

EDUARDO BECKER TAGLIARINI

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação Ciências Médicas da Facul-
dade de Ciências Médicas da UNICAMP, para
obtenção do título de Mestre em Ciências Médi-
cas, área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a)
Eduardo Becker Tagliarini.

Campinas, 20 de fevereiro de 2004.

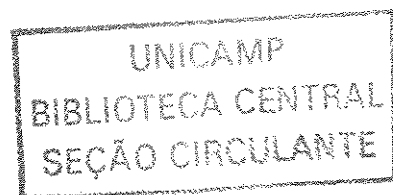

Prof(a). Dr(a). Christine Hackel.
Orientador(a)

200407824

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DO GENE *WT1*
EM PACIENTES PRÉ-PÚBERES COM DISGENESIA
GONADAL PARCIAL**

CAMPINAS

2004



EDUARDO BECKER TAGLIARINI

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DO GENE *WT1*
EM PACIENTES PRÉ-PÚBERES COM DISGENESIA
GONADAL PARCIAL**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROF^A. DR^A. CHRISTINE HACKEL

CO-ORIENTADOR : PROF. DR. GIL GUERRA JR.

CAMPINAS

2004

UNIDADE	13C
Nº CHAMADA	T128a
V	EX
TOMBO BCI	58033
PROC.	16/11/04
C	☐
PREÇO	R\$ 11.00
DATA	26/5/04
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00197119-9

0181D.316922

T128a Tagliarini, Eduardo Becker
Avaliação molecular do gene WT1 em pacientes pré-puberes com
disgenesia gonadal parcial / Eduardo Becker Tagliarini. Campinas, SP
: [s.n.], 2004.

Orientadores : Christine Hackel, Gil Guerra Júnior
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Genitália anormalidades. 2. Diferenciação sexual. 3. Pseudo-hermafrodismo. 4. Identidade sexual. 5. Diferenciação dos sexos, anomalias na. 6. Nefropatias. I. Christine Hackel. II. Gil Guerra Júnior. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Christine Hackel

Membros:

1. Profa. Dra. Maria Tereza Matias Baptista

2. Dra. Marcela de Araújo

3. Profa. Dra. Christine Hackel

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/02/04

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais ,
por todo amor, carinho e auxílio
em todos esses anos.*

*Os dias prósperos não vêm ao acaso;
são granjeados, como as searas,
com muita fadiga e
com muitos intervalos de desalento.*

Camilo C. Branco

A leitura faz o homem completo;

a conversa torna-o ágil;

o escrever torna-o preciso.

Francis Bacon

À Chris por ter-me aceito como aluno, pela confiança e auxílio em meu trabalho, a paciência que teve, e principalmente pela amizade nos momentos árduos e serenos durante todo esse tempo.

Aos meus pais por todo o apoio, amor, esperança... que depositaram em mim, permitindo assim meu crescimento pessoal e profissional, e sem os quais eu nunca poderia ter percorrido este caminho.

Aos meus irmãos, Inês, Elvira, Guadalupe e Guilherme pelo carinho e apoio que me deram durante todos esses anos.

À minha avó Elvira que muito me incentiva a nunca cessar meus estudos.

À minha filha Juliana que é um dos motivos do meu viver e aprimoramento.

À Cris pelos momentos felizes e alegres que tive ao seu lado nos últimos meses deste trabalho, e por todo seu amor e carinho para comigo.

Ao Dr. Gil pela co-orientação deste trabalho, principalmente na parte médica,

Aos membros da pré-banca e banca examinadora pela valiosa colaboração na melhoria do trabalho.

À Madá pela amizade, carinho e imensa ajuda no lab.

Ao pessoal do lab Andrey, Camila, Carla, Carol, Dani, Eliana, Ericka, Fabiana, Fer 1, Fer 2, Fer 3, Juliana, Junia, Lúcio, Lucy, Luiz, Marcelo, Mariana, Marta, Renata, Thalita e Tércio, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Às Dras. Edi e Maricilda por toda ajuda e conhecimento nesses anos de laboratório.

Aos amigos Eli, Vagner, Zé Luiz e Paulo Salvia, pela amizade e incentivo durante todos esses anos.

Aos amigos de Bauru, principalmente Vallim, Brosco, Roberta, César, Rodrigo, Karina e Maria, pela amizade e carinho.

À Tânia, Sandra, Andressa, Claudia, Sônia e Marcinha por todo apoio logístico.

Aos pacientes e (ou) responsáveis, sem os quais este trabalho não seria possível.

Aos órgãos financiadores CAPES e FAEP/UNICAMP.

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xix</i>
ABSTRACT.....	<i>xxii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	25
1.1- Diferenciação sexual masculina.....	28
1.2- Distúrbios da diferenciação sexual.....	28
1.3- Disgenesia gonadal.....	29
a. Disgenesia gonadal pura.....	30
b. Disgenesia gonadal mista.....	30
c. Disgenesia gonadal parcial.....	31
1.4- Genes envolvidos na determinação e diferenciação gonadal masculinas...	32
1.5- O gene <i>WT1</i>	35
1.6- Polimorfismos no gene <i>WT1</i>	40
1.7- Síndromes decorrentes de mutações no gene <i>WT1</i>	40
2- OBJETIVO.....	44
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1- Casuística.....	47
3.2- Coleta de amostras.....	51
3.3- Extração de DNA genômico a partir de sangue periférico.....	51
3.4- Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	53

3.5- Digestão enzimática.....	55
3.6- Análise do polimorfismo de conformação de fitas simples de DNA (SSCP).....	56
3.7-.Seqüenciamento do DNA dos produtos da PCR.....	57
3.8- Polimorfismo <i>Hinf I</i> em 3' - UTR do gene <i>WT1</i>	58
4- RESULTADOS.....	60
4.1- Reação em cadeia da polimerase.....	61
4.2- Análise do polimorfismo de conformação de fitas simples de DNA (SSCP).....	62
4.3- Seqüenciamento.....	66
4.4- Polimorfismo <i>Hinf I</i> em 3' - UTR.....	70
5- DISCUSSÃO.....	71
5.1- Mutação 1186G>A (D396N) em paciente com SDD.....	72
5.2- Polimorfismos e mutações silenciosas.....	75
5.3- Eficiência da técnica de SSCP no rastreamento de alterações nucleotídicas no gene <i>WT1</i>	76
6- CONCLUSÕES.....	77
7- INFORMAÇÃO DE BANCO DE DADOS ELETRÔNICO.....	79
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
9- ANEXOS.....	90
1- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP.....	91
2- Ambiguidade genital segundo a classificação de Quigley <i>et al</i> (1995).....	93

aa	aminoácidos
A- Δ 4	androstenediona
AR	do inglês “ androgen receptor”
β -hCG	fração beta da gonadotrofina coriônica
C	citossina
<i>DAX-1</i>	do inglês “Dosage sensitive sex reversal – Adrenal hypoplasia congenital – critical region on the X chromosome 1”
ddNTP	didesoxinucleotídeo trifosfato
DDS	do inglês “Denys-Drahs syndrome”
DG	disgenesia gonadal pura
DGP	disgenesia gonadal parcial
DEA	dehidroepiandrosterona
DHT	dihidrotestosterona
<i>DMRT-1</i>	do inglês “Doublesex and Mab-3 related Transcription factor 1”
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTM	diâmetro tubular médio
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético

FCM/UNICAMP	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas
FSH	hormônio folículo estimulante
FSHR	receptor do hormônio folículo estimulante
GHT	gravidade da hipoplasia tubular
GHG	gravidade da hiperplasia germinal
GIEDDS	Grupo Interdisciplinar de Estudos dos Distúrbios da Diferenciação Sexual
HAM	hormônio anti-mülleriano
HAM-R	receptor do hormônio anti-mülleriano
HC-UNICAMP	Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas
HCS	hiperplasia das células de Sertoli
IFT	índice de fertilidade tubular
IVS	íntron
kDa	quilodaltons
L	litro
LH	hormônio luteinizante
µg	micrograma
µL	microlitro
NCS	número de células de Sertoli

ORF	do inglês “open reading frame”
pb	pares de base
PCR	do inglês “polymerase chain reaction”
RNA	ácido ribonucleíco
RNA _m	ácido ribonucleíco mensageiro
SDD	síndrome de Denys-Drahs
<i>SF-1</i>	do inglês “Steroidogenic factor 1”
SNP	do inglês “Single Nucleotide Polymorphism”
<i>SOX-9</i>	do inglês “SRY-box homologous-9”
<i>SRD5A2</i>	do inglês “Steroid 5-alpha-reductase 2”
<i>SRY</i>	do inglês “Sex determining Region Y”
SSCP	do inglês “single strand conformation polymorphism”
SUG	seio urogenital
TE	tris-edta
TT	testosterona total
U	uracila
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
WAGR	síndrome WAGR (tumor de <u>W</u> ilms, <u>A</u> niridia, malformação <u>G</u> enitourinária e/ou <u>G</u> onadoblastoma e <u>R</u> etardo mental)
<i>WNT-4</i>	do inglês “Wingless-type MMTV integration site family, member 4”

<i>WT1</i>	do inglês “Wilms tumor supressor 1”
WT1	proteína WT1
WT1*	proteínas WT1 alternativa
3'-UTR	do inglês “3' untranslated region”
5'-UTR	do inglês “5' untranslated region”
+KTS	proteína WT1 com a inserção dos aminoácidos lisina, treonina e serina
-KTS	proteínas WT1 sem a inserção dos aminoácidos lisina, treonina e serina

	PÁG.
Tabela I- Desenvolvimento normal X Desenvolvimento anômalo na Disgenesia Gonadal Parcial.....	32
Tabela II- Dados clínicos dos 11 pacientes com disgenesia gonadal parcial e ambigüidade genital.....	48
Tabela III- Dados hormonais dos 11 pacientes com disgenesia gonadal parcial e ambigüidade genital.....	49
Tabela IV- Dados morfométricos e histológicos das gônadas dos 11 pacientes com disgenesia gonadal parcial e ambigüidade genital.....	50
Tabela V- Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados para a amplificação dos éxons do gene WT1 (S – “sense” AS – “antisense”) e o número de acesso das seqüências depositadas no “GenBank”.....	54
Tabela VI- Condições da digestão enzimática.....	55
Tabela VII- Protocolo de coloração com prata.....	57
Tabela VIII- Temperatura de anelamento e tamanho dos produtos de cada par de “primers”.....	62
Tabela IX- Condições de SSCP para os fragmentos analisados.....	62
Tabela X- Resultados observados no SSCP dos pacientes com Disgenesia Gonadal Parcial.....	65

Tabela XI-	Resultados observados no seqüenciamento para as regiões que apresentaram alterações em relação às seqüências depositadas no “Genbank”. e genótipos dos polimorfismos nucleotídicos (SNPs) observados em regiões não codificantes.....	69
Tabela XII-	Resultados do polimorfismo <i>Hinf</i> I em 3'-UTR em pacientes com Disgenesia Gonadal Parcial e controle.....	70

	PÁG.
Figura 1- Diferenciação sexual em humanos a partir dos primórdios indiferenciados.....	27
Figura 2- Determinação e diferenciação testicular.....	33
Figura 3- Representação esquemática do gene <i>WT1</i> . As setas 1, 2, 3 e 4 indicam os dedos de zinco.....	36
Figura 4- Proteína codificada pelo gene <i>WT1</i>	36
Figura 5- Isoformas produzidas pelos sítios de “splicing” alternativo.....	37
Figura 6- Dedos de zinco e inserção dos aa KTS.....	37
Figura 7- Ilustração da estrutura e dinâmica da inserção KTS na ligação da proteína <i>WT1</i> ao DNA. (a) Isoformas da proteína <i>WT1</i> livre (b) Isoforma –KTS da proteína <i>WT1</i> associada ao DNA, (c) Isoforma +KTS da proteína <i>WT1</i> associada ao DNA. As bandas amarelas em <u>b</u> e <u>c</u> indicam possíveis regiões de contato da proteína ao DNA. Note que na isoforma +KTS o 4º dedo de zinco não está em contato com o DNA.....	38
Figura 8- Mutações associadas com a síndrome de Frasier afetam o segundo <i>splicing</i> alternativo do sítio doador do éxon 9.....	42
Figura 9- Exemplos de resultados da análise SSCP. Os algarismos arábicos de 1 a 11 referem-se aos pacientes e a alínea C ao controle. (a) SSCP éxon 2 (20%); (b): SSCP éxon 8 (20%); (c): SSCP éxon 8 (20%); (d) SSCP éxon 5 (20%) e (e) SSCP éxon 5 (20%).....	63

Figura 10-	Resultados de SSCP do éxon 4: visualização de três padrões de migração dos produtos de amplificação. C (controle). (a) SSCP éxon 4 (gel a 12.5%).....	64
Figura 11-	Polimorfismo do íntron 4 do gene WT1. À direita, paciente homozigoto para A (adenina), e à esquerda, paciente homozigoto para G (guanina).....	67
Figura 12-	Mutação de ponto no éxon 9 (1186G>A). Sequenciamento da fita “antisense”. À esquerda, paciente 2 com alteração em heterozigose e à direita paciente 4 com seqüência normal.....	68
Figura 13a-	Visualização da amplificação da região 3’UTR nos pacientes com Disgenesia Gonadal Parcial e controle.....	70
Figura 13b-	Visualização da digestão dos produtos de PCR da região 3’UTR, com a enzima de restrição <i>Hinf</i> I.....	70



RESUMO

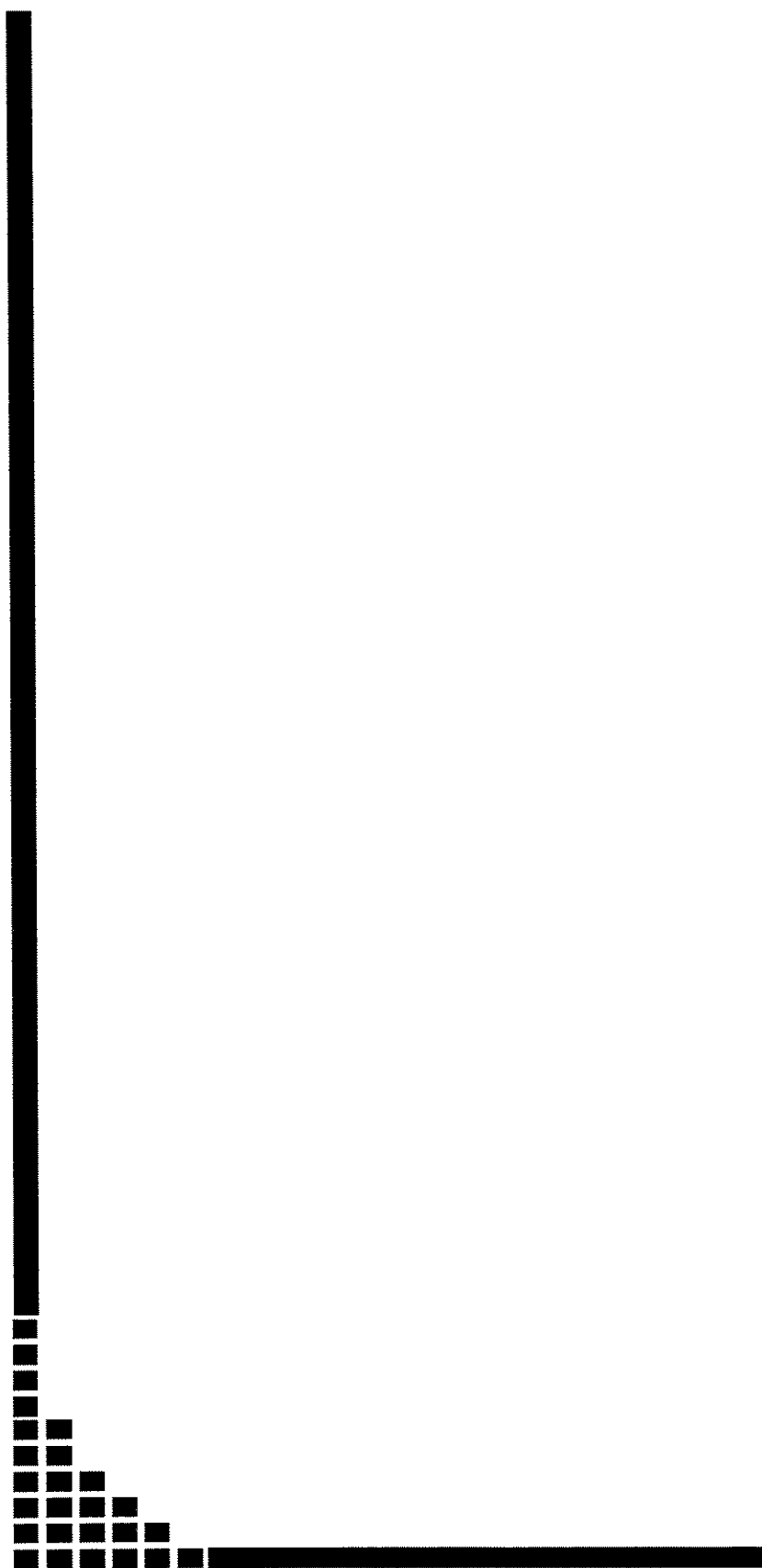
Em seres humanos, a determinação do sexo masculino dá-se pela presença de um cromossomo Y que, por meio da expressão do gene *SRY*, fará com que os primórdios gonadais se diferenciem em testículos. Além do *SRY* há outros genes envolvidos na determinação e diferenciação masculina, tal como o *WT1*, que codifica um fator de transcrição do tipo “zinc-finger”, essencial para o desenvolvimento gonadal e renal em mamíferos. Sabe-se que mutações germinativas do gene *WT1* estão relacionadas à formação de tumor de Wilms, distúrbios da diferenciação gonadal e malformações geniturinárias, encontradas nas síndromes WAGR, de Denys-Drash e de Frasier.

No presente estudo avaliou-se a presença de mutações no gene *WT1* em 11 pacientes pré-púberes com ambigüidade genital, cariótipo 46,XY e disgenesia gonadal parcial, dois dos quais com diagnóstico clínico de síndrome de Denys-Drash (SDD). Em todos os casos foram excluídas alterações moleculares no gene *SRY*.

