1G>T at the intron 6 donor splice site is considered to modify correct splicing. We assume that the anomalous mRNA produced as a result of p.Lys38* and p.Leu80Trpfs*8

will be degraded by nonsense-mediated mRNA decay even before translation, leading to SF1 haploinsufficiency. The c.1138+1G>T mutation is expected to produce a truncated protein. Heterozygous SF1 loss-of-function mutations in these cases resulted in mild DSD manifestations, such as dysgenetic testes, spontaneous puberty, and preserved adrenal function.

© 2016 S. Karger AG, Basel

Steroidogenic factor 1 (SF1), denominated as nuclear receptor subfamily 5 group A member 1 (NR5A1; OMIM +184757), is a protein that regulates several steps of adrenal and gonadal development [Luo et al., 1994; Lin and Achermann, 2008]. It is encoded by the *NR5A1* gene which is located at 9q33 and expands over 30 kb of genomic DNA divided into 1 non-coding exon followed by 6 coding exons [Wong et al., 1996]. As a nuclear receptor, the structure of human SF1 is characterized by a DNA-binding domain (DBD) containing 2 zinc fingers that are important for several functions, such as replication and repair, transcription and translation, metabolism and signaling, cell proliferation and apoptosis [Krishna et al., 2003]. It also contains a FTZ-F1 box, which is indispens-

KARGER

© 2016 S. Karger AG, Basel
1661–5425/16/0000–0000\$39.50/0

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/sdx

Helena Campos Fabbri
Center for Molecular Biology and Genetic Engineering CBMEG-UNICAMP
Caixa Postal 6010
Campinas, SP 13083-875 (Brazil)
E-Mail helenafabbri@gmail.com

Table 1. Clinical and hormonal data of the 3 patients with *NR5A1* mutations

Clinical and hormonal data	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Age at first visit, months	6	10	15
Gestational age, months	9	8	9
Birth weight, g	2,800	2,580	2,800
Birth length, cm	48	46	49
Karyotype	46,XY	46,XY	46,XY
Assigned gender at birth/after diagnosis	male/male	female/male	female/female
Gonadal location (R/L)	IC/IC	IC/IC	NP/NP
Stretched phallus length (cm)/chordee	2.5/+	2.3/+	1.0/+
Urethral meatus/position	single/ penoscrotal	two/perineal and glandular	single/ penoscrotal
Prader	IV	III	IV
EMS	6	5	4
Basal FSH, IU/l (age, months)	4.5 (8)	13.8 (11)	12.6 (15)
Basal LH, IU/l (age, months)	1.0 (8)	6.7 (11)	1.3 (15)
Basal total testosterone, ng/ml (age, months)	undetectable (8)	1.92 (13)	0.21 (15)
Total testosterone after hCG stimulation test, ng/ml (age, months)	0.33 (9)	not performed	0.23 (16)

Reference range (for mini-puberty or pubertal stages): FSH = 1.5–12.4 IU/l; LH = 1.7–8.6 IU/l; total testosterone = 2.86–8.10 ng/ml. IC = Inguinal channel; NP = not palpable.

able for a high affinity to DNA [Little et al., 2006], an accessory hinge region, a ligand-binding domain, and 2 functional activation domains, AF-1 and AF-2, located at the hinge region and at the C-terminal of the ligand-binding domain, respectively [Hoivik et al., 2010]. SF1 regulates a number of genes essential for normal reproductive physiology and endocrine function [Mello et al., 2011]. It is highly expressed in steroidogenic tissues from very early stages of development, including the developing gonad and adrenal, and continues to be expressed in these tissues till the adult life [Parker et al., 2002]. SF1 is also a key transcriptional regulator of many genes involved in the hypothalamic-pituitary-gonadal and hypothalamic-pituitary-adrenal axes [Tantawy et al., 2012].

The first 2 mutations described in human *NR5A1* (p.Gly35Glu and p.Arg92Gln) were identified in 46,XY patients with primary adrenal insufficiency, complete gonadal dysgenesis, and Müllerian duct persistence [Achermann et al., 1999, 2002]. Since then, over 68 variants have been disclosed, and only 1 case of apparently isolated primary adrenal failure has been reported [Biaison-Laubier and Schoenle, 2000; Pedace et al., 2014]. Mutations in *NR5A1* have been found in a large number of 46,XY individuals with disorders of sex development (DSD) with apparently normal adrenal function and in 46,XX individuals with primary ovarian insufficiency and normal

female phenotype [Lourenço et al., 2009; Röpke et al., 2013]. Mutations in *NR5A1* have also been found in patients with bilateral anorchia, isolated hypospadias, male infertility, and in some cases of adrenal tumors and endometriosis [Brauner et al., 2011; Ferraz-de-Souza et al., 2011; Suntharalingham et al., 2015]. This wide range of phenotypic variation hinders a direct phenotype-genotype correlation [Mello et al., 2011].

NR5A1 heterozygous mutations associated with 46,XY DSD have been described more frequently in patients with normal adrenal function, probably due to a potential dosage-dependent action of SF1 [Köhler et al., 2008]. When such heterozygous mutations create a premature translation termination codon, they can either produce a truncated protein or activate the nonsense-mediated mRNA decay before translation. In the later, the wild-type allele will be the only expressed copy of the gene characterizing the haploinsufficiency, and probably the amount of the protein produced by the normal allele is not sufficient to provide normal levels of SF1 transcriptional activity. We studied 3 cases of 46,XY DSD and identified the mutations p.Lys38*, p.Leu80Trpfs*8, and c.1138+1G>T which result in partial gonadal dysgenesis. We also compared clinical features of the patients with those in the literature bearing similar mutations.