Os dez éxons que compõem o gene *WT1* foram amplificados por PCR, em reações independentes, utilizando “*primers*” que flanqueiam essas regiões, em amostras de DNA genômico. Utilizou-se a técnica de SSCP como método de rastreamento de mutações nos produtos de PCR. Alterações de padrões de migração foram observadas apenas nos fragmentos correspondentes ao éxon 4. Devido à baixa sensibilidade (33%) do SSCP no presente trabalho, realizou-se o seqüenciamento manual dos produtos de PCR de todos os pacientes, com marcação radiativa ([α -³³P]-ddNTPs).

O seqüenciamento revelou a presença das variações -7ATG T>G, IVS4+85A>G e IVS9-49T>C e de duas mutações silenciosas no éxon 1 nas posições 126C>T (P42P) e 163G>A (P54P). Apenas em um dos pacientes com DDS encontrou-se uma mutação “*missense*” em heterozigose no éxon 9, em 1186G>A conduzindo à substituição do ácido aspártico por uma asparagina no aminoácido 396 (D396N). Essa mutação já foi descrita na literatura, sendo compatível com a manifestação fenotípica da SDD. Verificou-se que as mutações -7ATG T>G, 126C>T e IVS9-49 T>C correspondem aos SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) rs22345802, rs1799925 e rs1799937, respectivamente. As substituições IVS4+85A>G e 163G>A não foram descritas até o momento.

Os resultados do presente trabalho indicam que não há envolvimento de mutações no gene *WT1* na etiologia da disgenesia gonadal XY com ambigüidade genital, na ausência de anomalias renais. No entanto, a investigação molecular do gene *WT1* deve ser recomendada nos indivíduos com disgenesia gonadal e anomalias renais, uma vez que a identificação de mutações do *WT1* tem importância prognóstica, quando considerados os riscos para tumor de Wilms ou nefropatia.



ABSTRACT

Male sex determination in humans depends on the presence of one Y chromosome, which by *SRY* gene expression leads to the differentiation of the gonadal primordia into testes. Other genes are involved in male sex determination and differentiation, such as the *WT1*, that codes a “zinc finger” transcription factor essential to the gonadal and renal development in mammals. It is known that germinal *WT1* mutations are related to Wilms tumor formation, gonadal differentiation disorders and urogenital malformations, which are seen in the WAGR, Denys-Drash and Frasier syndromes.

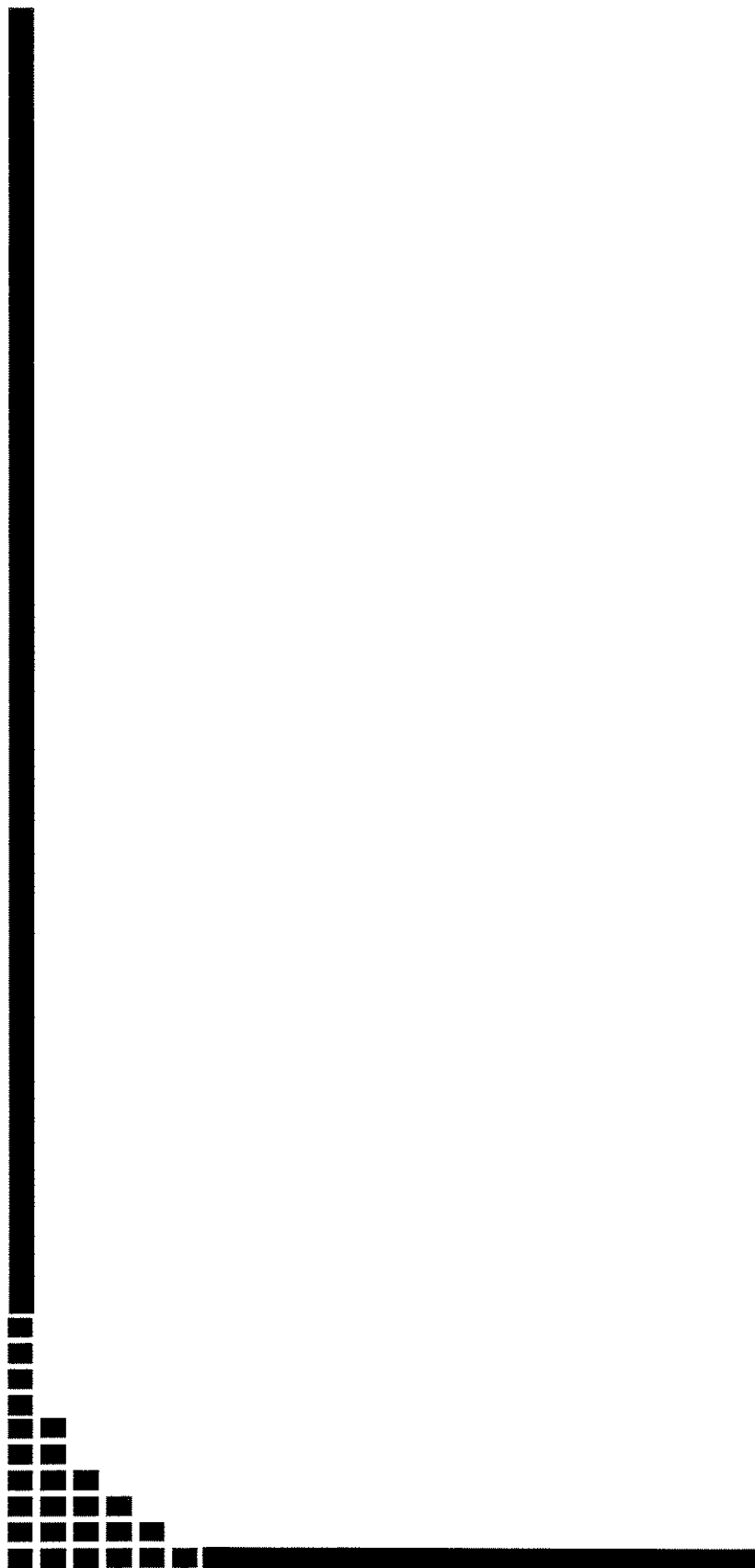
In the present study, we evaluated the presence of *WT1* gene mutations in eleven pre-pubertal patients with sex ambiguity, 46,XY karyotype and gonadal dysgenesis, two of them with clinical diagnosis of Denys-Drash syndrome (DDS). In all cases, molecular alterations in the *SRY* gene have been excluded.

The ten exons of the *WT1* gene were amplified by PCR with primers flanking these regions, in separated reactions, from genomic DNA samples. The SSCP technique was used as mutation screening method. Alterations in migration patterns were only observed in the exon 4 corresponding fragments. Due to the low sensitivity (33%) of SSCP in the present study, all PCR products from all the patients were manually sequenced with [α - 33 P]-ddNTPs.

Sequencing reactions revealed the presence of variations at -7ATG T>G, IVS4+85A>G and IVS9-49T>C, and two silent mutations in exon 1, at positions 126C>T (P42P) and 163G>A (P54P). Only one missense mutation (1186G>A) was found in heterozygous condition in the ninth exon in one of the DDS patients, changing the predicted amino acid in codon 396 from aspartic acid to asparagine (D396N). This mutation has already been reported in the literature, and is related to the phenotypic manifestations of the DDS.

The -7ATG T>G, 126C>T and IVS9-49 T>C mutations correspond to already described SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) under reference numbers rs22345802 rs1799925 and rs1799937, respectively. The substitutions IVS4+85A>G and 163G>A were not reported until this moment.

The results of the present work indicate that *WT1* gene mutations are not involved in the etiology of 46,XY gonadal dysgenesis with sex ambiguity in the absence of renal abnormalities. However, the molecular investigation of the *WT1* gene should be performed in these patients with gonadal dysgenesis since the identification of *WT1* mutations has prognostic significance, considering the risks for Wilms tumor or nephropathy.



1- INTRODUÇÃO

A primeira etapa da diferenciação sexual humana é a determinação do sexo cromossômico, que se dá pela fertilização de um óvulo, portador de um cromossomo sexual X, por um espermatozóide, que pode ser portador de um cromossomo sexual X ou Y (MOORE & PERSAUD, 2000).

Até próximo de sete semanas após a fecundação, o embrião formado é um organismo bissexual, ou seja, capaz de se diferenciar em um fenótipo masculino ou feminino. Nessa fase do desenvolvimento embrionário é impossível avaliar microscopicamente se o embrião tem predisposição masculina ou feminina. Verifica-se a co-existência dos primórdios dos condutos genitais masculinos e femininos, que são representados por dois sistemas de canais bilaterais, os ductos de Wolff e os de Müller, e dos rudimentos da genitália externa (Figura 1).

O passo seguinte para a diferenciação do sexo em masculino ou feminino, depende do sexo genético do embrião. Na dependência do sexo genético, tem-se a diferenciação das gônadas em ovários ou testículos, sendo este evento considerado o pivô da determinação sexual, pois a diferenciação dos genitais internos, do seio urogenital e da genitália externa serão apenas eventos secundários, dependentes da produção de hormônios produzidos pelos testículos ou não produzidos pelos ovários (JOST *et al.*, 1973).

Até os dias de hoje a designação mais usual do sexo no ser humano dá-se pela visualização dos genitais externos. Havendo a presença de genitais externos masculinos, a conclusão é de que se trate de uma pessoa do sexo masculino, e quando há a visualização de genitais externos femininos, a pessoa seria então do sexo feminino.

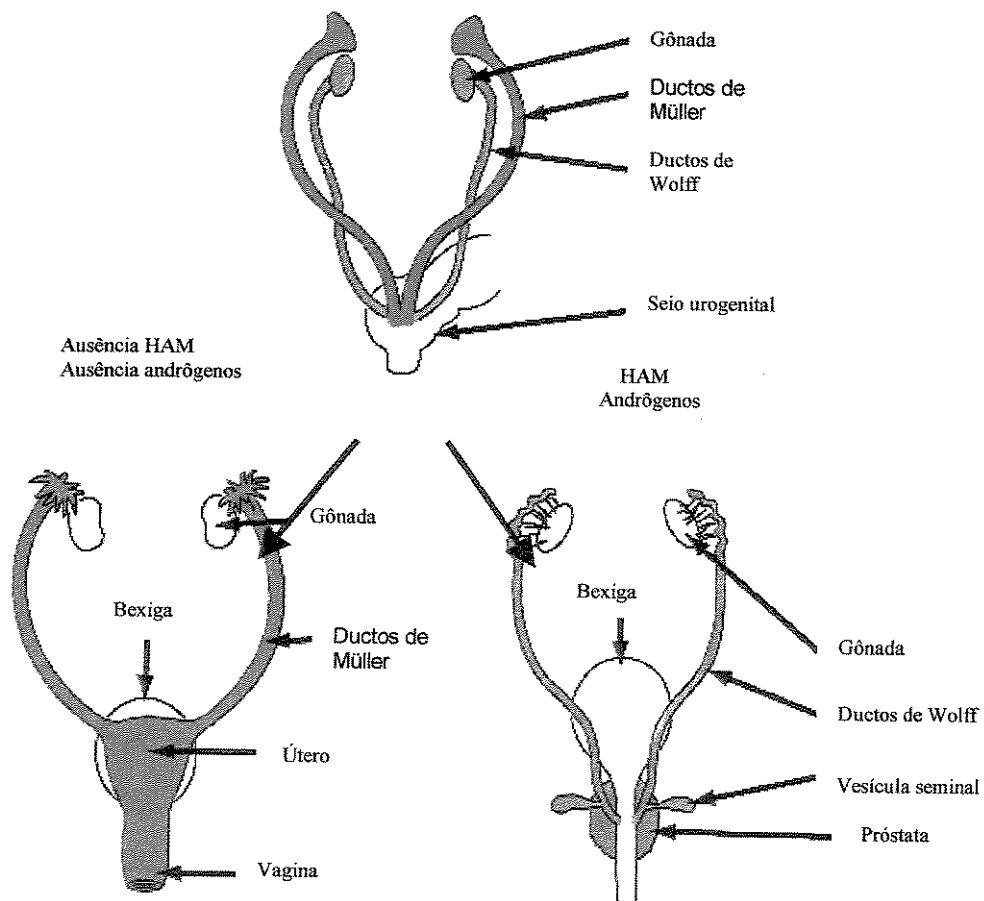


Figura 1- Diferenciação sexual em humanos a partir dos primórdios indiferenciados.

(Adaptado do site <http://www.hopkinsmedicine.org/pediatricendocrinology/intersex/sd2.html>)

1.1- DIFERENCIAÇÃO SEXUAL MASCULINA

Após a diferenciação das saliências gonadais em testículos, estes serão responsáveis pela regressão dos primórdios do trato genital interno feminino, por meio da ação do hormônio anti-mülleriano (HAM), produzido pelas células de Sertoli a partir da sétima semana de gestação. Além disso, cada testículo é responsável pela destruição do ducto de Müller de seu lado pela ação parácrina do HAM (MACIEL-GUERRA & GUERRA JR, 2002a).

As células de Leydig, presentes entre os túbulos seminíferos, produzem testosterona a partir da oitava semana de gestação. A testosterona por sua vez estabilizará os ductos de Wolff, permitindo posteriormente sua diferenciação em epidídimos, canais deferentes, vesículas seminais e ductos ejaculatórios (MACIEL-GUERRA & GUERRA JR, 2002a).

Parte da testosterona produzida é convertida pela enzima 5α -redutase tipo 2 (SRD5A2) em diidrotestosterona (DHT), um andrógeno muito mais potente que a testosterona, que fará com que os rudimentos dos genitais externos se virilizem entre a 9ª e a 12ª semana de gestação (MACIEL-GUERRA & GUERRA JR, 2002a).

1.2-DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL

Existem distúrbios que afetam a determinação e (ou) a diferenciação sexual, o que impossibilita a definição do sexo apenas pela visualização dos genitais externos.

Segundo GUERRA JR. & MACIEL-GUERRA (1999) relatos de casos de intersexualidade na humanidade existem desde a mais remota antiguidade. Foi com o desenvolvimento da anatomia patológica (séc. XVIII) e da microscopia (séc. XIX) que se tornou possível o aprofundamento dos estudos sobre a intersexualidade. Entretanto, foi somente a partir do século XX que se iniciou a elucidação das etapas embriológicas e dos genes envolvidos na diferenciação sexual, assim como das causas responsáveis pelos distúrbios da mesma.

A classificação mais prática desses distúrbios é baseada nos aspectos clínicos e laboratoriais, sendo assim constituída (GUERRA JR. & MACIEL-GUERRA, 1999):

- a) Distúrbios da Diferenciação Gonadal – distúrbios na diferenciação das gônadas, podendo haver ambigüidade genital.
- b) Pseudohermafroditismo feminino – indivíduos com cariótipo 46,XX, com ovários e virilização dos genitais externos em graus variados.
- c) Pseudohermafroditismo masculino – indivíduos com cariótipo 46,XY, com testículos e deficiência ou ausência de virilização dos genitais externos e internos.

A seguir, serão abordados mais amplamente, os distúrbios da diferenciação gonadal que levam a disgenesia gonadal.

1.3- DISGENESIA GONADAL

O termo “disgenesia gonadal”, é geralmente utilizado para descrever uma série de condições clínicas nas quais o desenvolvimento das gônadas fetais é anormal (MACIEL-GUERRA & GUERRA JR., 2002b).

Os indivíduos que apresentam disgenesia gonadal formam um grupo heterogêneo, apresentando os mais variados padrões de morfologia gonadal, diferenças no desenvolvimento somático, na constituição cromossômica e na expressão familiar. O que estes pacientes têm em comum é o desenvolvimento completo ou parcial dos derivados müllerianos (vide, por exemplo, MACIEL-GUERRA & GUERRA JR., 2002b, entre outros).

Os indivíduos com disgenesia gonadal podem ser divididos em três grupos, a saber: pura ou completa, parcial ou incompleta e mista.

a) Disgenesia Gonadal Pura (DG)

Segundo GUERRA JR & MACIEL-GUERRA (1999) e MARQUES-DE-FARIA (2002b) os indivíduos classificados nesse grupo apresentam as seguintes características:

1. ambas as gônadas são disgenéticas,
2. os genitais internos e os externos são totalmente femininos,
3. hipogonadismo hipergonadotrófico,
4. não se observa baixa estatura, ou outros sinais da síndrome de Turner;
5. a etiologia pode ser autossômica recessiva, por mutação no gene FSHR (receptor do hormônio folículo estimulante) (AITTOMAKI *et al*, 1995), recessiva ligada ao X, autossômica dominante ou alteração do gene SRY;
6. e podem apresentar cariótipo 46,XX ou 46,XY.

Todos os indivíduos pertencentes a este grupo sempre apresentam gônadas “em fita”, ou seja, não há diferenciação em testículos ou ovários. Nos indivíduos com cariótipo 46,XY, que possuem DG, as gônadas “em fita” geralmente são constituídas por tecido fibroso e estroma do tipo ovariano. Segundo BERKOVITZ *et al.*, (1991) isso ocorre porque, na ausência de determinação testicular, as gônadas desenvolvem-se em ovários, mas sofrem degeneração devido à falta de um segundo cromossomo X. Nestes casos de DG pura com cariótipo 46,XY há alto risco (20-30%) de malignização gonadal (gonadoblastoma e (ou) disgerminoma) (VERP & SIMPSON, 1987; LUKUSA *et al*, 1991; GOURLAY *et al*, 1994).

b) Disgenesia Gonadal Mista

Segundo revisão de MARQUES-DE-FARIA (2002a), este grupo se caracteriza por:

1. gônada disgenética de um lado e do outro um testículo, geralmente rudimentar;
2. cariótipo usualmente 45,X/46,XY;

3. freqüentemente ocorrem sinais da síndrome de Turner;
4. em geral há ambigüidade genital externa e interna, sendo observada a presença de derivados de Müller;
5. e cerca de 10 a 20% dos casos desenvolvem tumores gonadais, especialmente gonadoblastoma, disgerminoma e (ou) seminoma (SCULY, 1970; VERP& SIMPSON, 1987; GOURLAY *et al*, 1994).

c) Disgenesia Gonadal Parcial (DGP)

A disgenesia gonadal parcial é uma variante da disgenesia gonadal pura XY. As características que este grupo apresenta (BERKOVITZ *et al*. 1991; GUERRA JR & MACIEL-GUERRA, 1999; MACIEL-GUERRA & GUERRA JR, 2002c; GUERRA JR, 2003) são as seguintes:

1. ambigüidade genital interna e externa,
2. diferenciação gonadal incompleta;
3. e cariótipo 46,XY.