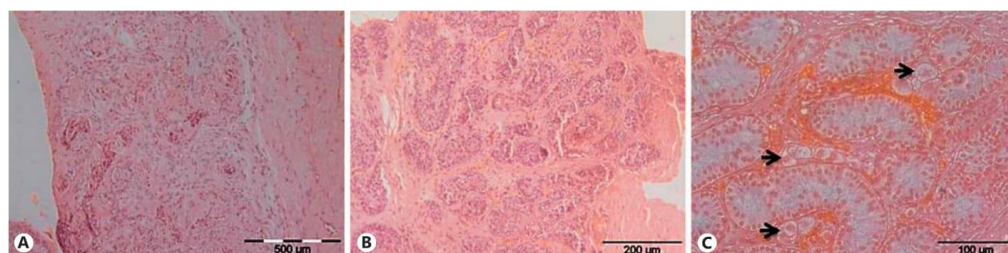


Fig. 1. Dysgenetic testes were identified in all patients with partial gonadal dysgenesis and mutations in the *NR5A1* gene. **A** Left gonad of patient 1 showing small primitive tubules within ovarian-type stroma. **B** Right gonad of patient 2 with small areas of fibrosis and no germ cells. **C** Right gonad of patient 3 revealed prepubertal tubules, fibrosis, no germ cells (Sertoli-cell-only-syndrome), and residual Leydig cells with foamy cytoplasm (black arrows).

Patients and Methods

Patient 1

The proband, who received a male sex assignment at birth, was referred to us at the age of 6 months due to genital ambiguity. He was born at term after an uneventful pregnancy as the first child of healthy, non-consanguineous parents. His weight and length at birth were 2,800 g and 48 cm, respectively. Family history showed the paternal grandfather and a maternal uncle with cryptorchidism and a maternal cousin with micropenis, unilateral cryptorchidism, and hypergonadotropic hypogonadism. The patient presented with a 2.5 cm phallus with chordee, a single penoscrotal urethral opening, and bilaterally palpable gonads in the inguinal region. Genital features were compatible with Prader stage IV [Prader, 1954] and external masculinization score (EMS) of 6 [Ahmed et al., 2000]. Dysmorphic features associated with genital anomalies were not observed. Cytogenetic investigation revealed a 46,XY karyotype. Hormonal dosages are listed in table 1. A basal level of total testosterone was undetectable and did not respond to hCG stimulation test. Abdominal ultrasound did not show any abnormalities, whereas genitography revealed a urogenital sinus, vagina, and uterus. The medical diagnosis was 46,XY partial gonadal dysgenesis based on the elevated FSH level and the absence of testosterone response to a hCG stimulus. It was confirmed by gonadal biopsy, which revealed a streak gonad showing fibrous tissue without gonadal elements only on the right side and a dysgenetic testis on the left side. Testicular tissue showing small primitive tubules within an ovarian-type stroma, few germ cells, and no definite Leydig cells were observed in the left gonad (fig. 1A). Male sex assignment was maintained and the left gonad was preserved. Hypospadias was corrected and Müllerian derivatives were removed when the patient was 2 years old. He has been followed-up for 19 years, presented normal growth with a final height within the target height, and his puberty developed spontaneously without gynecomastia.

Patient 2

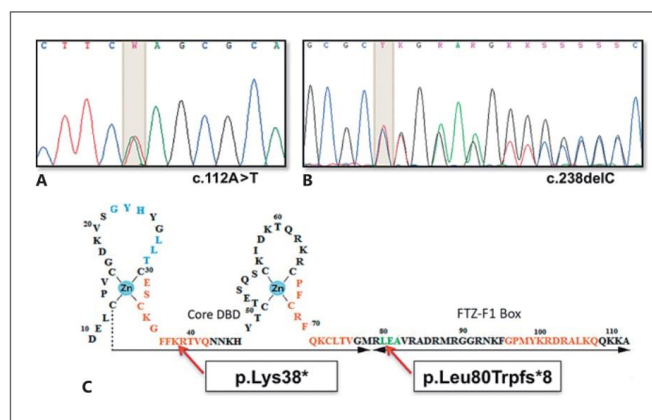
The proband, who received a female sex assignment at birth, was referred to us at the age of 10 months due to genital ambiguity. She was born at the 8th month of pregnancy as the first child

of healthy, non-consanguineous parents. Her birth weight and length were 2,580 g and 46 cm, respectively. Family history was unremarkable. She had a 2.3 cm phallus with chordee and 2 urethral orifices, one located at the perineal region and the other at the glandular region. Both gonads were palpable on inguinal channel (Prader stage III, EMS = 5). Cytogenetic investigation revealed a 46,XY karyotype. Hormonal data shown in table 1 revealed that FSH and LH baseline levels were elevated and slightly elevated, respectively. Abdominal ultrasound did not show any abnormality, and Müllerian derivatives were not observed on pelvic ultrasound. Genitography revealed that both openings were connected to the urethra and there were neither a vagina nor a uterus. The initial clinical evaluation combined with the results of complimentary exams and interviews with the family led to the decision to change the female sex assignment to male, and the child underwent surgical correction of cryptorchidism and hypospadias. Left and right gonads were biopsied during orchidopexy performed at the age of 2 and 3 years, respectively. Histological evaluation of gonadal biopsies showed that the testicular tissue in the right gonad had small areas of fibrosis and no germ cells. Therefore, it was considered a dysgenetic testis (fig. 1B), and the left gonad was considered a prepubertal testis (data not shown). The patient received the diagnosis of XY partial gonadal dysgenesis and has been followed-up for 17 years. He developed spontaneous puberty without gynecomastia and presented a final height within the target height. He is well adapted to the male sex. Sperm count revealed azoospermia. Testosterone replacement therapy was initiated at the age of 17.5 years due to elevated levels of gonadotropins and low levels of testosterone and also due to a low libido reported by the patient.

Patient 3

The proband, who received a female sex assignment at birth, was referred to us at the age of 15 months due to genital ambiguity and the histological finding of testicular tissue upon the evaluation of an inguinal hernia. She was born at term as the second child of healthy, non-consanguineous parents with a birth weight and length of 2,800 g and 49 cm, respectively. Family history was unremarkable. She had a 1 cm phallus with chordee and a penoscrotal urethral opening. Gonads were not palpable (Prader stage

Fig. 2. **A** Part of electropherogram sequence of patient 1 showing the heterozygous c.112A>T mutation within exon 3. **B** Part of electropherogram sequence of patient 2 revealed the heterozygous c.238delC mutation also in exon 3 of *NR5A1*. **C** Structure of SF1 DNA-binding domain. Arrows point to both substituted amino acids. The mutation p.Lys38*, resulting from a c.112A>T substitution, is located between the first and the second zinc finger, and the p.Leu80Trpfs*8, resulting from c.238delC, is located within the FTZ-F1 region [adapted from Little et al., 2006].



IV, EMS = 4). Cytogenetic investigation revealed a 46,XY karyotype. Abdominal ultrasound did not show any abnormality, and Müllerian derivatives were not visualized on pelvic ultrasound. Hormonal dosages indicated elevated FSH and normal LH basal levels; hCG stimulation test showed no response (table 1). Before she came to our service, the left gonad had already been excised during an inguinal hernia correction, and histological evaluation revealed a dysgenetic testis. Based on the initial clinical evaluation and the results of complementary exams and after interviews with the family, the female sex assignment was maintained and she underwent laparoscopy, which confirmed the absence of Müllerian derivatives. Feminizing genitoplasty and right gonadectomy were performed. Histological evaluation of the right gonad revealed a dysgenetic testis. There was testicular tissue showing prepubertal tubules, fibrosis, no germ cells (Sertoli-cell-only-syndrome), and residual Leydig cells with foamy cytoplasm (fig. 1C). The diagnosis of partial gonadal dysgenesis was established. The patient has been followed-up for 17 years. She is well adapted to her sex of rearing, female puberty was induced, and she had a normal growth (final height within the target height).

Genetic Analyses

Genomic DNA from patients was purified from peripheral leukocytes according to standard protocols by lysing with proteinase K, extracting with phenol/chloroform, and precipitating with ethanol. All *NR5A1* exons including ~200 bp of intron/exon boundaries and the 5'-upstream and 3'-downstream regions were amplified by PCR using specific primers designed based on the reference sequence (NG_008176/ENSG00000136931, accessed at <http://www.ensembl.org>). Independent PCR fragments were purified in 1% agarose gel electrophoresis with the Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega), and both sense and antisense strands were sequenced using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) and the same primers used in PCRs. The Chromas Lite 2.0 (Technelysium Pty Ltd) and CLC Sequence Viewer v.6.8.1 free software (CLC bio) were used to analyze and compare sequences with the reference *NR5A1* sequence.

Three different in silico tools were used to assess the consequences of the splice site mutation: SpliceAid (<http://www.introni.it/splicing.html>; Giulietti et al. [2013]) which is useful for predicting the effect of the DNA mutations at the level of the target sequences of the RNA binding proteins that determine the pattern of mRNA splicing; NNSPLICE 0.9 version of the splice site predictor (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html; Reese et al. [1997]) which is used to predict possible 5' and 3' splice sites; and Genscan splice prediction software (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) which predicts the locations and exon-intron structures of genes.

Results

Patient 1

NR5A1 gene sequencing revealed the heterozygous transition c.112A>T in exon 3 (fig. 2A) which is predicted to cause a substitution of a lysine codon at residue 38 by a stop codon (p.Lys38*). It is located within a highly conserved core of the DBD, as illustrated in figure 2C based on Little et al. [2006]. In addition, the heterozygous polymorphic variation p.Gly146Ala (rs1110061) was also identified in this patient. *SRY*, *WT1* [Scolfaro et al., 2001; Tagliarini et al., 2005], *DMRT1*, and *SOX9* (not published) were previously analyzed and no mutations were found.