Neste grupo, a gravidade da disgenesia gonadal afetará diretamente a produção de testosterona e de hormônio anti-mülleriano.

Segundo SCOLFARO (2001) e SCOLFARO *et al* (2001), a histologia gonadal é variável, sendo constituída freqüentemente por túbulos seminíferos pouco desenvolvidos, rodeados por estroma do tipo ovariano. O diagnóstico destes indivíduos pode ser feito ao nascimento, pois apresentam genitália externa ambígua (Tabela I), sendo importante diferenciá-los da disgenesia gonadal mista.

Tabela I- Desenvolvimento normal X Desenvolvimento anômalo na Disgenesia Gonadal Parcial. (Adaptado do site <http://www.hopkinsmedicine.org/pediatricendocrinology/intersex/sd2.html>).

Desenvolvimento Feminino Normal	Disgenesia Gonadal Parcial	Desenvolvimento Masculino Normal
XX	XY	XY
Ovários	Desenvolvimento parcial dos testículos	Testículo
Não há produção de andrógenos	Produção de andrógenos variável	Produção de andrógenos normal
Ductos de Müller	Ductos de Wolff c/ algum desenvolvimento	Ductos de Wolff
Não há produção de HAM	Produção de HAM – variável	Produção de HAM normal
Genitália interna feminina	Resquícios dos ductos de Müller	Genitália interna masculina
Genitália externa feminina	Genitália externa ambígua	Genitália externa masculina

1.4- GENES ENVOLVIDOS NA DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO GONADAL MASCULINAS

Nas últimas décadas houve grande avanço na elucidação dos processos envolvidos na determinação e diferenciação sexual. Foram descobertos muitos genes envolvidos nesses processos, bem como a forma de interação entre seus produtos. A expressão de tais genes pode dar-se em uma ou mais etapas dos processos de determinação e diferenciação testicular (Figura 2).

Inicialmente tem-se a expressão de genes que determinam a diferenciação do mesoderma intermediário em gônadas bipotentes, tais como o *SF-1* (Steroidogenic Factor-1) e o *WT1* (“Wilms Tumor 1 supressor locus”).

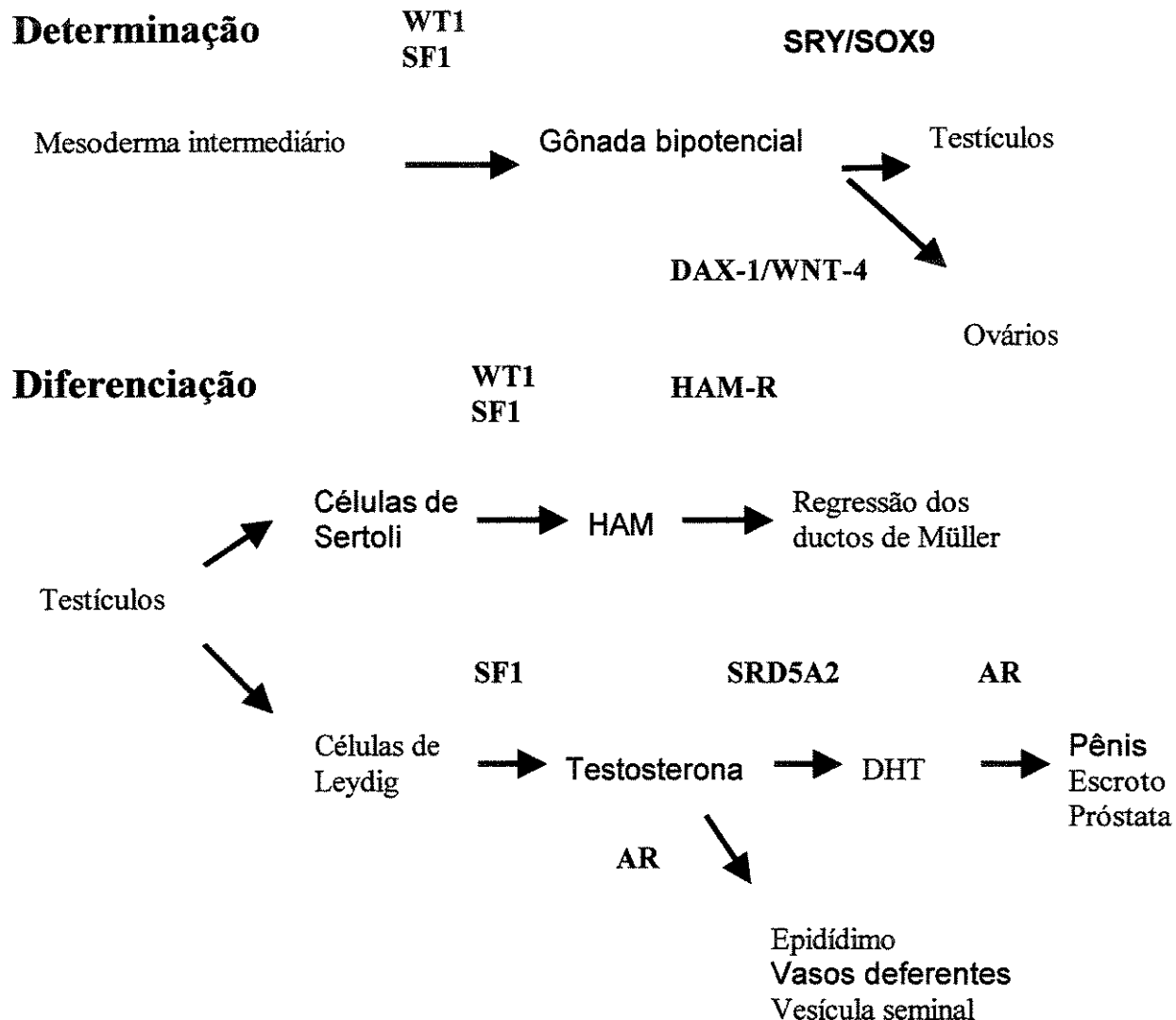


Figura 2- Determinação e diferenciação testicular (adaptado de PARKER *et al.*, 1999).

HAM – hormônio anti-mülleriano

HAM-R – receptor do hormônio antimülleriano

SRD5A2 – enzima 5 α Redutase tipo 2

AR – receptor de andrógenos

DHT – Diidrotestosterona

O *SF-1* é considerado o principal regulador das enzimas envolvidas na esteroidogênese adrenal e gonadal (PARKER & SCHIMMER, 1997). A homozigose para mutações que inativam o gene *SF-1* em camundongos resulta na ausência de desenvolvimento gonadal e adrenal, ausência de gonadotrofinas hipofisárias e presença de alterações estruturais na região ventral-mediana do hipotálamo. Há expressão do *SF-1* para a formação das gônadas bipotenciais em ambos os sexos (LUO *et al.*, 1994; IKEDA *et al.*, 1995).

O *WT1* codifica um fator de transcrição do tipo “zinc-finger”, sendo essencial para o desenvolvimento gonadal e renal em mamíferos (PRITCHARD-JONES *et al.*, 1990). No rim fetal, ele expressa-se no mesênquima, na vesícula renal e nos podócitos em desenvolvimento. Experimentos envolvendo o “knockout” desse gene em camundongos resultam na ausência de desenvolvimento renal e gonadal (KREIDBERG *et al.*, 1993). Em humanos, o gene *WT1* expressa-se nas saliências gonadais antes da diferenciação do testículo. A proteína WT1 é detectada em baixas concentrações pela primeira vez a partir de 31 dias pós-ovulação, atingindo níveis significativos a partir de 41 dias pós-ovulação, quando a expressão do *SRY* se inicia nas saliências gonadais (HOSSAIN & SAUNDERS, 2001).

Em seguida, nos embriões do sexo genético masculino, há pelo menos dois genes que participam diretamente na transformação das gônadas bipotenciais em testículos: o *SRY* (“Sex determining Region Y”) e o *SOX-9* (um dos genes autossômicos da família “SRY-box homologous”). Ambos são fatores de transcrição que se expressam no testículo, mas não no ovário, e devem coordenar a diferenciação das células de Sertoli nas gônadas do embrião (SINCLAIR *et al.*, 1990; KENT *et al.*, 1996).

A expressão do gene *DAX-1* (Dosage sensitive sex reversal – Adrenal hypoplasia congenital – critical region on the X chromosome 1) tem início na mesma época que o *SRY*, mas sua expressão é reprimida conforme o desenvolvimento testicular prossegue, sendo mantida durante o desenvolvimento ovariano (SWAIN *et al.*, 1998; YU *et al.*, 1998). O gene *WNT-4* (“Wingless-type MMTV integration site family, member 4”) codifica uma glicoproteína com função sinalizadora, atuando como repressora da determinação gonadal masculina e estimuladora do desenvolvimento sexual feminino. A

deleção do *WNT-4* em camundongos causa a virilização dos fetos XX (VAINIO *et al.*, 1999).

Após a diferenciação testicular, o *WT1* continua sendo transcrito nas células de Sertoli do testículo fetal, juntamente com o gene do HAM (NACHTIGAL *et al.*, 1998). A expressão do gene *SF-1* nas células de Sertoli, regula a síntese do HAM, que, por intermédio do receptor do hormônio anti-mulleriano (HAM-R), conduz à regressão dos ductos de Müller, que são os rudimentos embrionários dos condutos genitais internos femininos. Nas células de Leydig, o produto do gene *SF-1* regula a expressão de enzimas envolvidas na biossíntese dos esteróides, indicando que esse receptor nuclear atua como mediador da expressão de genes específicos para o sexo masculino (PARKER & SCHIMMER, 1997). A testosterona, secretada pelas células Leydig, pode ser convertida em um andrógeno mais potente, a 5 α -di-hidrotestosterona, por meio da enzima 5 α -redutase tipo 2. Para desempenharem suas funções fisiológicas, ambos os hormônios ligam-se aos receptores de andrógenos nas células-alvo, conduzindo à diferenciação dos ductos de Wolff e dos genitais externos (PARKER *et al.*, 1999)

1.5- O GENE *WT1*

O gene *WT1* está localizado no braço curto do cromossomo 11 na banda 13 (11p13) e sua clonagem foi possível a partir do estudo de pacientes com tumor de Wilms, cujas células tumorais exibiam uma deleção desta região cromossômica (CALL *et al.*, 1990). Esse gene tem aproximadamente 50 Kb contendo 10 éxons (Figura 3). Os éxons 1 a 6 codificam uma região reguladora de transcrição, ao passo que os éxons 7 a 10 codificam o domínio de ligação ao DNA (GESSLER *et al.*, 1990; HABER *et al.*, 1991). A extremidade amino-terminal é rica em prolina e glutamina e a extremidade carboxi-terminal forma os quatro dedos de zinco (Cys)₂ – (His)₂, que permite sua ligação a regiões promotoras de outros genes (CALL *et al.*, 1990; GESSLER *et al.*, 1990; MORRIS *et al.*, 1991) (Figura 4).

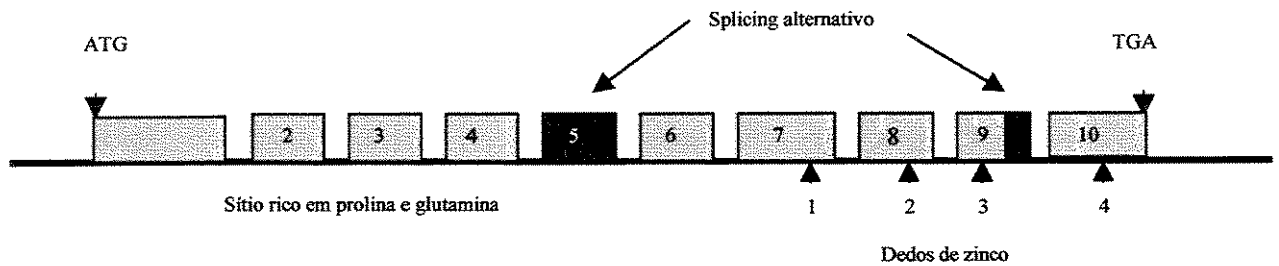


Figura 3- Representação esquemática do gene *WT1*. As setas 1, 2, 3 e 4 indicam os dedos de zinco. (Adaptado de HABER *et al.*, 1991).

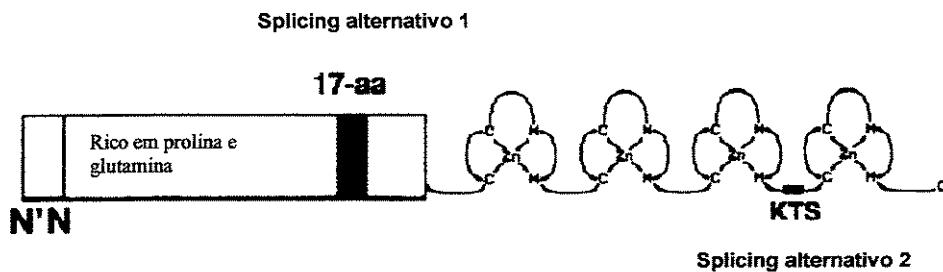


Figura 4- Proteína codificada pelo gene *WT1* (Adaptado de DAVIES *et al.*, 1999).

aa – aminoácidos

KTS – aa prolina, treonina e serina.

O *WT1* apresenta dois sítios de “splicing” alternativos que levam à formação de quatro isoformas (HABER *et al.*, 1991; DAVIES *et al.*, 1999; HOSSAIN & SAUNDERS, 2001; Figuras 3, 4 e 5), sendo o primeiro (sítio 1) responsável pela inserção ou não do éxon 5, que codifica 17 aminoácidos (aa) e o segundo (sítio 2) responsável pela inserção ou não de 3 aa, prolina, treonina e serina (isoformas +KTS/-KTS respectivamente), entre o 3º e o 4º dedos de zinco (Figuras 5 e 6).

A produção de quatro tipos diferentes de RNA mensageiro (RNAm) sugere que o controle da proliferação celular e da diferenciação exercido pelos produtos do gene *WT1* depende da interação desses 4 polipeptídios, com diferentes alvos e funções (HABER *et al.*, 1991).

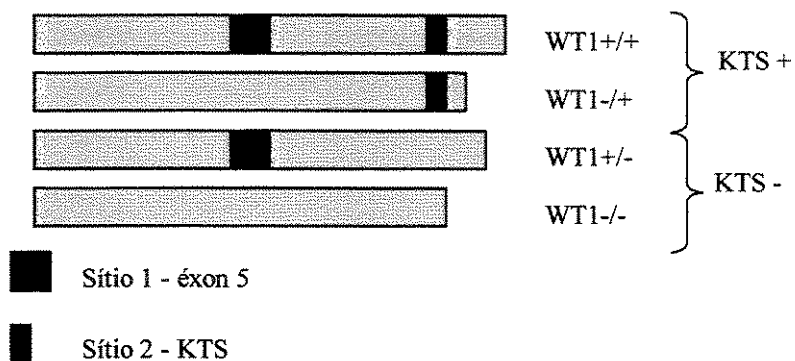


Figura 5- Isoformas produzidas pelos sítios de “splicing” alternativo. (Adaptado de HOSSAIN & SAUNDERS, 2001).

As isoformas protéicas +KTS e –KTS exibem diferentes propriedades em termos de ligação ao DNA (Figura 7), interação proteína-proteína e distribuição nuclear (BICKMORE *et al.*, 1992; LARSSON *et al.*, 1995; HEWITT *et al.*, 1996; NATCHIGAL *et al.*, 1998, LAITY *et al.*, 2000). Em relação à sua localização, as isoformas –KTS estão associadas com outros fatores de transcrição, estando próximas ao DNA, enquanto que as isoformas +KTS encontram-se associadas a componentes da maquinaria do pré-RNAm (LAITY *et al.*, 2000). Em relação ao éxon 5, ainda não são conhecidas as funções das isoformas produzidas pela inserção ou não deste e se realmente existe alguma diferença funcional entre elas (LAITY *et al.*, 2000).

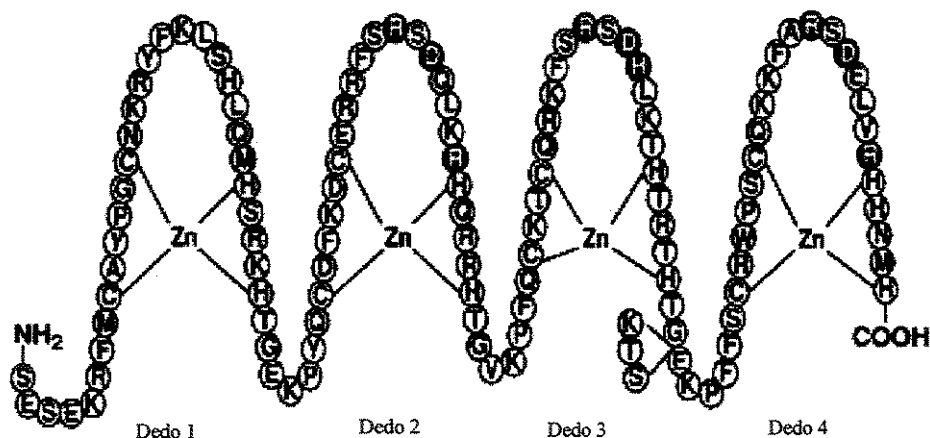


Figura 6- Dedos de zinco e inserção dos aa KTS (Adaptado de LAITY *et al.*, 2000).