Patient 2

The heterozygous deletion of the cytosine at c.238 in exon 3 was identified in the *NR5A1* sequence (fig. 2B). This mutation replaces the leucine at residue 80 with tryptophan, causes a frameshift, and prematurely termi-

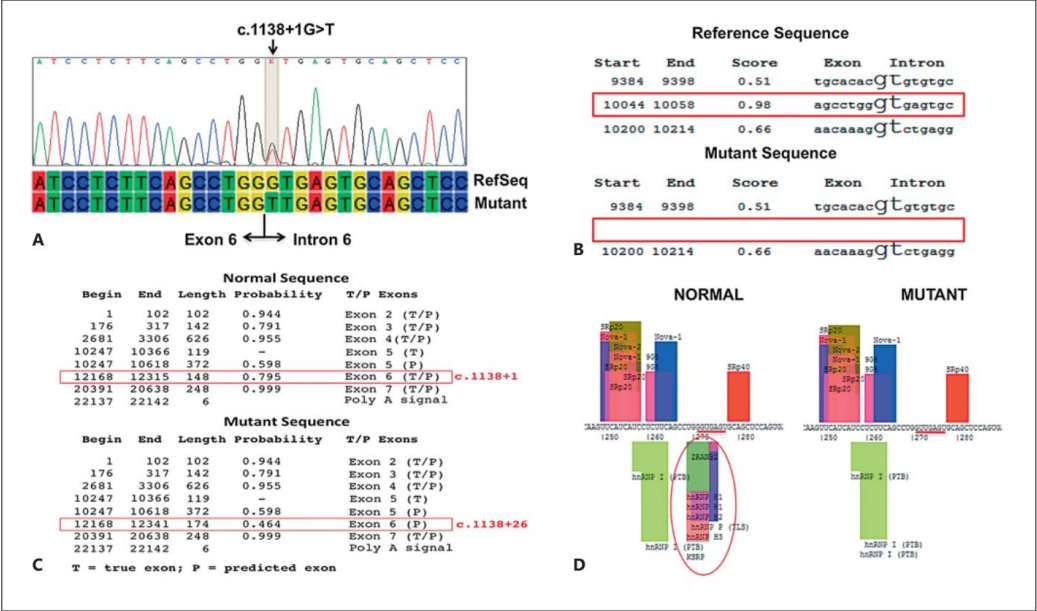


Fig. 3. A Part of electropherogram sequence of patient 3 showing the heterozygous c.1138+1G>T mutation in intron 6 of *NR5A1*. The alignment of *NR5A1* RefSeq and the mutant sequence is shown below the electropherogram with the exon 6-intron 6 junction (arrows). **B** Comparison of the normal and mutant sequence according to NNSPLICE 0.9 version of the splice site predictor. The normal site is denoted in the red rectangle, the corresponding site in the mutated sequence was totally abolished (empty red rectangle). **C** Genscan splice prediction software indicated the insertion of 26 nucleotides downstream of exon 6 into the transcript by the activation of an alternative splice donor site at c.1138+26, which probably leads to the frameshift p.Asp380Glyfs*10 with a

premature stop codon at residue 390. The red rectangle shows the normal sequence, in which the true exon 6 (represented by T) has 148 nucleotides in length, whereas in the mutant sequence, exon 6 is predicted to have 174 bp, indicating additional 26 nucleotides (represented by P). **D** Histogram provided in SpliceAid software for the normal and mutant sequences. After the mutation, the GGUGAGU motif (underlined in red) in the normal sequence, which is a recognition site for some regulatory proteins, such as hnRNPs, ZRANB2 and KSRP (red circle), is not yet recognized since it changed to GUUGAGU in the mutant sequence (underlined in red).

nates translation 8 residues after the point mutation (p.Leu80Trpfs*8). The residue 80 is the first residue of the FTZ-F1 box located in the DBD region (fig. 2C).

Patient 3

A heterozygous nucleotide substitution was identified at c.1138+1G>T which is located at the intron 6 donor splice site (fig. 3A). *SRY*, *WT1* [Scolfaro et al., 2001; Tagliarini et al., 2005], *DMRT1*, and *SOX9* (not published) were previously analyzed and no mutations were found in this patient. Three different in silico predictive tools were used to evaluate possible consequences of the c.1138+1G>T mutation. According to NNSPLICE 0.9

version of the splice site predictor, the mutation totally abolishes the donor splice site (fig. 3B). This analysis led to the conclusion that an anomalous transcript may result from exon 6 skipping either by the activation of an alternative splice site upstream of exon 6 or by using the intron 5 donor splice site. Regardless of the transcript result, it will certainly present a premature translation termination codon as indicated by the analysis using Genscan software, where the 26 nucleotides downstream to exon 6 are included in the transcript by the activation of an alternative splice donor site at c.1138+26. Potentially, this inclusion will cause the frameshift p.Asp380Glyfs*10, generating a stop codon at residue 390 (fig. 3C). In addition,

Table 2. Clinical characteristics correlated with *NR5A1* nonsense or frameshift mutations described in the literature