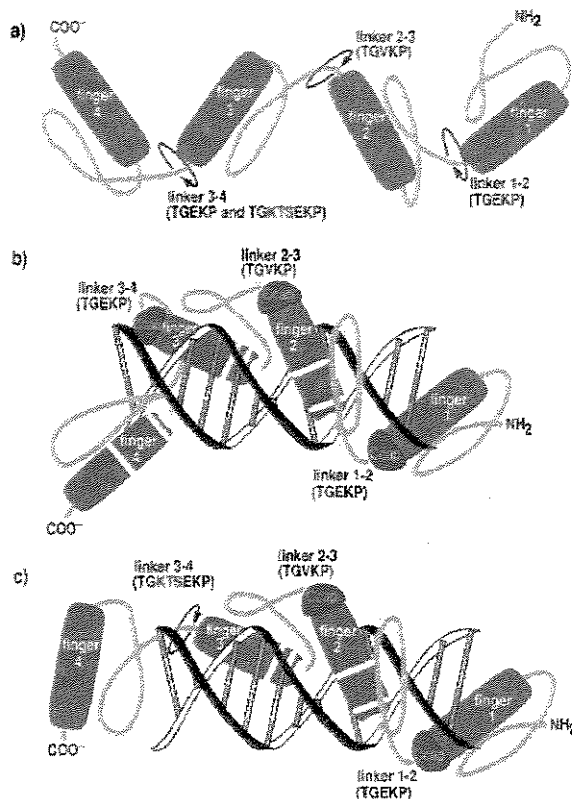


Figura 7- Ilustração da estrutura e dinâmica da inserção KTS na ligação da proteína *WT1* ao DNA.

- (a) Isoformas da proteína *WT1* livre,
- (b) Isoforma -KTS da proteína *WT1* associada ao DNA.
- (c) Isoforma +KTS da proteína *WT1* associada ao DNA.

As bandas amarelas em b e c indicam possíveis regiões de contato da proteína ao DNA. Note que na isoforma +KTS o 4º dedo de zinco não está em contato com o DNA. (Adaptado de LAITY *et al*, 2000).

Embora a proteína WT1 atue como um regulador transcricional, há vários genes que possuem promotores responsivos à mesma, mas que não são fisiologicamente regulados por ela. A proteína WT1 pode agir como ativadora ou repressora de promotores ricos em GC, dependendo das condições experimentais (REDDY & LICHT, 1996) e reprimir regiões promotoras que apresentam repetições TC (RAUSCHER, 1993).

Como mencionado anteriormente, quatro isoformas protéicas, com pesos moleculares entre 47 e 49 kDa, foram inicialmente reconhecidas em humanos. Entretanto, estudos mais recentes revelaram a existência de isoformas maiores e menores, em comparação às até então descritas, aumentando dessa forma o total de isoformas conhecidas para 24 tipos diferentes. Essa heterogeneidade de isoformas deve-se a combinação de (1) sítios de início de tradução alternativos, (2) a existência de um segundo códon ATG, (3) a ocorrência de “splicing” alternativos de RNA e (4) edição de RNA (MROWKA & SCHEDL, 2000; WAGNER *et al*, 2003).

BRUENING & PELLETIER (1996) comprovaram a expressão de proteínas WT1 alternativas (WT1*), com pesos moleculares entre 54-56 kDa, em tecidos gonadais murinos. Esses autores atribuíram essas formas alternativas à presença de dois códons não usuais de início de tradução em eucariotos (CUG) na região 5' não traduzida (5'-UTR), situados aproximadamente 200 bases acima do primeiro códon AUG. Também constataram que determinadas mutações em um dos códons alternativos de início de tradução (por exemplo, CUG²⁰⁴→CUC²⁰⁴) levam a um decréscimo drástico na produção das proteínas WT1*, tendo pouco efeito sobre as proteínas WT1. É importante mencionar que os códons CTG acham-se conservados entre os cDNAs de camundongos e humanos, em posições ligeiramente diferentes em relação ao primeiro códon ATG.

Isoformas menores da proteína WT1 também foram descritas em linhagens celulares oriundas de testículo de camundongo e de tumor de Wilms, com pesos moleculares entre 36 e 38kDa (SCHARNHORST *et al.*, 1999). Essas isoformas, com perda de parte da região N-terminal, são resultantes de um segundo códon AUG alternativo no RNAm (Metionina127), sendo potencialmente ativadoras de transcrição, mas incapazes de repressão. Além disso, constatou-se que a edição de transcritos do RNAm de *WT1* leva à substituição de uma leucina por uma prolina, tanto em testículos humanos quanto em tecidos renais de ratos adultos, devido à conversão de U para C no nucleotídeo 839 (SHARMA *et al.*, 1994). Desse modo, esses achados indicam a possibilidade de que as isoformas adicionais aumentem a complexidade da regulação mediada pelo *WT1* no desenvolvimento normal e anormal do sistema urogenital.

1.6- POLIMORFISMOS NO GENE *WT1*

Nos últimos anos houve um interesse crescente na caracterização de polimorfismos de único nucleotídeo, usualmente descritos pela sigla SNP (“Single Nucleotide Polymorphism”), em todo o genoma humano. Os SNPs são variações nucleotídicas bastante comuns, ocorrendo a cada 100-300 bases do DNA. Há cerca de cinco anos, iniciou-se o estabelecimento de uma base de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), cuja finalidade é compilar as informações referentes às variações nucleotídicas observadas nos genótipos, sejam elas individuais ou populacionais. A cada SNP, é atribuído um registro numérico (*rs* – reference SNP) que contém informações sobre sua validação (número de indivíduos examinados, heterozigose estimada, frequências alélicas) e sua localização gênica.

Em relação ao gene *WT1*, acham-se compilados, nessa base de dados, 4 SNPs em 5’-UTR, 17 SNPs em 3’-UTR, 206 SNPs em íntrons, 4 SNPs em regiões codificantes, que não levam à substituição de aa (Arg42Arg; Pro130Pro; Gln268Gln e Arg284Arg) e uma alteração, ainda não confirmada como SNP, que leva à substituição Ser181Pro.

Há ainda um polimorfismo na região 3’ não traduzida (3’-UTR), que altera um sítio de restrição reconhecido pela enzima *Hinf* I, tratando-se provavelmente da primeira variação nucleotídica descrita para o gene *WT1* (HOBAN & KELSEY, 1991).

1.7- SÍNDROMES DECORRENTES DE MUTAÇÕES NO GENE *WT1*

Deleções ou mutações de ponto no gene *WT1* foram descritas em aproximadamente 30% dos casos hereditários de tumor de Wilms (SCHUMACHER *et al.*, 1997) e podem ser detectadas em 6% a 15% de pacientes pediátricos com a forma esporádica do tumor (VARANASI *et al.*, 1994; LITTLE & WELLS, 1997). Mutações germinativas nesse gene, em heterozigose, também são encontradas na síndrome de Denys-Drash (SDD), na síndrome de genes contíguos designada WAGR (tumor de Wilms, aniridia, malformação genitourinária e (ou) gonadoblastoma e retardo mental) e na síndrome de Frasier (pseudohermafroditismo com glomerulopatia progressiva).

Clinicamente, os pacientes com SDD apresentam genitais externos femininos ou ambíguos; em cerca de 13% dos casos, porém, os genitais externos podem ser tipicamente masculinos (MACIEL-GUERRA & GUERRA JR., 2002a). Independentemente do aspecto dos genitais externos, observam-se condutos genitais internos derivados de Wolff ou de Müller ou de ambos simultaneamente. As gônadas são mais freqüentemente disgenéticas (compostas apenas de tecido fibroso, sem elementos de linhagem germinativa nem capacidade de produção hormonal), ou ainda, apresentam-se como testículos imaturos ou rudimentares. Em 4% dos casos ocorre o desenvolvimento de gonadoblastoma uni - ou bilateral.

A nefropatia costuma estar presente no primeiro ano de vida e é progressiva. Há esclerose mesangial, geralmente difusa, espessamento da cápsula de Bowman e atrofia tubular generalizada. A insuficiência renal é a principal causa de óbito, que ocorre, em média, aos dois anos de idade. O tumor de Wilms está presente em 74% dos casos, sendo em geral unilateral (80%). Pode manifestar-se desde o período neonatal até por volta dos treze anos, mas é comum que seja detectado juntamente com a nefropatia. Há ainda outras anomalias congênicas associadas, particularmente malformações renais, em cerca de 10% dos casos (MACIEL-GUERRA & GUERRA JR., 2002b).

Em pacientes com a SDD, as mutações mais freqüentemente encontradas são do tipo “missense”, seja no exon 8 (2º. “zinc-finger”) ou no exon 9 (3º. “zinc-finger”), em locais que interferem com a interação dos produtos do gene *WT1* com seqüências “consenso” de DNA (JEANPIERRE *et al.*, 1998). LITTLE & WELLS (1997) constataram que a maioria dos pacientes 46,XY exibia anomalias gonadais, enquanto que a maioria das pacientes 46,XX exibia desenvolvimento ovariano normal. Segundo NACHTIGAL *et al.* (1998), essas observações permitem supor que as diferenças fenotípicas entre pacientes masculinos e femininos seriam dependentes da expressão mono-alélica do gene *WT1* normal, que seria insuficiente para a maturação testicular, mas adequada para o desenvolvimento ovariano.

O diagnóstico diferencial deve ser feito com a síndrome de genes contíguos WAGR, decorrente de deleção na região 11p13 e com a síndrome de Frasier, caracterizada por cariótipo 46,XY, genitais externos femininos, gônadas disgenéticas com alto risco de

desenvolvimento de gonadoblastoma, e glomerulopatia progressiva. Pacientes com síndrome de Frasier também apresentam mutações no *WT1* (Figura 8), porém, não se observa a presença de tumor de Wilms e a nefropatia é de aparecimento mais tardio. Discute-se se a SDD e a de Frasier seriam entidades distintas ou se fazem parte do mesmo espectro de anomalias (MACIEL-GUERRA & GUERRA JR., 2002a).

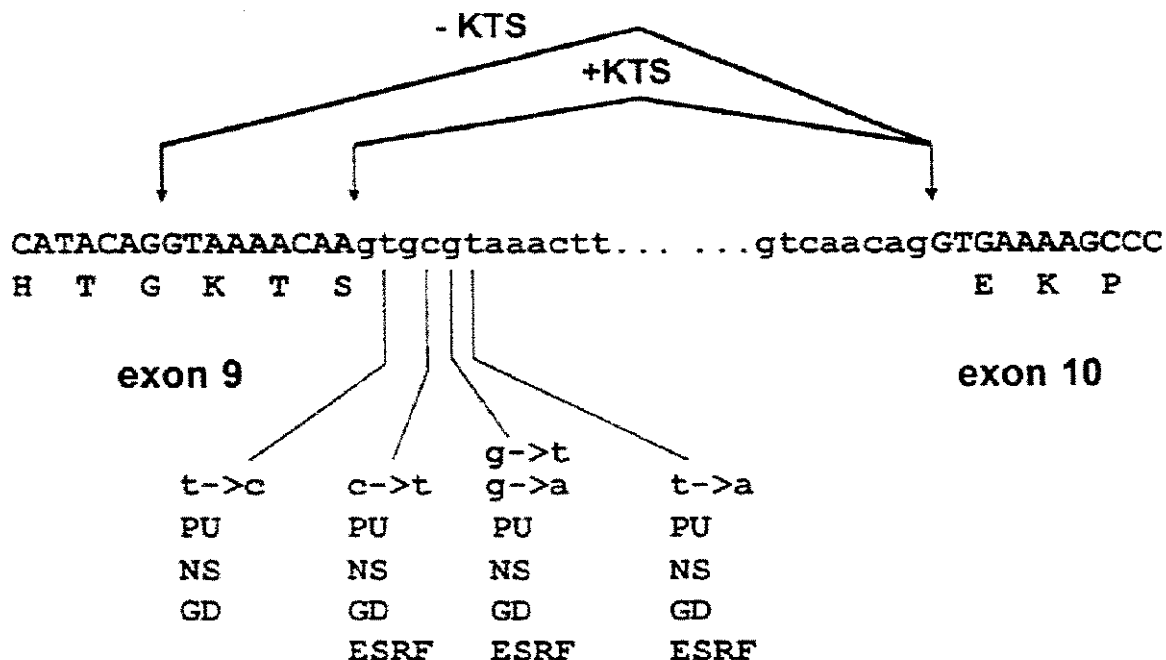


Figura 8- Mutações associadas com a síndrome de Frasier afetam o segundo *splicing* alternativo do sítio doador do éxon 9. (Adaptado de PARKER *et al*, 1999). PU – proteinúria; NS – síndrome nefrótica; GD – disgenesia gonadal; ESRF – estágio final de falha renal.

Como evidenciado acima, uma característica comum a essas síndromes é a incidência elevada de malformações genitourinárias. Embora os defeitos no desenvolvimento gonadal e do trato reprodutivo possam variar amplamente nesses pacientes, a maioria das mulheres 46,XX é fenotipicamente normal, enquanto que a maioria dos indivíduos 46,XY exibe ambigüidade genital ou sexo reverso (NACHTIGAL *et al.*, 1998).

As razões para a heterogeneidade de características clínicas em pacientes com mutações no *WT1* ainda são pouco compreendidas. Para contribuir para a elucidação do papel dessas mutações, sugere-se que o gene *WT1* seja analisado em pacientes que apresentem diferentes combinações de sinais e sintomas (JEANPIERRE *et al.*, 1998). Dentro dessa linha de investigação, além das síndromes acima mencionadas, já foram descritas mutações em pacientes do sexo masculino com criptorquidia e (ou) hipospadias e (ou) tumor de Wilms (NORDENSKÖLD *et al.*, 1995a, SCHUMACHER *et al.*, 1997; JEANPIERRE *et al.*, 1998), em pacientes com esclerose mesangial difusa isolada (JEANPIERRE *et al.*, 1998), estando, porém, ausentes em pacientes com disgenesia gonadal XY pura (NORDENSKÖLD *et al.*, 1995b).

FUQUA *et al.* (1996) propõem que as mutações no gene *WT1* possam resultar, após expressão do *SRY*, em anomalias na maturação das saliências gonadais com conseqüente retardo na formação do testículo, o que poderia resultar em disgenesia gonadal parcial e ambigüidade genital.

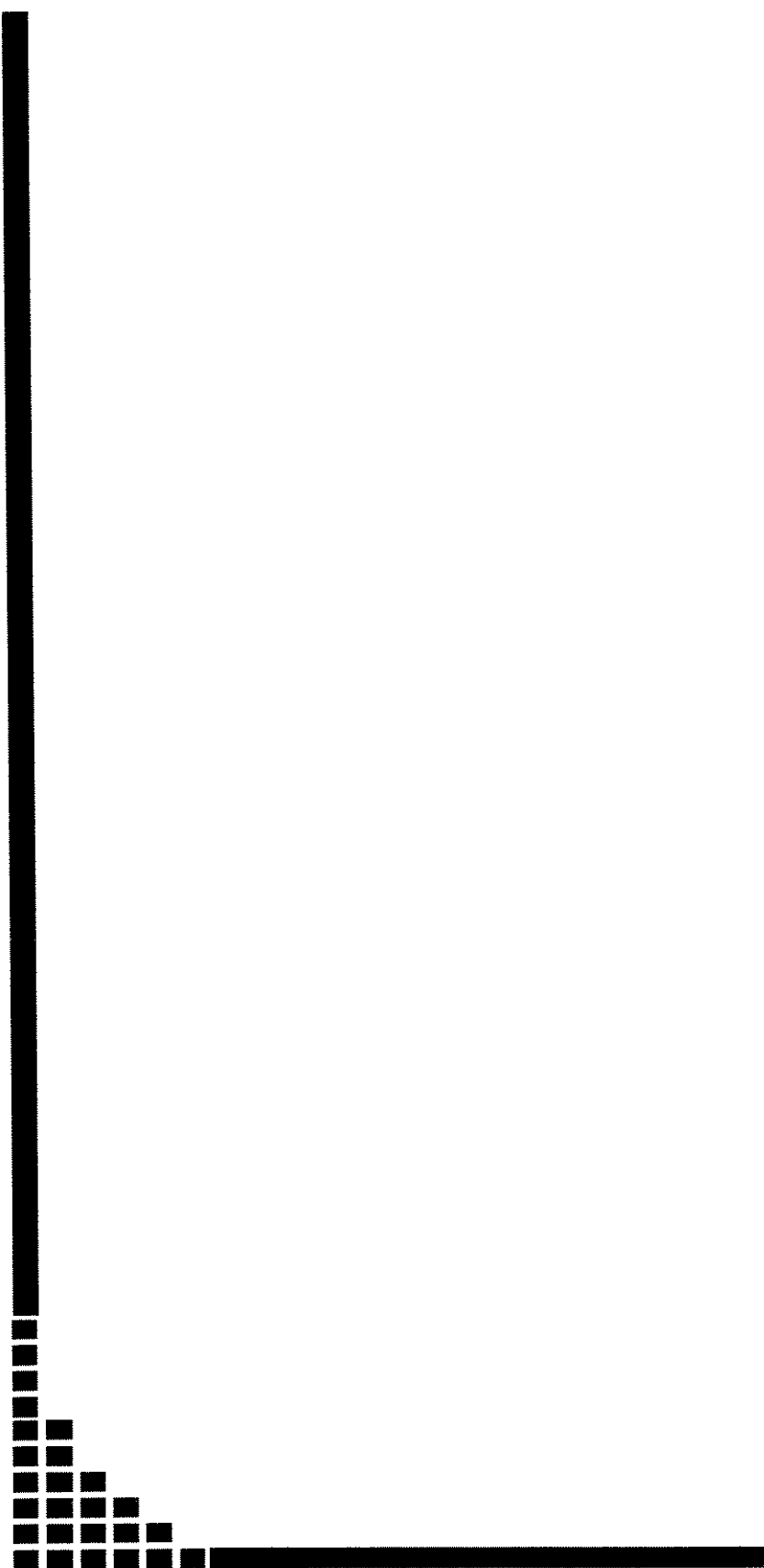


2- OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo geral avaliar se o gene *WT1* poderia estar envolvido na etiologia da disgenesia gonadal parcial, por meio da análise de seus éxons e regiões intrônicas adjacentes em uma amostra de pacientes com ambigüidade genital, disgenesia gonadal e cariótipo 46,XY.

Foram objetivos específicos:

1. identificar mutações do gene *WT1* e relacioná-las ao quadro clínico exibido pelos pacientes;
2. avaliar a eficiência da técnica de SSCP (single strand conformation polymorphism) no rastreamento de mutações ou polimorfismos no gene *WT1* e
3. avaliar a distribuição dos SNPs do gene *WT1* identificados nessa amostra de pacientes em relação à base de dados “SNP database”.