Mutation	Phenotype								Reference
	Urethral opening	Posterior labial fusion	Gonadal location (R/L)	Uterus	Basal gonadotrophins/basal testosterone	Testosterone response to hCG testing	Adrenal function	Gonadal histology (R/L)	
p.Tyr3*	perineal	+	IC/LSF	–	high/low	N/A	normal	N/A	Cools et al. [2012]
p.Asp6fs*74	perineal	–	IC/IC	–	high/low	N/A	normal	small dysgenetic testes (bilaterally)	Hasegawa et al. [2004]
p.Cys16*	perineal (separated openings)	N/A	NP/NP	+	high/low	weak	normal	hypoplastic testes with abundant seminiferous tubules but rare germ cells (mild dysgenetic testes bilaterally)	Mallet et al. [2004]
p.Tyr138*	perineal (urogenital sinus)	+	IC/IC	–	N/A/low	N/A	normal	bilateral testis with Sertoli-cell-only-syndrome	Köhler et al. [2008]
p.Pro179Hisfs*116	case 1: perineal (urogenital sinus)	+	IC/IC	–	normal/normal	normal	normal	prepubertal testis bilaterally	Coutant et al. [2007]
	case 2: perineal (urogenital sinus)	+	IC/IC	–	normal/low	N/A	normal	prepubertal testis bilaterally	
p.Tyr183*	family 2, proband: perineal (urogenital sinus)	N/A	IC/IC	–	high/normal	N/A	normal	small testes with seminiferous tubules with wide lumen, incomplete spermatogenesis, and apparent Leydig cell hyperplasia or pseudohyperplasia (postpubertal)	Warman et al. [2011]
p.Trp279*	family 1, proband: perineal opening (urogenital sinus)	–	LSF/LSF	–	normal/normal	normal	normal	N/A	Warman et al. [2011]
	family 1, case 2: perineal (urogenital sinus)	partial	IC/IC	+	high/low	low	normal	mild testicular dysgenesis and clusters of Leydig cells, unexpected for age	
p.Lys38*	penoscrotal	partial	IC/IC	+	high/low	low	normal	R: fibrous tissue, L: mild testicular dysgenesis.	this study
c.103–3C>A	scrotal	+	IC/IC	–	high/low	low	normal	N/A	Köhler et al. [2009]
p.Leu80Trpfs*8	two openings (perineal and balanic)	partial	NP/NP	–	high/low	normal	normal	R: prepubertal testis with SCOS, L: prepubertal testis	this study
c.1138+1G>T	penoscrotal	+	NP/NP	–	high/normal	low	normal	dysgenetic testes with residual Leydig cells with foamy cytoplasm.	this study

IC = Inguinal channel; LSF = labioscrotal folds; NP = not palpable; N/A = not available.

the SpliceAid analysis indicated that some regulatory proteins, such as hnRNPs, ZRANB2, and KSRP, no longer recognize the splice site after the G to T nucleotide substitution (fig. 3D).

Discussion

We describe 3 novel mutations in the *NR5A1* gene in 3 46,XY patients diagnosed with partial gonadal dysgenesis. Both p.Lys38* and p.Leu80Trpfs*8 are detected in the SF1 DBD, and the c.1138+1G>T mutation is located at the donor splice site of intron 6 of the *NR5A1* gene.

The great majority of the mutations described so far in *NR5A1* were identified in a heterozygous condition in pa-

tients [Pedace et al., 2014; Suntharalingham et al., 2015], indicating a predominance of autosomal dominant inheritance for this gene. As *NR5A1* dosage is important for its biological function, several mutations that lead to a premature stop codon have been described in the literature as causing SF1 haploinsufficiency (table 2). In 2004, Mallet and colleagues described a case of gonadal dysgenesis due to the p.Cys16* mutation and concluded that SF1 acts in a dose-dependent manner. The activity of the normal allele, corresponding to a dose of 50%, is sufficient to permit adrenal development, but it is not enough for gonadal development, whereas doses <50% are not sufficient for development of either glands. Two years before, Ozisiket et al. [2002] discussed the haploinsufficiency of SF1 highlighting the expectation that a reduced dosage of

a functional protein will have a cumulative effect on multiple steps that regulate glandular development and steroid production since SF1 regulates many genes involved in steroidogenesis. In all of our cases, the dysgenetic testes were able to produce testosterone, but it was insufficient to complete masculinization of the external genitalia. In addition, in 2 of the patients presenting with partial gonadal dysgenesis and 46,XY male assignment, SF1 haploinsufficiency was identified due to p.Lys38* and p.Leu80Trpfs*8 heterozygous mutations. Fischer and Scambler [1994] suggested that haploinsufficiency of a determined human developmental gene can be associated with a wide range of phenotypes among affected individuals, but according to our results and those described in the literature, in some cases of reduced dosage of SF1, the phenotype may not be so variable (table 2).

Splice site mutations in *NR5A1* have also been described. In 2009, Köhler and colleagues reported the c.103-3C>A change at the intron 2-exon 3 splice acceptor site in a patient with 46,XY partial gonadal dysgenesis. The mutation was predicted to generate a differently translated protein due to aberrant splicing. In the case described here, the c.1138+1G>T splice site mutation is located at the intron 6 canonic splice donor site and is predicted to generate an anomalous transcript and a truncated protein. Although we did not evaluate functional effects for this anomalous translated protein, it can be inferred that it is null, similarly to SF1 transactivation activity obtained for different nonsense and frameshift mutations that eliminate sequences corresponding to exons 6 and 7 from the translation product [unpubl. data]. Therefore, it is reasonable to suppose that the phenotype of this patient also results from SF1 haploinsufficiency, because a dominant negative effect is not observed for *NR5A1* mutations [Camats et al., 2012].

It is also interesting to point out that according to Köhler and Achermann [2010] the frequency of mutations in *NR5A1* in 46,XY DSD due to partial gonadal dysgenesis is even higher than the frequency of *SRY* mutations in 46,XY DSD due to complete gonadal dysgenesis. Furthermore, Tantawy et al. [2012] reported that the frequency of *NR5A1* mutations in patients with partial gonadal dysgenesis has been estimated to be ~15%. These data indicate the importance of investigating *NR5A1* mutations in such cases. Therefore, the description of novel mutations contributes to the increasing number of mutations in *NR5A1* and adds knowledge to the genetic diversity of this condition.