3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- CASUÍSTICA

O estudo do gene *WT1* foi realizado em 11 pacientes pré-púberes com ambigüidade genital e disgenesia gonadal parcial ou incompleta, sendo que dois receberam o diagnóstico clínico da SDD. Todos os pacientes apresentavam ambigüidade genital e derivados dos ductos de Müller, não exibindo sinais de síndrome de Turner. Esses pacientes são acompanhados no Ambulatório do Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo (GIEDDS) da FCM/UNICAMP, e fazem parte de um amplo estudo multidisciplinar de investigação das causas de ambigüidade genital.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP (Parecer 133/2000 Anexo I) e a investigação molecular foi realizada após consentimento livre e esclarecido dos responsáveis.

Os estudos citogenéticos foram realizados no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Genética Médica da FCM/UNICAMP e todos os pacientes apresentaram cariótipo 46,XY. A análise molecular do gene *SRY*, realizada em todos os pacientes por meio de seqüenciamento da região promotora e de sua ORF (“open reading frame”) não revelou mutações ou polimorfismos (ASSUMPÇÃO, 2002). A Tabela II apresenta os principais achados clínicos desses 11 pacientes. Todos foram examinados pelos Drs. MÁRCIA RIBEIRO SCOLFARO e GIL GUERRA JÚNIOR, que também realizaram as investigações hormonais e análises morfométricas e histológicas das gônadas (SCOLFARO, 2001; SCOLFARO *et al*, 2001; GUERRA JR., 2003) cujos resultados acham-se resumidos nas Tabelas III e IV.

Tabela II- Dados clínicos dos 11 pacientes com disgenesia gonadal parcial e ambigüidade genital (SCOLFARO, 2001).

Pacientes	Idade (meses)	Genitália Externa ¹	Posição das Gônadas(D/E) ²	Ducto de Muller	Ducto de Wolf	SUG ³
1	0,5	2	I/I	D+	D/E+	-
<u>2*</u>	<u>12</u>	<u>2</u>	<u>A/A</u>	<u>D/E+</u>	<u>D/E+</u>	
3	92	2	I/A	E+	D+	-
4	13	2	I/I	E+	D+	-
<u>5*</u>	<u>29</u>	<u>3</u>	<u>A/A</u>	<u>D/E+</u>	<u>D/E+</u>	<u>±</u>
6	44	3	I/A	E+	D+	+
7	0,5	3	I/I	E+	D+	+
8	10	2	I/I	D+	E+	-
9	78	2	I/(-)	D+	E+	-
10	20	2	A/A	E+	D+	-
11	20	4	I/A	E+	D+	+

1 = de acordo com a classificação de QUIGLEY *et al.* (1995) – Anexo 1

2 = D = Direito, E = Esquerdo, A = abdômen, I = canal inguinal, (-) = não localizada

3 = SUG = seio urogenital, (-) = ausente, (+) = presente

* = pacientes com diagnóstico de SDD

Conforme mencionado, dois pacientes receberam o diagnóstico de SDD. O paciente 2 foi encaminhado aos 12 meses de idade por apresentar insuficiência renal depois de retirada de tumor Wilms à esquerda. Permaneceu internado no HC-UNICAMP por 20 dias, evoluindo para óbito por falência de múltiplos órgãos e infecção hospitalar. A avaliação histológica renal da contra-lateral durante a necropsia demonstrou esclerose mesangial difusa. O paciente 5 foi diagnosticado aos 38 meses com disgenesia gonadal XY e ambigüidade genital, apresentando nessa época a função renal, urina tipo 1 e ultrasonografia abdominal normais. Aos 48 meses de idade desenvolveu tumor de Wilms à

esquerda, sendo tratado em outro serviço e depois re-encaminhado ao GIEDDS, mantendo função renal e urina tipo 1 normais, porém com cintilografia renal mostrando lesões cicatriciais no rim direito. Está há 5 anos em acompanhamento sem desenvolver qualquer outra doença.

Tabela III- Dados hormonais dos 11 pacientes com disgenesia gonadal parcial e ambigüidade genital (SCOLFARO, 2001).

Paciente	HAM ¹ (pmol/L)	TT ² (ng/mL)	β -hCG ³ (μ m/mL)	LH ⁴ (mU/mL)	FSH ⁵ (mU/mL)	DHEA ⁶ (ng/mL)	A- Δ 4 ⁷ (ng/mL)
1	25	<0,1	nr	2,5	6,9	<0,5	<0,1
<u>2*</u>	<u>56</u>	<u><0,1</u>	<u>nr</u>	<u>3,4</u>	<u>7,8</u>	<u><0,5</u>	<u><0,1</u>
3	113	0,3	nr	0,8	5,8	3	0,2
4	107	<0,1	196	0,5	1	2,6	<0,1
<u>5*</u>	<u>116</u>	<u>1</u>	<u>nr</u>	<u>0,3</u>	<u>0,7</u>	<u>1,9</u>	<u>0,3</u>
6	71	<0,1	365	0,9	0,9	<0,5	<0,1
7	98	0,6	nr	0,8	3,9	3,8	0,5
8	114	<0,1	351	1,1	1,4	<0,5	0,1
9	73	<0,1	301	1,0	6,3	<0,5	<0,1
10	91	<0,1	219	1,0	1,4	1,6	<0,1
11	11	<0,1	351	1,1	1,5	0,7	0,2

1- hormônio anti-Mülleriano (valores abaixo de – 2 desvios padrão, de acordo com REY *et al.*, 1999)

2- testosterona total (valor normal após 1 hCG>1,4 ng/mL)

3- fração beta da gonadotrofina coriônica (valor homem normal <25 mUI/mL)

4- hormônio luteinizante (valor normal basal pré-puberal 0,1 a 1,0 mUI/mL)

5- hormônio folículo estimulante (valor normal basal pré-puberal 0,1 a 1,4 mUI/mL)

6- dehidroepiandrosterona (valor normal basal pré-puberal 0,1 – 8,0 ng/mL)

7- androstenediona (valor normal pré-puberal 0,1 a 0,5 ng/mL)

* - pacientes com diagnóstico de SDD

Todos os pacientes apresentaram baixas concentrações de HAM e de testosterona, sem acúmulo de precursores (DHEA e A- Δ 4).

Tabela IV- Dados morfométricos e histológicos das gônadas dos 11 pacientes com disgenesia gonadal parcial e ambigüidade genital (SCOLFARO, 2001).

Pacientes	Idade ¹	Túbulos ²	DTM ³	GHT ⁴	IFT ⁵	GHG ⁶	NCS ⁷	HCS ⁸
1	10	D=104 E= -	51,2	Marcante em fita	14	Marcante em fita	31	(+)
2*	13	D=80 E=78	47,9 49,6	Marcante Marcante	16 17	Marcante Marcante	30 29	(+) (+)
3	108	D=99 E=(-)	59,5	Leve em fita	6	Grave em fita	29	(+) em fita
4	19	D=126 E=116	54 52,4	Marcante Marcante	68 166	Normal Normal	19 19	(+) (+)
5*	37	D=98 E=80	49,2 43,9	Marcante Marcante	0 10	Grave Grave	37 32	(+) (+)
6	51	D=66 E=(-)	64,1	Normal em fita	115	Normal em fita	24	(+) em fita
7	16	E=117	49,6	Marcante	10	Grave	29	(+)
8	16	D=102 E=101	46,8 49,1	Marcante Marcante	78 97	Normal Normal	23 24	(+) (+)
9	84	D=84	39,4	Grave	111	Normal	21	(+)
10	27	D=98 E=(-)	43,9	Marcante em fita		Grave em fita	18	Normal em fita
11	26	D=42 E=(-)	38,3	Grave em fita	50	Grave em fita	26	(+) em fita

1- idade em meses na época da biopsia gonadal

2- número de túbulos examinados: D=gônada direita, E=gônada esquerda, (-) = ausência de túbulos seminíferos

3- diâmetro tubular médio (µm)

4- gravidade da hipoplasia tubular de acordo com NISTAL & PANIAGUA (1996)

5- índice de fertilidade tubular (%)

6- gravidade da hipoplasia germinal de acordo com NISTAL & PANIAGUA (1996)

7- número de células de Sertoli por corte tubular

8- hiperplasia de células de Sertoli de acordo com NISTAL & PANIAGUA (1996). (+) = presente

* - pacientes com diagnóstico de SDD

Das 22 gônadas, 20 foram biopsiadas: 5 se mostraram “em fita” e as demais 15 com alterações sugestivas de disgenesia gonadal.

3.2- COLETA DE AMOSTRAS

A coleta de amostras de sangue dos pacientes foi realizada no ambulatório do GIEDDS/Pediatria no HC/UNICAMP. Foram coletados entre 5 a 10 ml de sangue periférico, em tubo estéril contendo EDTA a 10%.

3.3- EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO A PARTIR DE SANGUE PERIFÉRICO

A extração do DNA genômico a partir de sangue periférico foi realizada segundo protocolo padronizado no Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) UNICAMP, conforme descrito abaixo.

Ao sangue coletado, foram adicionados 35 ml de solução A. Após homogeneização, a mistura foi colocada no gelo por 30 minutos, para que as hemácias fossem lisadas. Centrifugou-se a 2.000 rpm por 10 minutos a 4°C, em centrífuga Beckman GPR, rotor horizontal GH-3.7. Retirou-se o sobrenadante e o “pellet” foi ressuspensionado novamente em 20 ml da solução A, agitou-se por inversão, centrifugou-se novamente por 15 minutos a 2.500 rpm e o sobrenadante foi desprezado. As etapas de lise e centrifugação foram repetidas várias vezes até o “pellet” passar da cor rosa para incolor.

Continuando o procedimento, ressuspendeu-se o “pellet” em 1 ml de solução B e adicionou-se 250 µl de solução C preparada na hora. Incubou-se em banho-maria a 37°C durante a noite. Após a incubação, tratou-se a solução com 1,25 ml de fenol saturado com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0, agitou-se por inversão por 5 minutos e centrifugou-se a 2.500 rpm por 10 minutos. Em seguida, retirou-se a camada aquosa e se repetiu a extração com fenol. Retirou-se a fase superior que, após a segunda extração com fenol, foi tratada com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1).

O DNA foi precipitado adicionando-se 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto. O precipitado de DNA foi retirado da solução com auxílio de um bastão e foi lavado com etanol 70% para eliminar o excesso de sal e recuperar o DNA. O DNA foi, então, dissolvido em quantidade apropriada (200-500 µl) de

TE1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1mM pH 8,0) e a concentração determinada por leitura de absorção óptica a 260 nm em espectrofotômetro.

Solução A:

Triton-X 1%

MgCl₂ 5 mM

Sacarose 0,32 M (109,5 g sacarose ultrapura/litro)

Tris-HCl 10 mM (pH 8,0)

Solução B: (2x concentrada)

Na₂EDTA 20 mM

NaCl 20 mM

Tris-HCl 20 mM (pH 8,0)

Solução C:

Para 1 ml = 0,5 ml de solução B, 1 mg de Proteinase K e 0,5 ml de SDS 10% (preparada na hora do uso).

Proteinase K (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany).

3.4- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Os dez éxons foram amplificados em reações independentes, utilizando-se nove pares de iniciadores (“primers”) que pareiam com as regiões intrônicas que flanqueiam os éxons 2 a 10, obtendo-se fragmentos de 262 a 318 pares de bases (pb). O éxon 1 foi inicialmente amplificado em toda sua extensão, sendo o produto de 656 pb submetido a reações de “nested” PCR para a produção de fragmentos menores, com tamanhos entre 278 e 397 pb. Na Tabela V estão descritas as seqüências e posições nucleotídicas dos “primers” utilizados dentro de cada fragmento. As seqüências dos “primers” basearam-se nas descritas na literatura por VARANASI *et al.* (1994). No entanto, com exceção dos éxons 2, 7, 8 e 9, foi necessário ajustar e modificar as condições de amplificação, em virtude de mudanças de algumas bases nas novas seqüências dos éxons do gene *WT1* depositadas no “Genbank” (Tabela V).

As reações foram realizadas em volumes de 50 µl contendo 200 a 500 ng de DNA genômico, 100 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pM de cada “primer”, uma unidade de *Taq* DNA polimerase em tampão Tris-HCl (pH 8,8) 10 mM e MgCl₂ a 1,5 mM. Cada fragmento foi amplificado com temperaturas e tempos ideais de anelamento e extensão.

Tabela V- Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados para a amplificação dos éxons do gene WT1 (S – sense; AS – antisense) e o número de acesso das sequências depositadas no “Genbank”.

Éxon	Sequências “primers” WT1 (5’-3’)	Nº Acesso	Tamanho do fragmento (pb)
1	WT1S – AgC CAg AgC AgC Agg gAg T (665-683)	X61631	278
	WT1AS – ACg ACC CgT AAg CCg AAg C (922-940)		
	WT1BS – ATg ggC TCC gAC gTg C (790-805)		215
	WT1BAS – ATg AAg gAg TgA ggC gg (988-1004)		
	WT1CS – TTC ggC TTA Cgg gTC gTT gg (924-943)		397
	WT1CAS – CAA AAg ggg TAg gAg Agg gg (1301-1320)		
2	WT2 S - CCg TCT TgC gAg AgC ACC (3-20)	M80218	262
	WT2 AS - CTA ATT TgC TgT ggg TTA gg (245-264)		
3	WT3 S - gCT CAg gAT CTC gTg TCT CC (5-24)	M80219	318
	WT3 AS - gCC TCC AAg ACC CAg CAT (305-322)		
4	WT4 S - CAg TTg TgT ATT ATT TTg Tgg (235-255)	X61633	285
	WT4 AS - AAC TAg ggg AAg gAg gAA A (502-520)		
5	WT5 S - CCA CTC CCC ACC TCT TC (190-206)	X61634	115
	WT5 AS - CgC CAT TTg CTT TgC C (290-305)		
6	WT6 S - CCT TTT TCC CTT CTT Tg (159-175)	X61635	179
	WT 6 AS - TAA gTA ggA AgA ggC AgT (320-337)		
7	WT7 S - gCT TAA AgC CTC CCT TC (157-173)	X61636	231
	WT7 AS - CTT gAA CCA TgT TTg CCC (370-387)		
8	WT8 S - gAg ATC CCC TTT TCC Ag (178-194)	X61637	177
	WT8 AS - CAC AgC TgC Cag CAA Tg (338-354)		
9	WT9 S - CTC ACT gTg CCC ACA TTg (868-885)	X61637	210
	WT9AS – CAA TTT CAT TCC ACA ATA g (1059-1077)		
10	WT10 S - ACT TCA CTC ggg CCT TgA TAg (149-169)	X61638	276
	WT10 AS - AgT ggA gAg TCA gAC TTg AAA g (403-424)		

A eficiência da reação foi verificada para cada par de “primers”, aplicando-se alíquotas de 5 µl da mesma, misturadas com azul de bromofenol (0,25% de azul de bromofenol e 50% glicose) em um gel de Agarose 1,5% e tampão Tris-Borato-EDTA ou TBE 1X (Tris Base a 0,089 M, ácido bórico a 0,089 M e EDTA a 0,002 M, em pH 8,0) e submetendo-as à eletroforese. O gel foi corado com brometo de etídeo (na concentração final de 0,5 µg/mL) e os fragmentos amplificados foram visualizados sob iluminação ultravioleta e documentados em filme Polaroid ou no sistema de fotodocumentação KODAK C-240.

3.5- DIGESTÃO ENZIMÁTICA

Para que análise de Polimorfismo de Conformação de Fitas Simples de DNA (SSCP) tivesse maior eficiência, o produto de PCR obtido por meio da utilização dos “primers” WT1CS e WT1CAS, com tamanho de 397 pb, foi digerido pela enzima de restrição *Pvu* II.

As digestões foram realizadas segundo o protocolo a seguir: 10 µL da reação de PCR; 16,75 µL de H₂O ultrapura, 3 µL de tampão 10X, específico da enzima, e 5 U da enzima *Pvu* II, em um volume final de reação de 30 µL. A tabela VI apresenta a posição do sítio de restrição, tempo e temperatura da digestão.

Tabela VI- Condições da digestão enzimática.

Enzima	Sítio de Corte (5→3')	Temp (°C)	Tempo (horas)	Tamanho dos fragmentos	Posição do corte
<i>Pvu</i> II	CAg/CTg	37	2	273/124	273

3.6- ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE CONFORMAÇÃO DE FITAS SIMPLES DE DNA (SSCP)

Esse método foi escolhido para realizar o rastreamento das regiões amplificadas dos éxons do gene *WT1*, tendo em vista tratar-se de um procedimento relativamente simples e de baixo custo para o rastreamento de alterações nucleotídicas, além da disponibilidade do equipamento Phastsystem (Pharmacia LKB) no laboratório.

A técnica tem como princípio que as fitas simples de DNA, obtidas pela desnaturação da dupla-fita de DNA, assumem conformações secundárias variáveis de acordo com sua sequência nucleotídica. A visualização dessas estruturas pode ser feita após eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante, pois em tais condições as fitas simples migram de acordo com a conformação determinada pelas suas sequências (ORITA *et al.*, 1989). Mutações de ponto, pequenas deleções ou SNPs podem modificar essas estruturas secundárias e alterar os padrões de migração por comparação com sequências controles.

As alíquotas, para serem aplicadas no gel de poliacrilamida, foram preparadas utilizando-se 3 µl dos produtos da reação PCR que foram misturadas com 3 a 6 µl de uma solução que continha formamida 95%, 20 mM de EDTA (pH 8,0) e 0,05% de azul de bromofenol, denominada “stop solution”. As amostras foram desnaturadas a 95°C por sete minutos e mantidas em gelo até o momento da sua aplicação, evitando a renaturação.

No presente estudo, a aplicação foi realizada em géis de poliacrilamida pré-moldados e não-desnaturantes de 12,5 e 20%, ambos da Pharmacia, e as eletroforeses foram realizadas no equipamento Phastsystem. Diversos protocolos foram testados, variando, além da concentração do gel, o tipo de tampão, a temperatura e a duração da corrida, para atingir as condições ideais de separação das fitas simples de DNA em cada fragmento. Ao término da eletroforese os géis foram corados com prata no próprio equipamento, segundo protocolo recomendado pelo fabricante, como mostrado na Tabela VII.

Tabela VII- Protocolo de coloração com prata.

Solução	Tempo (minutos)
Fixador (10% Álcool etílico e 0,5% Ácido acético)	1,5
Coloração (0,2% nitrato de prata, 10% Álcool etílico e 0,5% Ácido acético)	8
Água purificada em sistema MilliQ (Millipore)	2x 0,2
Revelador(3% de Hidróxido de sódio, 100 µL de formaldeído 37%)	5
Interruptor(10% Álcool etílico e 0,5% Ácido acético)	2
preservação (10% Glicerol)	5

Após a secagem dos géis à temperatura ambiente, realizou-se a análise visual do padrão de migração de bandas.

3.7- SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DA PCR

As reações de sequenciamento foram inicialmente realizadas para os produtos de PCR que apresentaram padrão de migração anômalo nos géis de SSCP, com o auxílio do “kit” “Thermosequenase radiolabeled terminator cycle sequencing” da Amersham Pharmacia, utilizando-se a marcação radiativa com [α - ^{33}P]-ddNTPs, segundo as recomendações do fabricante.

Subseqüentemente, para avaliar a eficiência da técnica de SSCP no rastreamento de mutações de ponto nesse grupo de pacientes foi necessário proceder-se ao sequenciamento de todos os fragmentos amplificados, que não exibiram diferenças de migração em relação ao controle.

As reações de sequenciamento foram preparadas para um volume final de 7,5 µL, contendo 0,5µL do tampão da reação, 0,5 pmol do “primer” (descritos na Tabela V), 0,5µL da enzima DNA polimerase Thermo Sequenase, 2µL de água ultrapura, 2µL de “terminator máster mix”, 0,5µL de ddNTP com marcação radioativa [α - ^{33}P] e 1,75µL do

produto de PCR. A reação de seqüenciamento foi realizada seguindo-se o protocolo do fabricante: 95°C por 30", temperatura de "annealing" ideal de cada "primer" (Tabela VIII) por 30", 72°C por 1' (40 ciclos). Ao término da reação foi adicionado 4µL de "stop solution" fornecido pelo fabricante do kit de seqüenciamento.

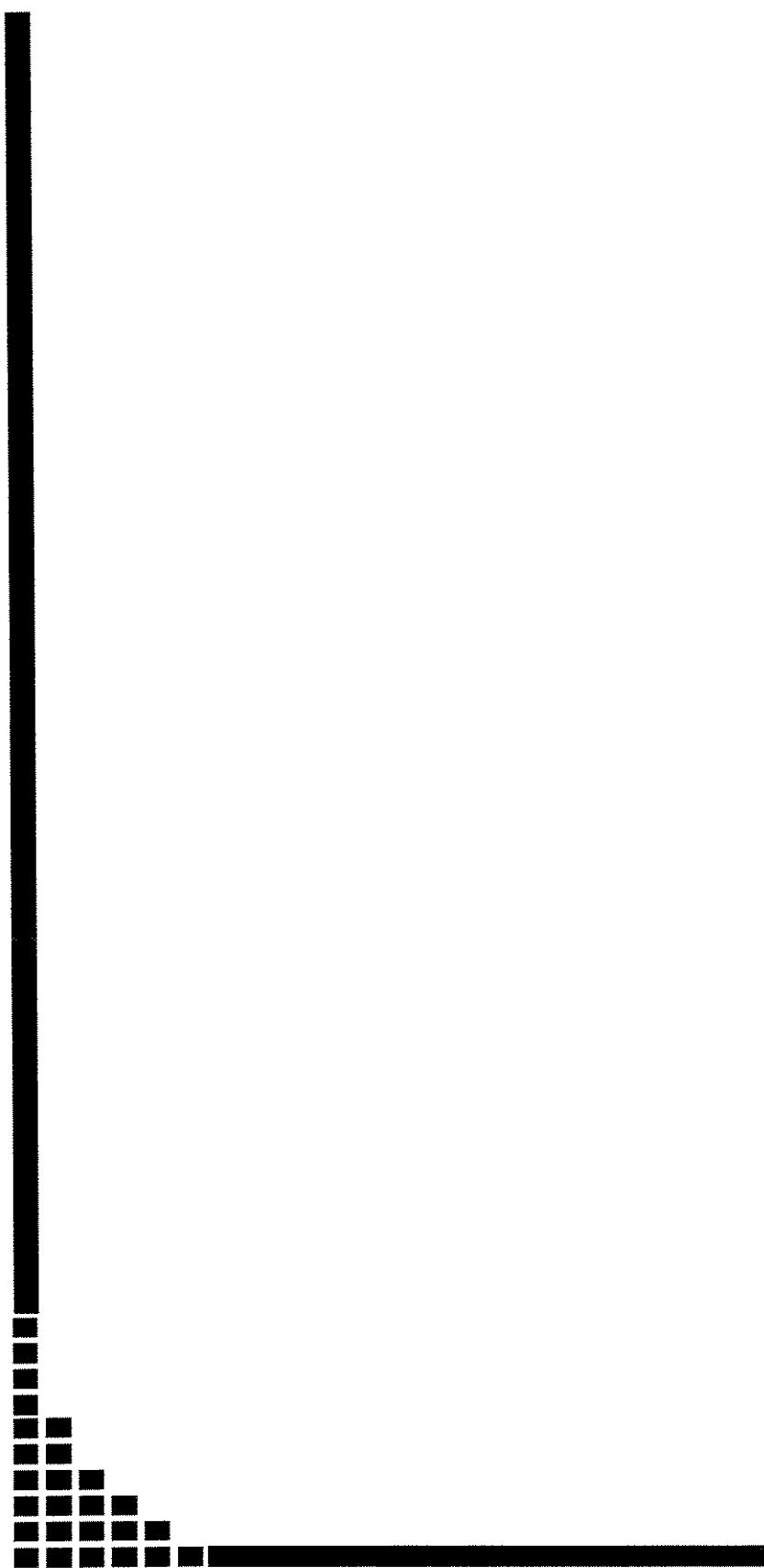
As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos, enquanto se fazia a pré-corrida do gel, para que a temperatura do gel atingisse 50°C aproximadamente. Foram aplicados 3µl de cada reação no gel, que foi então submetido a uma eletroforese nas seguintes condições: 1400V, 50W e 50mA. O tempo de corrida variou entre duas e seis horas, de acordo com o tamanho do fragmento seqüenciado. Ao final da corrida as placas foram separadas e o gel foi fixado numa mistura de metanol 10% e ácido acético 10% por 15 minutos. Foi então lavado em água corrente e colocado na estufa a 42°C para secagem. A seguir o gel foi exposto em um filme sensível (Kodak Biomax) por aproximadamente 3 dias, sendo subsequentemente revelado.

3.8- POLIMORFISMO *HINF* I EM 3'-UTR DO GENE *WT1*

Com a finalidade de avaliar a condição de heterozigose para esse polimorfismo, o que poderia contribuir para excluir a possibilidade de deleções na extremidade 3'-UTR, realizou-se a amplificação de um segmento de 952 pb utilizando os pares de primers 3'-UTR ('sense') – 5'- gCC Tgg AAg AgT Tgg TCT CT – 3' e 3'-UTR ("antisense") – 5' – ACA CAg TAA TTT CAA gCA ACg g – 3', descritos por HOBAN & KESLEY (1991), nas seguintes condições:

94°C por 5 minutos – pré-desnaturamento	1 ciclo
94°C por 1 minuto - desnaturação	} 30 ciclos
60°C por 1 minuto – "annealing"	
72°C por 1 minuto – extensão	
72°C por 5 minutos – extensão complementar	1 ciclo

O produto resultante da amplificação foi submetido à digestão com enzima *Hinf* I (G↓ANTC), que permite detectar dois padrões distintos de restrição, sendo possível visualizar bandas de 382, 292 e 40 pb, que são constantes em ambos os padrões. Em um dos padrões, é visualizada também a banda de 238 pb (Alelo 1) e no outro as bandas de 133 e 105 pb (Alelo 2).



4- RESULTADOS

4.1- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A padronização de cada par de “primers” foi individualmente testada até que fosse obtida a melhor condição de amplificação. As condições padronizadas nesse estudo foram:

94°C – 5 minutos (desnaturação do DNA)

94°C – 1 minuto (desnaturação do DNA)

Temperatura ideal de anelamento para cada par de “primers”

72°C – 1 minuto (polimerização da fita de DNA)

72°C – 10 minutos – (finalização da extensão das fitas de DNA)

} 35 ciclos

Durante a padronização da amplificação dos fragmentos para cada par de “primers”, constatou-se que não ocorria a amplificação das regiões compreendidas entre os pares WT1BS/WT1BAS e WT1CS/WT1CAS. Para solucionar o problema, tentou-se amplificar a região compreendida entre os “primers” WT1S e WT1CAS, obtendo-se um fragmento de 656 pb. Utilizando-se o produto dessa reação como DNA molde, foi possível amplificar especificamente as regiões compreendidas entre os pares WT1BS/WT1BAS e WT1CS/WT1CAS.

Após padronização das condições ideais de amplificação com o DNA controle, as amostras de DNA dos pacientes foram submetidas a PCR. Na Tabela VIII, são encontradas as temperaturas de anelamento e o tamanho dos produtos esperados para a amplificação de cada éxon.

Tabela VIII- Temperatura de anelamento e tamanho dos produtos de cada par de “primers”.

Exon		Temperatura de anelamento (°C)	Produto (pb)
1	1A	64	278
	1B	54	215
	1C	62	397
	2	58	262
	3	64	318
	4	56	285
	5	56	115
	6	52	179
	7	54	231
	8	56	177
	9	58	210
	10	62	276

Todos os fragmentos foram corretamente amplificados, para todos os pacientes.

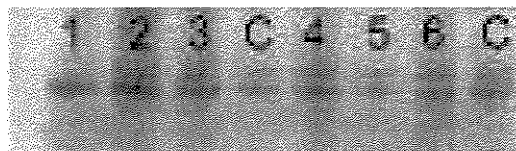
4.2- ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE CONFORMAÇÃO DE FITAS SIMPLES DE DNA (SSCP)

Depois da verificação da correta amplificação das amostras, estas tiveram seus produtos submetidos à técnica de SSCP para busca de mutação. As condições de eletroforese acham-se descritas na Tabela IX.

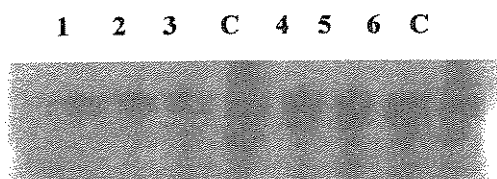
Tabela IX- Condições de SSCP para os fragmentos analisados

Gel de Poliacrilamida []	Tampão	Condições da eletroforese
12,5%	SDS	250 Vh, 2W, 5 mA e 5°C
20%	SDS	250 Vh, 2W, 5 mA e 10°C

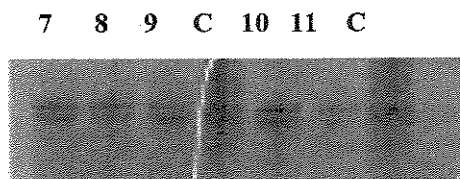
Em nenhuma das duas condições de eletroforese foram observadas discrepâncias quanto à migração dos alelos da amostra controle e os alelos dos pacientes testados para os fragmentos 1A, 1B e 1C do éxon 1 e para os éxons 2, 5, 6,7,8 e 10. Na figura 9, alguns dos resultados observados são apresentados.



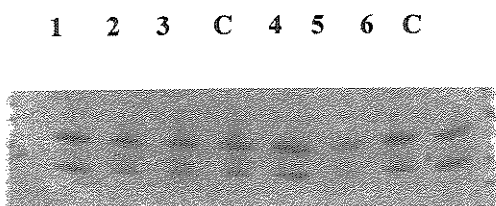
a) SSCP éxon 2 (gel de poliacrilamida à 20%)



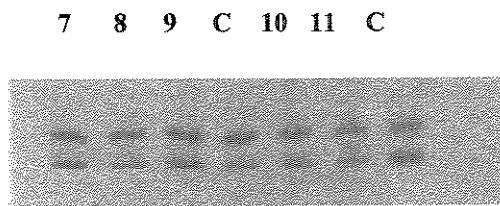
b): SSCP éxon 8 (gel de poliacrilamida à 20%)



c): SSCP éxon 8 (gel de poliacrilamida à 20%)



d) SSCP éxon 5 (gel de poliacrilamida à 20%)



e) SSCP éxon 5 (gel de poliacrilamida à 20%)

Figura 9- Exemplos de resultados da análise SSCP. Os algarismos arábicos de 1 a 11 referem-se aos pacientes e a alínea C ao controle.

Em relação ao éxon 3, não se obteve êxito na separação das fitas simples de DNA, apesar de numerosas tentativas. Assim, o seqüenciamento dessa região foi realizado para todos os pacientes, sendo seus resultados apresentados no próximo tópico.

Já no éxon 4 foram observados três padrões de migração: (**padrão 1**) quatro bandas distintas em controle e pacientes 1 e 6 ; (**padrão 2**) duas bandas mais altas nos pacientes 2, 3, 5 e (**padrão 3**) duas bandas mais baixas no paciente 4 (Figura 10). O paciente 7 apresentou o padrão 1, os pacientes 9 e 11 o padrão 2 e os pacientes 8 e 10 apresentaram o padrão 3 (resultados não mostrados).

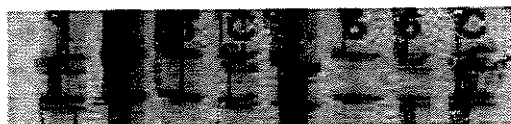


Figura 10- Resultados de SSCP do éxon 4 em gel de poliacrilamida à 12,5%: visualização de três padrões de migração dos produtos de amplificação. Pacientes de 1 a 6 e C (controle).

Em relação ao éxon 9, que concentra 92% das mutações observadas no gene *WT1*, seus produtos foram diretamente seqüenciados, para todos os pacientes estudados, sendo os resultados detalhados no próximo tópico.

A Tabela X apresenta resumidamente os resultados da análise por SSCP dos fragmentos amplificados, de todos os pacientes. Nossos dados indicaram que a técnica de SSCP apresentou baixa sensibilidade (33,3%) e pouca especificidade (78,2%).

Tabela X- Resultados observados no SSCP dos pacientes com Disgenesia Gonadal Parcial.

Pacientes	Éxons											
	1			2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1A	1B	1C									
1	-	-	-	-	X	1	-	-	-	-	NR	-
2	-	-	-	-	X	3	-	-	-	-	NR	-
3	-	-	-	-	X	3	-	-	-	-	NR	-
4	-	-	-	-	X	2	-	-	-	-	NR	-
5	-	-	-	-	X	3	-	-	-	-	NR	-
6	-	-	-	-	X	1	-	-	-	-	NR	-
7	-	-	-	-	X	1	-	-	-	-	NR	-
8	-	-	-	-	X	3	-	-	-	-	NR	-
9	-	-	-	-	X	2	-	-	-	-	NR	-
10	-	-	-	-	X	3	-	-	-	-	NR	-
11	-	-	-	-	X	2	-	-	-	-	NR	-
+ Presença de shift				- Migração normal			NR Não realizado			X Não padronizado		

1, 2 e 3 diferentes padrões observados

4.3- SEQÜENCIAMENTO

O seqüenciamento realizado no presente trabalho restringiu-se às regiões codificantes e as intrônicas adjacentes, com as quais os “primers” se pareavam.

A análise por seqüenciamento confirmou alguns resultados observados no SSCP, tais como a ausência de alterações nos éxons 2, 5, 6, 7, 8 e 10 e o polimorfismo observado no íntron 4, nas condições padronizadas. Outras alterações não detectadas pela técnica de SSCP foram identificadas.

Éxon 1

O seqüenciamento da região 1A permitiu encontrar uma alteração na sétima base que antecede o códon iniciador (ATG), alterando a base nucleotídica de T para G (-7T>G). Esta alteração foi observada nos pacientes: 1, 2 e 4, em homozigose. Nos demais pacientes observou-se a presença de uma base T em homozigose, em suas seqüências gênicas. Nessa região também foi encontrada uma substituição nucleotídica na posição 126, (126C>T), que não altera o aminoácido codificado (prolina). Os pacientes 2, 4, 7 e 11 apresentaram o genótipo T/T, sendo os demais C/C.

O seqüenciamento da região 1B revelou uma substituição de G por A na posição 163 (163G>A), que também não conduz à troca de aminoácido codificado (prolina). Os pacientes 1, 3, 5 e 8 apresentaram o genótipo A/A, sendo os demais G/G.

O seqüenciamento da região 1C não revelou nenhuma alteração nucleotídica, confirmando os resultados observados no SSCP.

Éxon 4/Íntron 4

A análise por seqüenciamento (Figura 11) permitiu interpretar os três padrões de migração observados no SSCP. A origem dessa variação foi localizada no íntron 4, na posição +85 (IVS4+85 A>G). Os pacientes 2, 3, 5, 9 e 11 são homozigotos para o nucleotídeo A, apresentando o **padrão 2** quando analisados no SSCP e os pacientes 4, 8 e 10 homozigotos para o nucleotídeo G (**padrão 3**) sendo os pacientes 1, 6 e 7 e o controle, heterozigotos A/G (**padrão 1**).

G A T C G A T C

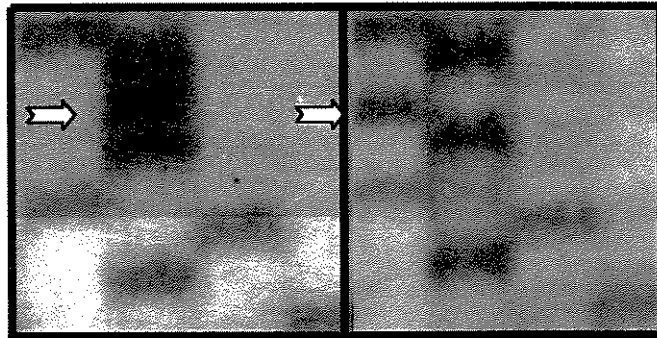


Figura 11- Polimorfismo do íntron 4 do gene *WT1*. À esquerda do observador, paciente homozigoto para A (adenina), e à direita do observador, paciente homozigoto para G (guanina).