Despite *NR5A1* mutations, our patients developed spontaneous puberty, which is an important issue that

has been frequently discussed in the literature. Patients with normal testosterone production and spontaneous puberty have been described before [Bashamboo et al., 2010; Fabbri et al., 2014], but some presented with progressive gonadal dysgenesis resulting in oligospermia or azoospermia, as in patient 2 [Tantawy et al., 2012]. Pedace et al. [2014] suggested that *NR5A1* alterations may affect Sertoli cells more severely than Leydig cells, considering that most of the 46,XY patients will produce testosterone during life, maintaining the function of Leydig cells in adulthood, although it might be lower than that of normal cells. We observed in our patients that *NR5A1* mutations affected Leydig cells and led to ambiguous genitalia, but this effect was not drastic enough to cause complete dysgenesis of the testis. However, we cannot discard an effect of those mutations on Sertoli cell function, especially for patient 1, who developed a uterus. The presence of Müllerian structures in a 46,XY patient may suggest inadequate fetal Sertoli cell differentiation and AMH secretion. Knowing that SF1 is a transcription factor that regulates AMH expression along with other proteins, such as SOX9, GATA4, WT1, and DAX1, it is reasonable to consider that mutations in its gene can affect the expression of AMH at different levels, which could explain why one patient had a uterus while the others did not [Lasala et al., 2011; Werner et al., 2015].

Evaluating the molecular aspects of each mutation, it is possible to predict their impact on protein function based on their relative position in the protein structure. SF1 is a nuclear receptor that regulates gene transcription in several biological systems. The DBD is crucial for different receptors to appropriately recognize their specific target genes [Cools et al., 2012], and in this study we describe 2 mutations within this region. One is located at residue 38 (p.Lys38*) within an α -helix in the DBD core that ligates to the DNA major groove and serves as the primary recognition module for the canonical 6-bp sequence essential for the specific recognition of DNA. In addition, lysine 38 hydrogen bonds create non-covalent interactions, which are important to stabilize the DNA-protein complex [Little et al., 2006]. The second mutation at residue 80 (p.Leu80Trpfs*8) is located within the FTZ-F1 box that provides a secondary recognition element by crossing over the minor groove of the DNA. One of the acetylation sites of the protein, which is targeted by CBP/p300 and will increase DNA binding and SF1 transactivation, is located in the FTZ-F1 domain. In addition, the nuclear localization signal is also located within this domain, which is essential for importing the protein into the cell nucleus [Little et al.,

2006; Hoivik et al., 2010]. Therefore, this region is crucial for SF1 transactivation activity that is directly affected by the impact of a translation termination codon created by the mutations. It is feasible that RNAs containing those changes undergo nonsense-mediated mRNA decay, and even if an alternative ATG translation starting codon is activated, the resulting protein will miss the DBD, and consequently, it will be an N-terminally truncated protein.

Our third case presented the intronic substitution c.1138+1G>T at the donor splice region of intron 6. The first GT nucleotides of the donor site are the most conserved for the splicing process; consequently any substitution is damaging to the transcript. The mutation is predicted to result in an anomalous transcript with the creation of a premature translation termination codon as we can infer according to *in silico* studies. Based on that, there is an increased likelihood that the abnormal transcript may be degraded before translation through the activation of nonsense-mediated mRNA decay, suggesting that the effect on the phenotype would be similar to a heterozygous deletion of the *NR5A1* gene.

We can conclude that besides the wide range of the phenotypic spectrum associated with SF1 in cases of loss-of-function mutations, it is expected that patients may present similar characteristics. This was observed in our

cases as well as in the literature, and these findings can contribute to a better progress in phenotype-genotype correlations for mutations in SF1.

Acknowledgements

The authors would like to thank Mr. Wanderley Pedrosa da Graça from the Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM/ABTLuS sequencing facility and also Mrs. Alessandra Oliveira from the Laboratório Multiusuário, CBMEG, UNICAMP. The authors address a special thanks to Mrs. Cristiane dos Santos Cruz Piveta for technical support. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brasil) to M.P.M. and a scholarship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP# 2013/05603-5) to H.C.F.

Statement of Ethics

This study was approved by the Ethics committee of the School of Medical Sciences at the State University of Campinas. All patients signed a written informed consent for the biochemical and molecular studies.