Éxon 9

Como já foi mencionado anteriormente, foi feito o seqüenciamento direto dos produtos da amplificação do éxon 9, para todos os pacientes estudados. Foram feitas duas eletroforeses distintas para uma melhor separação das bases, uma com 3 horas e outra com 2 horas de duração nas seguintes condições: 1400V, 50W e 50mA. Em apenas um dos pacientes com SDD (paciente 2), o seqüenciamento revelou a existência de uma mutação de ponto 1186G>A em heterozigose (Figura 12 e Tabela XI), que leva à substituição de ácido aspártico por asparagina (D396N). Apesar de o éxon 9 ser o “hot spot” do gene *WT1*, nenhuma mutação foi observada nos demais pacientes.

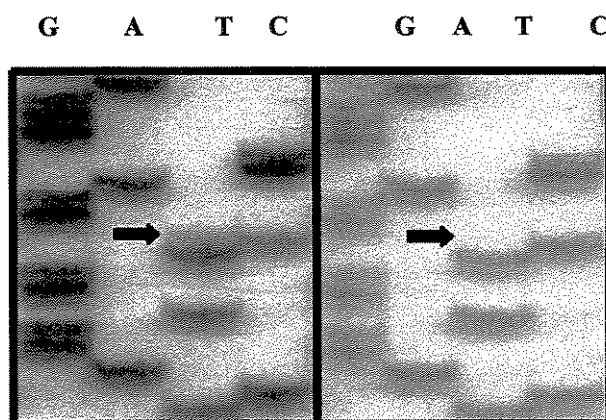


Figura 12- Mutação de ponto no éxon 9 (1186G>A). Sequenciamento da fita anti-sense. À esquerda paciente 2 com alteração em heterozigose e à direita paciente 4 com sequência normal.

Íntron 9/Éxon 10

O seqüenciamento do éxon 10 permitiu identificar uma alteração no íntron 9, na posição -49, na qual havia uma troca de nucleotídeo T para C (IVS9-49T>C). Os pacientes estudados apresentaram o seguinte genótipo:

- a) homozigotos T/T – pacientes 2, 5, 8,9 10, 11 e controle
- b) heterozigotos T/C – paciente 1
- c) homozigotos C/C – pacientes 3, 4, 6 e 7

O seqüenciamento dos éxons 2, 3, 5, 6, 7 e 8 não revelou nenhuma alteração. A tabela XI apresenta resumidamente os resultados obtidos no seqüenciamento dos pacientes estudados.

Tabela XI- Resultados observados no seqüenciamento para as regiões que apresentaram alterações em relação às seqüências depositadas no “Genbank” e genótipos dos polimorfismos nucleotídicos (SNPs) observados em regiões não codificantes.

Paciente	Éxon 1			INTRON 4	Éxon 9	INTRON 9
	-7	126	163	+85	1186	-49
1	G/G	-	G>A (Ho)	A/G	-	T/C
2	G/G	C>T (Ho)	-	A/A	G>A (He)	T/T
3	T/T	-	G>A (Ho)	A/A	-	C/C
4	G/G	C>T (Ho)	-	G/G	-	C/C
5	T/T	-	G>A (Ho)	A/A	-	T/T
6	T/T	-	-	A/G	-	C/C
7	T/T	C>T (Ho)	-	A/G	-	C/C
8	T/T	-	G>A (Ho)	G/G	-	T/T
9	T/T	-	-	A/G	-	T/T
10	T/T	-	-	G/G	-	T/T
11	T/T	C>T (Ho)	-	A/A	-	T/T
CONTROLE	T/T	-	-	A/G		T/T

He – Heterozigoto para a alteração

Ho – Homozigoto para a alteração

4.4- POLIMORFISMO *HINF* I EM 3'-UTR DO GENE *WT1*

Após a visualização das regiões amplificadas no tamanho esperado, para todos os pacientes (Figura 13a), os produtos foram submetidos a digestão pela enzima de restrição *Hinf* I (Figura 13b). Os resultados desse procedimento acham-se descritos na Tabela XII.

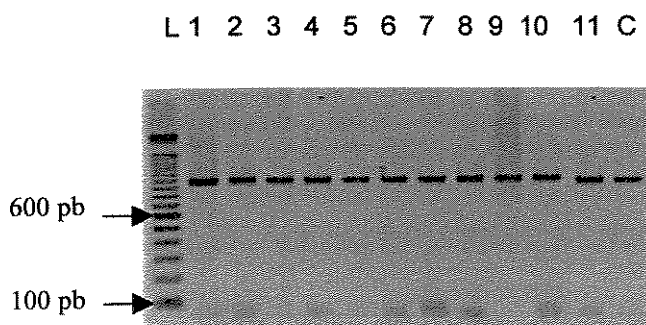


Figura 13a

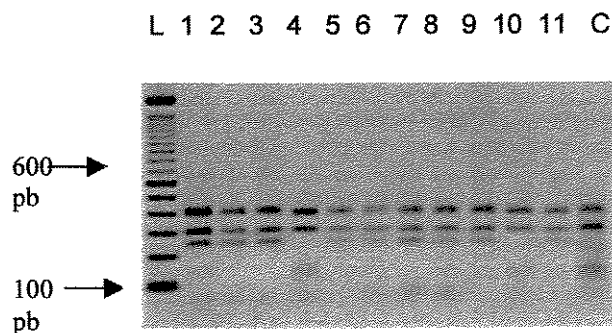


Figura 13b

Figura 13a-Visualização da amplificação da região 3'UTR nos pacientes com Disgenesia Gonadal Parcial e controle.

Figura 13b-Visualização da digestão dos produtos de PCR da região 3'UTR, com a enzima de restrição *Hinf* I.

L – marcador de 100 pb

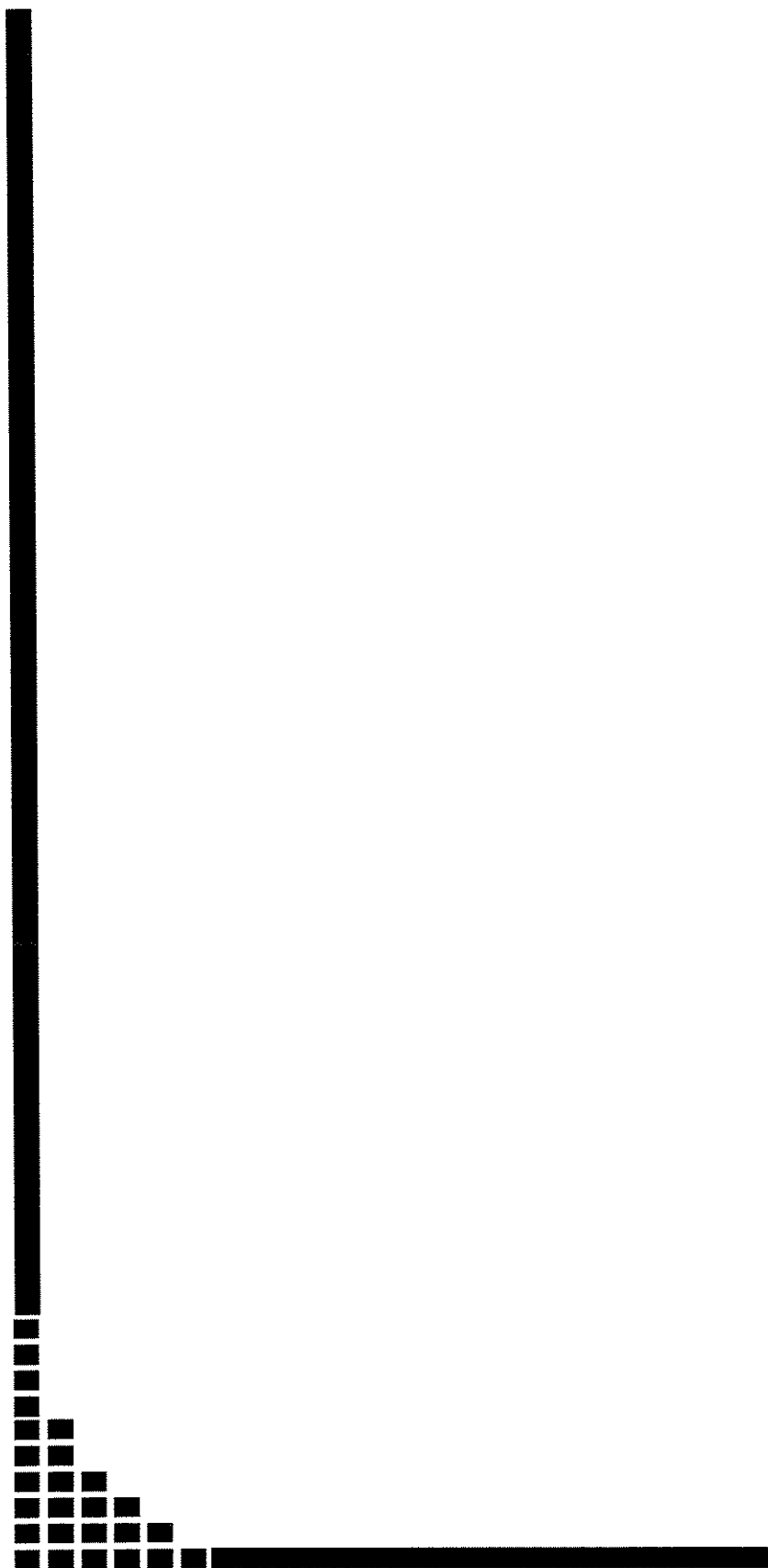
1 a 11 pacientes de 1 a 11 e C - controle

Tabela XII- Resultados do polimorfismo *Hinf* I em 3'-UTR em pacientes com Disgenesia Gonadal Parcial e controle.

Pacientes												
Alelos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	C
1	X	X	X	-	X	X	X	X	X	-	X	-
2	X	-	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X

Alelo 1 – visualização das bandas de 382, 292, 238 e 40 pb.

Alelo 2 – visualização das bandas de 382, 292, 133, 105 e 40 pb.



5- DISCUSSÃO

No presente estudo, em 11 pacientes nos quais foram pesquisadas alterações nucleotídicas no gene *WT1* que pudessem estar relacionadas a disgenesia gonadal parcial, apenas uma mutação de ponto, de efeito sabidamente deletério, foi detectada em um dos pacientes com SDD. Nos demais pacientes foram detectados polimorfismos que não podem, no presente momento, serem considerados causa do quadro clínico apresentado. A técnica de SSCP empregada no presente trabalho não foi satisfatória para o rastreamento das alterações moleculares identificadas por meio do seqüenciamento direto dos produtos de PCR.

5.1- MUTAÇÃO 1186G>A (D396N) EM PACIENTE COM SDD

Em pacientes com SDD, as mutações encontradas freqüentemente são do tipo “missense” e em heterozigose, ocorrendo nos éxon 8 e 9, que codificam respectivamente o 2º e 3º dedos de zinco, fazendo com que a proteína produzida perca a sua habilidade de se ligar a seqüências consensos do DNA (JEANPIERRE *et al.*, 1998; AUBER *et al.*, 2003). LITTLE & WEELS (1997) constataram que a maioria dos pacientes 46,XY exibia anomalias gonadais, enquanto que a maioria das pacientes 46,XX apresentava desenvolvimento ovariano normal. Segundo NACHTIGAL *et al.* (1998), essas observações permitem supor que as diferenças fenotípicas entre pacientes masculinos e femininos seriam dependentes da expressão monoalélica do gene *WT1* normal, que seria insuficiente para a maturação testicular, mas adequada para o desenvolvimento ovariano. BAIRD *et al* (1992), sugerem que: (1) o gene *WT1* deve ter maior importância no desenvolvimento gonadal que dos rins, pois anormalidades genitais são mais freqüentes nos casos de disgenesia gonadal XY, (2) a presença de nefropatia é uma característica da SDD e (3) uma mesma mutação no gene *WT1* pode resultar no desenvolvimento ou não de tumor de Wilms, isto porque para a formação do tumor, a mutação presente deve estar em homozigose, além da possibilidade de haver a cooperação de outro gene.

A mutação de ponto encontrada no paciente 2 já foi descrita anteriormente em pacientes com SDD (PELLETIER *et al.*, 1991; BAIRD *et al.*, 1992). Na base de dados “Universal *WT1*-Mutation Database” (<http://www.umd.necker.fr:2003/>), essa substituição

de aa foi referida 12 vezes entre 184 mutações registradas, sendo a terceira mais freqüente. Do ponto de vista funcional, essa substituição de aa afeta o 3º “zinc finger”, diminuindo sua afinidade pelas seqüências-consenso reconhecidas pela proteína normal (BOREL *et al.*, 1996). Nesse caso, o fenótipo clínico de SDD poderia ser decorrente de redução na afinidade de ligação ao DNA pela proteína WT1 alterada, levando a uma condição similar à da haploinsuficiência.

No entanto, para PELLETIER *et al.* (1991), a SDD não é resultado de uma haploinsuficiência da expressão do *WT1* e sim de um efeito dominante negativo da mutação. Por outro lado, HOSSAIN & SAUNDERS (2001) contestam essa hipótese, argumentando que o efeito dominante negativo da proteína mutante levaria a uma condição nula do *WT1* durante a embriogênese. Essa situação é inviável em camundongos, sendo sugerido que o mesmo possa ocorrer em humanos. Por isso, o modelo proposto por HOSSAIN & SAUNDERS (2001) para a causa da SDD é a haploinsuficiência do *WT1*, causada por perda funcional de um dos alelos. Segundo esses últimos autores, essa diferença de interpretação é decorrente de diferentes resultados experimentais: o efeito dominante negativo é provavelmente um artefato da técnica *in vitro*, devido a uma grande quantidade de DNA do vetor de expressão contendo o gene *WT1* modificado.

Clinicamente, a SDD caracteriza-se pela associação de ambigüidade genital, tumor de Wilms e nefropatia congênita que pode levar a insuficiência renal (LITTLE & WELLS, 1997). A lesão renal é histologicamente definida como esclerose mesangial difusa (HABIB *et al.*, 1985). Em estudo retrospectivo no qual se avaliou a evolução clínica de 12 pacientes com doenças relacionadas a mutações no gene *WT1*, AUBER *et al.* (2003) observaram que nos pacientes com SDD: (1) a proteinúria ocorre muito precocemente, muitas vezes ainda no primeiro ano de vida; (2) a esclerose mesangial difusa era causa da doença renal terminal, e (3) mutações constitutivas em heterozigose nos “hot spots” dos éxons 8 e 9 estavam presentes nesses pacientes. Ao que tudo indica, mutações nesses éxons são extremamente deletérias em relação à função da proteína WT1. Com efeito, o paciente estudado no presente trabalho, no qual a mutação no éxon 9 foi detectada em heterozigose, faleceu aos seis meses de idade, com tumor de Wilms unilateral, insuficiência renal crônica e esclerose mesangial difusa contra-lateral.

No que diz respeito à evolução clínica de pacientes com mutações no gene *WT1*, em outras regiões que não os éxons 8 e 9, AUBER e *et al* (2003) observaram que tanto a proteinúria, como o estágio terminal de doença renal podem manifestar-se mais tardiamente (mutação no íntron 9 com características da síndrome de Frasier), ou mesmo não haver síndrome nefrótica (mutação no éxon 7). De todo modo, esses autores recomendam que a análise do *WT1* seja realizada quando da detecção de esclerose mesangial difusa por ocasião de biópsia renal, ou quando há manifestação precoce de síndrome nefrótica, especialmente em pacientes com genitália ambígua, tendo em vista o risco envolvido para tumor de Wilms.

Em relação ao segundo paciente da presente casuística com diagnóstico clínico de SDD (paciente 5), já no seu primeiro ano de vida diagnosticou-se tumor de Wilms no rim esquerdo e displasia renal mais pielonefrite crônica no direito, com diminuição da função glomerular. Como visto, não foram detectadas mutações de ponto nos éxons e regiões adjacentes analisadas. Situação semelhante foi descrita por BAIRD *et al.* (1992), que não identificaram qualquer mutação de ponto em um dos pacientes com SDD, apesar de terem realizado o seqüenciamento completo do gene, à exceção da região promotora na extremidade 5'. A partir desses dados algumas possibilidades podem ser aventadas:

- 1) podem existir mutações na região promotora do gene *WT1* que alteram significativamente a taxa de transcrição;
- 2) podem existir mutações envolvendo os códons alternativos de tradução afetando a produção de diferentes isoformas;
- 3) pode haver uma haploinsuficiência por deleção parcial ou total do *WT1*, que poderia ser identificada por FISH (“Fluorescence in situ hybridization”); e
- 4) podem existir outro(s) gene(s) igualmente importante(s) que, quando alterado(s), pode(m) exercer uma forte influência no desenvolvimento gonadal.

No presente estudo não foi possível excluir nenhuma dessas possibilidades. A análise molecular do paciente 5 restringiu-se às regiões de éxons e introns adjacentes e, para todos os polimorfismos investigados (incluindo-se o polimorfismo *Hinf* I em 3'UTR), o genótipo foi homozigoto.

5.2- POLIMORFISMOS E MUTAÇÕES SILENCIOSAS

Como visto, a mutação 1186G>A foi à única em relação à qual se pôde atribuir a causa do fenótipo apresentado pelo paciente. Nos demais casos, as alterações nucleotídicas são mutações silenciosas que não levam a substituição do aminoácido codificado.

Por meio de consultas a base de dados "SNP data base", foi possível verificar quais das variações observadas no presente trabalho já estão confirmadas como SNPs. Assim, foi constatado que a variação G>T na posição -7 do primeiro códon ATG é um SNP, identificado nesse banco pelo código rs22345802. As frequências dos alelos "G" e "T" correspondem respectivamente a 0,722 e 0,278, na amostra analisada (90 indivíduos). É interessante notar que, no presente estudo, há uma frequência mais elevada do alelo "T" (0,727) na amostra de pacientes, havendo uma inversão da relação entre os alelos "G" e "T".