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Achermann JC, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL: A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* 22:125–256 (1999).
- Achermann JC, Ozisik G, Ito M, Orun UA, Harman K, et al: Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1829–1833 (2002).
- Ahmed SF, Khwaja O, Hughes IA: The role of a clinical score in the assessment of ambiguous genitalia. *BJU Int* 85:120–124 (2000).
- Bashamboo A, Ferraz-de-Souza B, Lourenço D, Lin L, Sebire NJ, et al: Human male infertility associated with mutations in *NR5A1* encoding steroidogenic factor 1. *Am J Hum Genet* 87:505–512 (2010).
- Biason-Laubier A, Schoenle EJ: Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor 1 (*NR5A1/SF-1*) and adrenocortical insufficiency. *Am J Hum Genet* 67:1563–1568 (2000).
- Brauner R, Neve M, Allali S, Trivin C, Lottmann H, et al: Clinical, biological and genetic analysis of anorchia in 26 boys. *PLoS One* 6:e23292 (2011).
- Camats N, Pandey AV, Fernández-Cancio M, Andaluz P, Janner M, et al: Ten novel mutations in the *NR5A1* gene cause disordered sex development in 46,XY and ovarian insufficiency in 46,XX individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E1294–1306 (2012).
- Cools M, Hoebeke P, Wolffenbuttel KP, Stoop H, Hersmus R, et al: Pubertal androgenization and gonadal histology in two 46,XY adolescents with *NR5A1* mutations and predominantly female phenotype at birth. *Eur J Endocrinol* 166:341–349 (2012).
- Coutant R, Mallet D, Lahlou N, Bouhours-Nouet N, Guichet A, et al: Heterozygous mutation of steroidogenic factor-1 in 46,XY subjects may mimic partial androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2868–2873 (2007).
- Fabbri HC, de Andrade JG, Soardi FC, de Calais FL, Petroli RJ, et al: The novel p.Cys65Tyr mutation in *NR5A1* gene in three 46,XY siblings with normal testosterone levels and their mother with primary ovarian insufficiency. *BMC Med Genet* 15:7 (2014).
- Ferraz-de-Souza B, Lin L, Achermann JC: Steroidogenic factor-1 (*SF-1*, *NR5A1*) and human disease. *Mol Cell Endocrinol* 336:198–205 (2011).
- Fisher E, Scambler P: Human haploinsufficiency – one for sorrow, two for joy. *Nat Genet* 7:5–7 (1994).
- Giulietti M, Piva F, D'Antonio M, De Meo PD, Paoletti D, et al: SpliceAid-F: a database of human splicing factors and their RNA-binding sites. *Nucleic Acids Res* 41:125–131 (2013).
- Hasegawa T, Fukami M, Sato N, Katsumata N, Sasaki G, et al: Testicular dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46,XY patient with a heterozygous inactive mutation of steroidogenic factor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5930–5935 (2004).
- Hoivik EA, Lewis AE, Aumo L, Bakke M: Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (*SF-1*). *Mol Cell Endocrinol* 315:27–39 (2010).

- Köhler B, Achermann JC: Update – teroidogenic Factor 1 (SF-1, NR5A1). *Minerva Endocrinol* 35:73–85 (2010).
- Köhler B, Lin L, Ferraz-de-Souza B, Wieacker P, Heidemann P, et al: Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (*SF1*, *NR5A1*) in 46,XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency. *Hum Mutat* 29:59–64 (2008).
- Köhler B, Lin L, Mazen I, Cetindag C, Biebermann H, et al: The spectrum of phenotypes associated with mutations in steroidogenic factor 1 (*SF-1*, *NR5A1*, *Ad4BP*) includes severe penoscrotal hypospadias in 46,XY males without adrenal insufficiency. *Eur J Endocrinol* 161:237–242 (2009).
- Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV: Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res* 31:532–550 (2003).
- Lasala C, Schteingart HF, Arouche N, Bedecarrats P, Grinspon RP, et al: SOX9 and SF1 are involved in cyclic AMP-mediated upregulation of anti-Müllerian gene expression in the testicular prepubertal Sertoli cell line SMAT1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301:E539–547 (2011).
- Lin L, Achermann JC: Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex Dev* 2:200–209 (2008).
- Little TH, Zhang Y, Matulis CK, Weck J, Zhang Z, et al: Sequence-specific deoxyribonucleic acid (DNA) recognition by steroidogenic factor 1: a helix at the carboxy terminus of the DNA binding domain is necessary for complex stability. *Mol Endocrinol* 20:831–843 (2006).
- Lourenço D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, et al: Mutations in *NR5A1* associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 360:1200–1210 (2009).
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL: A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481–490 (1994).
- Mallet D, Bretones P, Michel-Calemard L, Djoud F, David M, Morel Y: Gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46,XY patient heterozygous for the nonsense C16X mutation: a case of SF1 haploinsufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4829–32 (2004).
- Mello MP, França ES, Fabbri HC, Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G: Multifunctional role of steroidogenic factor 1 and disorders of sex development. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 55: 607–612 (2011).
- Ozisk G, Achermann JC, Jameson JL: The role of SF1 in adrenal and reproductive function: insight from naturally occurring mutations in humans 76:85–91 (2002).
- Parker KL, Rice DA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, et al: Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog Horm Res* 57:19–36 (2002).
- Pedace L, Laino L, Preziosi N, Valentini MS, Scommegna S, et al: Longitudinal hormonal evaluation in a patient with disorder of sexual development, 46,XY karyotype and one *NR5A1* mutation. *Am J Med Genet Part A* 164:2938–2946 (2014).
- Prader A: Genital findings in the female pseudohermaphroditism of the congenital adrenogenital syndrome: morphology, frequency, development and heredity of the different genital forms. *Helv Paediatr Acta* 9:231–248 (1954).
- Reese M, Eckman F, Kulp D, Haussler D: Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 4:311–323 (1997).
- Röpke A, Tewes AC, Gromoll J, Kliesch S, Wieacker P, Tüttelmann F: Comprehensive sequence analysis of the *NR5A1* gene encoding steroidogenic factor 1 in a large group of infertile males. *Eur J Hum Genet* 21:1012–1015 (2013).
- Scolfaro M, Cardinali I, Stuchi-Perez E, de Mello M, Assumpção J, et al: Morphometry and histology of gonads from 13 children with dysgenetic male pseudohermaphroditism. *Arch Pathol Lab Med* 125:652–656 (2001).
- Suntharalingham JP, Buonocore F, Duncan AJ, Achermann JC: DAX-1 (NR0B1) and steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) in human disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 29:607–619 (2015).
- Tagliarini EB, Assumpção JG, Scolfaro MR, de Mello MP, Maciel-Guerra AT, et al: Mutations in *SRY* and *WT1* genes required for gonadal development are not responsible for XY partial gonadal dysgenesis. *Braz J Med Biol Res* 38:17–25 (2005).
- Tantawy S, Lin L, Akkurt I, Borck G, Klingmüller D, et al: Testosterone production during puberty in two 46,XY patients with disorders of sex development and novel *NR5A1* (*SF-1*) mutations. *Eur J Endocrinol* 167:125–130 (2012).
- Warman DM, Costanzo M, Marino R, Berensztejn E, Galeano J, et al: Three new *SF-1* (*NR5A1*) gene mutations in two unrelated families with multiple affected members: within-family variability in 46,XY subjects and low ovarian reserve in fertile 46,XX subjects. *Horm Res Paediatr* 75:70–77 (2011).
- Werner R, Mönig I, August J, Freiberg C, Lünstedt R, et al: Novel insights into 46,XY disorders of sex development due to *NR5A1* gene mutation. *Sex Dev* 9:260–268 (2015).
- Wong M, Ramayya MS, Chrousos GP, Driggers PH, Parker KL: Cloning and sequence analysis of the human gene encoding steroidogenic factor 1. *J Mol Endocrinol* 17:139–147 (1996).

Anexo 4: Parecer Comitê de Ética.

PRP
pró-reitoria de pesquisa
unicamp

Universidade Estadual de Campinas
Pró-Reitoria de Pesquisa
Comitê de Ética em Pesquisa

PRP
unicamp

CEP, 28/07/15.
(PARECER CEP: N° 434/2006)

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Gil Guerra Junior
Pesquisador Responsável

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

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

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gil Guerra Junior

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) aprovou o adendo que inclui o subprojeto "ESTUDO FUNCIONAL DE NOVAS VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS NO GEN NR5A1 EM PACIENTES 46,XY COM DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO DO SEXO", com dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, com finalidade de doutorado da aluna Helena Campos Fabbri, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/UNICAMP, em 28 de julho de 2015.

Renata Maria dos Santos Celeghini
Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP

Renata Maria dos Santos Celeghini
DRA. RENATA MARIA DOS SANTOS CELEGHINI
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP

Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
13083-887 Campinas – SP
☎ <http://www.prp.unicamp.br/index.php/comite-de-etica-em-pesquisa>

Fone/Fax (019) 3521-8936
Fone/Fax (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

Página | 1



Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 28 de julho de 2015.

Of. CEP/PRP/Nº 186/2015

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Gil Guerra Junior
Pesquisador Responsável

REF.: "AVALIAÇÃO INTERDISCIPLINAR DOS DISTÚRBIOS DA DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO SEXO" – PARECER CEP 434/2006.

Prezado Senhor,

A Plataforma Brasil foi implantada pela CONEP em parceria com o Ministério da Saúde visando manter todos os projetos de pesquisa no formato *on line*, incluindo os que já foram aprovados pelo CEP.

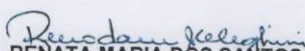
Nesse sentido, solicitamos que o projeto de pesquisa supracitado seja inserido na Plataforma Brasil, na opção "Para cadastrar projetos aprovados anteriores à Plataforma Brasil, clique aqui".

Por fim, os novos adendos que vierem a surgir deverão ser submetidos através do sistema da Plataforma Brasil como novo projeto de pesquisa, mencionando que os dados utilizados serão extraídos do projeto de pesquisa original já aprovado pelo CEP, cujo registro CAAE deverá ser mencionado.

Com isso, o adendo ou subprojeto intitulado "ESTUDO FUNCIONAL DE NOVAS VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS NO GEN NR5A1 EM PACIENTES 46,XY COM DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO DO SEXO" foi o último avaliado pelo CEP/Unicamp no formato atual.

Ficamos a disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida.

Atenciosamente,


DRA. RENATA MARIA DOS SANTOS CELEGHINI
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP

Anexo 5: Parecer CIBio.

CIDADE UNIVERSITÁRIA "ZEFERINO VAZ",
11 DE JULHO DE 2017.

CIBio: 03/2017

IDENTIFICAÇÃO

Doutorado: Helena Fabbri Scallet – CPG – GBM – UNICAMP.

PROJETO

Mutações novas em genes esteroideogênicos e suas alterações funcionais.

PARECER

Projeto aprovado pela CIBio / CBMEG sob número 10/2003.

Coordenador: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello.

PROFA. DRA. MÔNICA BARBOSA DE MELO
Presidente da CIBio/CBMEG - UNICAMP

Anexo 6: Declaração de Direitos Autorais.**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **"ESTUDO FUNCIONAL DE NOVAS VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS NO GENE NR5A1 EM PACIENTES 46,XY COM DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO DO SEXO"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 09 de Outubro de 2017

Assinatura : Helena Fabbri Scallet
Nome do(a) autor(a): **Helena Fabbri Scallet**
RG n.º 34982366-2

Assinatura : Maricilda Palandi de Mello
Nome do(a) orientador(a): **Maricilda Palandi de Mello**
RG n.º 6703914-5