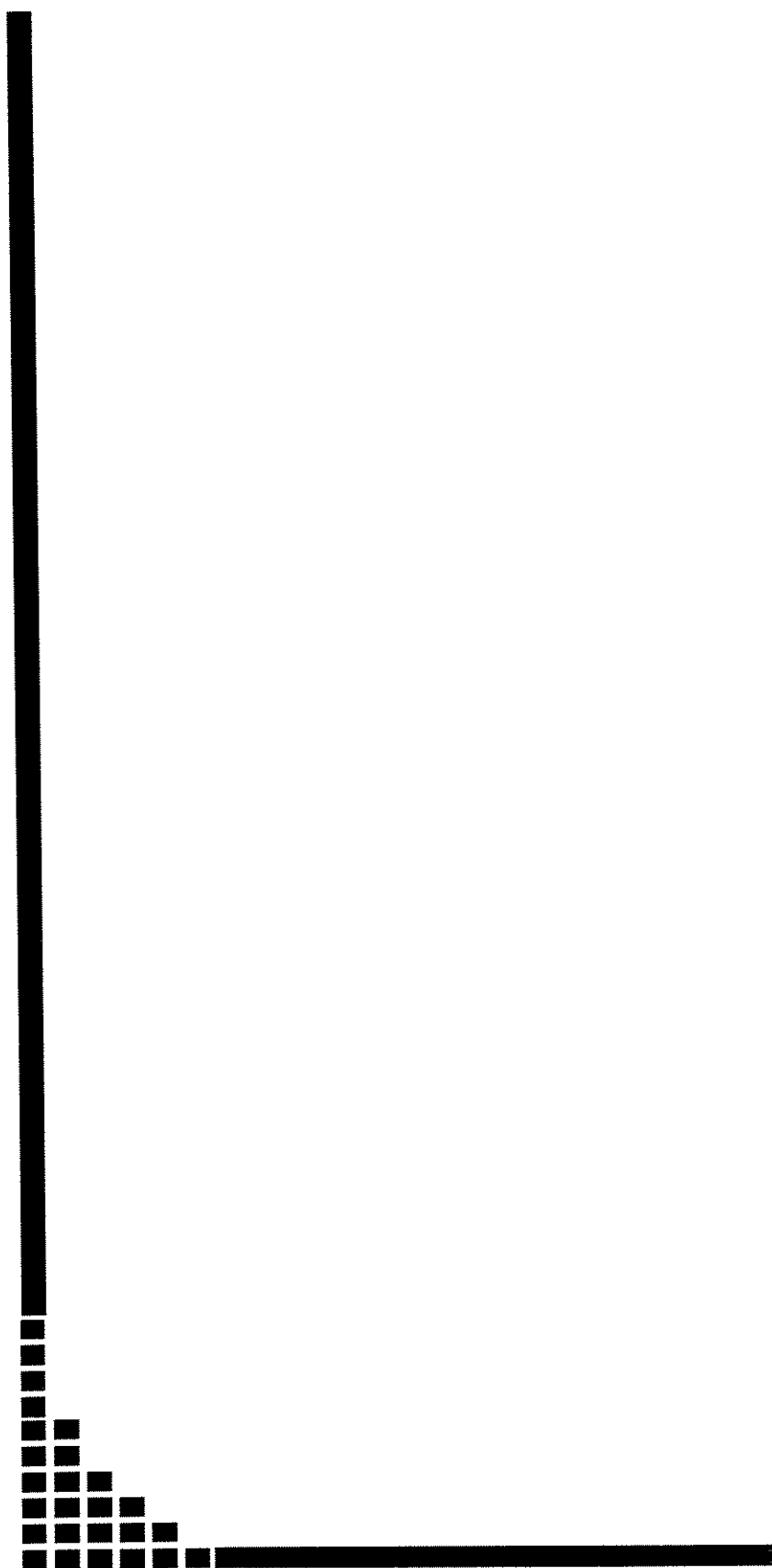
Verificou-se que a mutação silenciosa 126C>T (aminoácido prolina na posição 42), é um SNP (rs1799925) também já detectado e avaliado em 90 indivíduos. Nessa população as frequências dos alelos "C" e "T" correspondem respectivamente a 0,711 e 0,289. Na amostra de pacientes, as frequências encontradas foram de 0,637 e 0,363 para os alelos "C" e "T", respectivamente. De modo semelhante, a variação detectada no intron 9 (IVS-49T>C) é um SNP (rs1799937) com frequências alélicas estimadas em 0,55 para "T" e 0,45 para "C". Na presente amostra, foram observadas as frequências de 0,64 e 0,36 para os alelos "T" e "C", respectivamente.

Não foram encontrados SNPs correspondentes à mutação silenciosa 163G>A (aminoácido prolina na posição 54) no éxon 1, ou em relação à variação observada no íntron 4 (IVS+85A>G). Tendo em vista a variabilidade observada dentre os próprios pacientes, é provável que se tratem de novos SNPs. Esta questão poderá ser futuramente esclarecida por meio de estudo de uma população controle composta por pelo menos 50 indivíduos, seja por seqüenciamento direto do DNA, seja por meio de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) ou PCR-ASO (Polymerase Chain Reaction-Allele Specific Oligonucleotide).

5.3- EFICIÊNCIA DA TÉCNICA DE SSCP NO RASTREAMENTO DE ALTERAÇÕES NUCLEOTÍDICAS NO GENE *WT1*

Embora PELLETIER *et al.* (1991), indicassem a técnica de SSCP como o método mais adequado na busca de alterações no gene *WT1*, no presente estudo, a técnica de SSCP não foi eficiente para detectar todas as alterações observadas. Cabe observar que estes autores obtiveram uma boa eficiência no rastreamento de mutações para os éxons 8 e 9 em pacientes com SDD, especificamente. Dentre os 10 pacientes estudados, oito apresentaram alterações nos padrões de migração no éxon 9 e um, no éxon 8. Em apenas um dos pacientes, a técnica de SSCP falhou em detectar a mutação presente no éxon 9.

No presente estudo, avaliou-se a eficiência dessa técnica em pacientes com DGP considerando-se nove dos dez éxons do gene. A baixa sensibilidade observada (33,3%) não recomenda seu uso para o rastreamento de mutações ou polimorfismos do gene *WT1*, com os “primers” aqui utilizados.



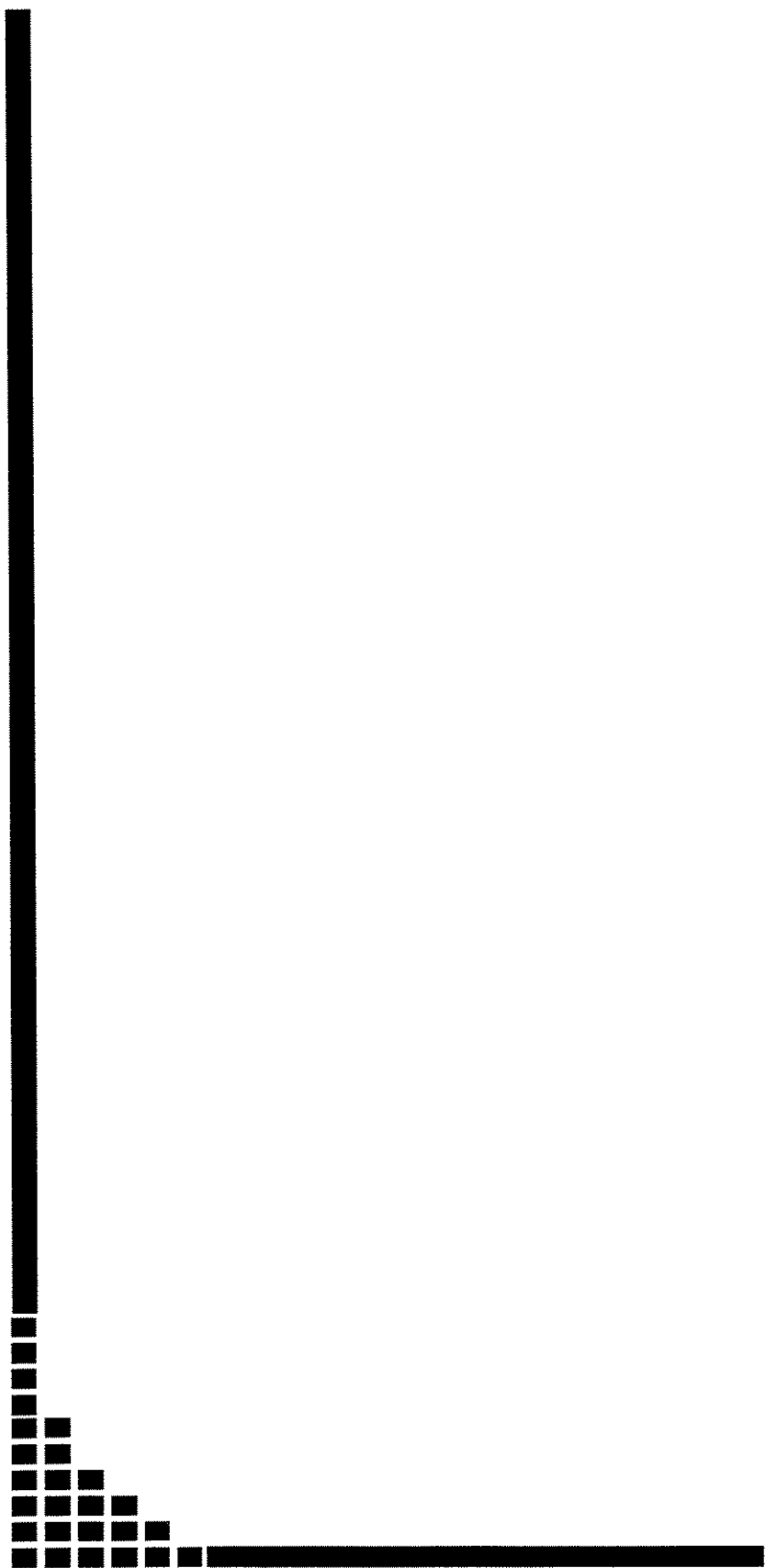
6- CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho indicam que não há envolvimento de mutações no gene *WT1* na etiologia da disgenesia gonadal parcial, na ausência de anomalias renais. No entanto, pela importância prognóstica relacionada à identificação de mutações do *WT1*, quando considerados os riscos para tumor de Wilms ou nefropatia, a investigação molecular desse gene deve ser recomendada para esses pacientes.

A mutação 1186G>A (D396N) detectada em um dos pacientes do presente estudo já foi descrita na literatura, sendo compatível com a manifestação fenotípica da síndrome de Denys-Drash.

Das cinco alterações nucleotídicas adicionais, três (G>T em -7ATG; 126C>T e IVS9-49T>C) já foram reconhecidas como SNPs. Quanto às outras duas, é possível que se tratem de novos SNPs tendo em vista a variabilidade observada entre os pacientes.

Os resultados observados permitem recomendar o uso de PCR seguida do seqüenciamento direto no estudo dos éxons do gene *WT1*, uma vez que a técnica de SSCP mostrou baixa sensibilidade para o rastreamento de alterações nucleotídicas, com os “primers” utilizados (exceção feita aos “primers” usados para amplificar o éxon 4).



***7- INFORMAÇÃO DE
BANCO DE DADOS
ELETRÔNICO***

Johns Hopkins Medicine

<http://www.hopkinsmedicine.org/pediatricendocrinology/intersex/sd2.html>

Acesso em 26 set 2003

Universal WT1-Mutation Database: banco de dados. Disponível em:

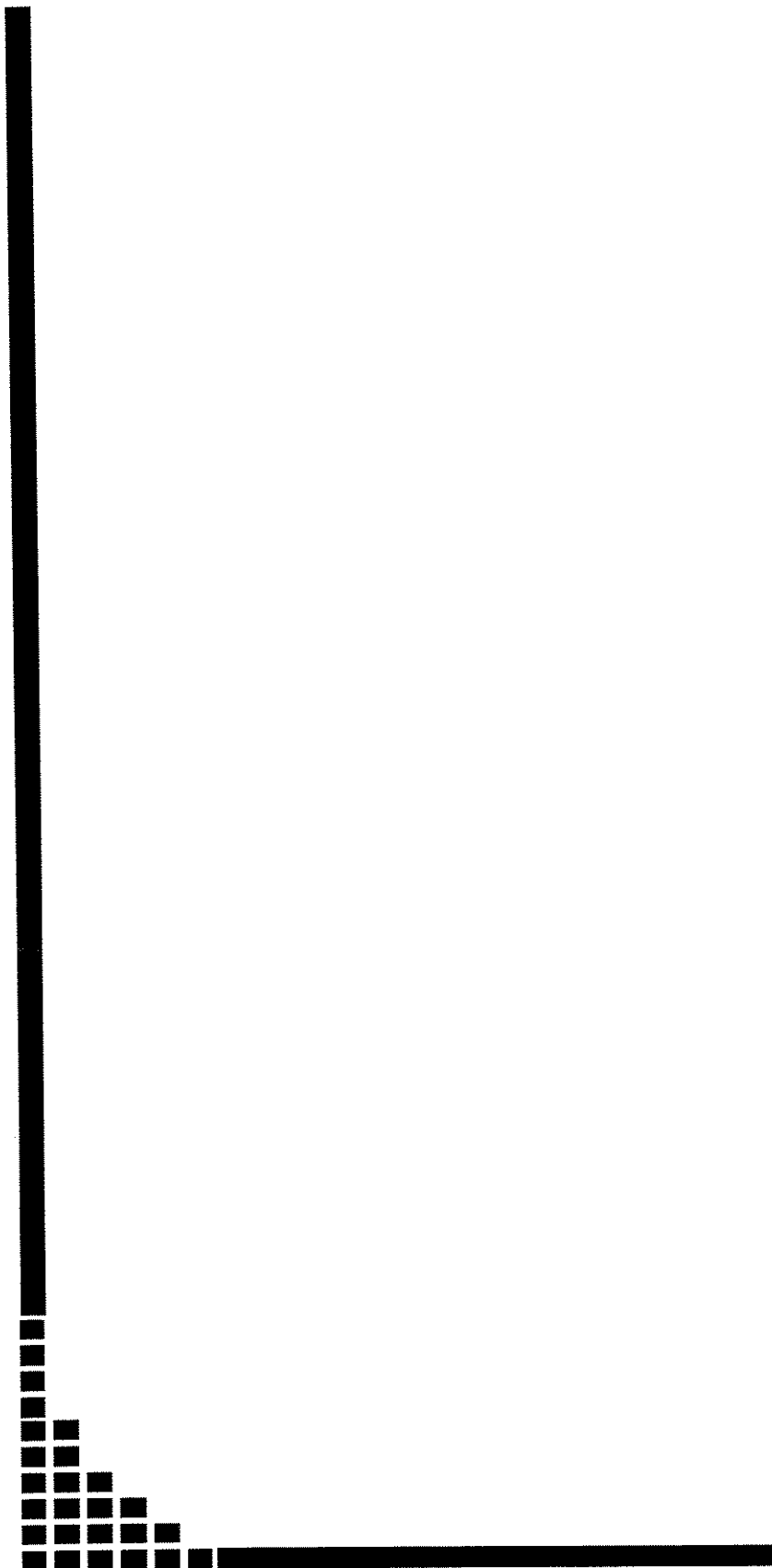
<http://www.umd.necker.fr:2003/>

Acesso em 25 mai 2003

SNP database: banco de dados. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>

Acesso em 20 jan 2004



8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITTOMAKI, K.; LUCENA, J. L.; PAKARINEN, P.; TAPANAIEN, J.; GROMOLL, J.; KASKIKARI, R. *et al.* Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*, 82(6): 959-68, 1995.

ASSUMPÇÃO, A. G. **Análise molecular dos gene *SRY* e *DMRT1* em pacientes com diagnóstico de disgenesia gonadal XY ou de hermafroditismo verdadeiro XY.** Campinas, 2002 (Tese – Doutorado – Universidade Estadual de Campinas).

AUBER, F.; LORTAT-JACOB, S.; SARNACKI, S.; JAUBERT, F.; SALOMON, R.; THIBAUD, E.; JEANPIERRE, C.; CIOU-FÉKÉTÉ, C. Surgical management and genotype/phenotype correlations in *WT1* gene-related diseases (Drahs, Frasier syndromes). *J Pediatr Surg*, 38(1):124-9, 2003.

BAIRD, P.N.; SANTOS, A.; GROVES, N.; JADRESIC, L.; COWELL, J.K. Constitutional mutations in the *WT1* gene in patients with Denys-Drash syndrome. *Hum Mol Genet*, 1(5): 301-5, 1992.

BERKOVITZ, G. D.; FECHENER, M. D.; ZACUR, H. W.; ROCK, J. A.; SNYDER III, M. D.; MIGEON, C. J.; PERLMAN, E. J. Clinical and pathologic spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis: its relevance to the understanding of sex differentiation. *Medicine*, 10:375-383, 1991.

BICKMORE, W. A., OGHENE, K., LITTLE, M.H., SEAWRIGHT, A., VAN HEYNIGEN, V.; HASTIE, N.D. Modulation of DNA binding specificity by alternative splice of the Wilms' tumour *wt1* transcript. *Science*, 257: 235-7, 1992.

BOREL, F.; BARILLA, K. C.; HAMILTON, T. B.; ISKANDAR, M.; ROMANIUK, P. J. Effects of Denys-Drash syndrome point mutations on the DNA binding activity of the Wilms' tumor suppressor protein WT1. *Biochemistry*, 35(37):12070-6, 1996.

BRUENING, W. & PELLETIER, J. A non-AUG translation initiation event generates novel WT1 isoforms. *J Biol Chem*, 271(15): 8646-54, 1996.

CALL, K. M.; GLASER, T.; ITO, C. Y.; BUCKLER, A. J.; PELLETIER, J.; HABER, D. A.; ROSE, E. A.; KRAL, A.; YEGER, H.; LEWIS, W. H.; JONES, C.; HOUSMAN, D. E. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, 60: 509-20, 1990.

DAVIES, R.; MOORE, A.; ANDREAS, A. S.; BRATT, E.; MIYAHAWA, K.; LADOMERY, M.; MILES, C.; MENKE, A.; VAN HEYNINGEN, V.; HASTIE, N. Multiples roles for the Wilms' tumor supressor, WT1. **Cancer Res**, (Suppl) 59,1747s-51s, 1999.

FUQUA, J.S., SHER, E.S.; PERLMAN, E.J.; URBAN, M.D.; GHahremani, M.; PELLETIER, J.; MIGEON, C. J.; BROWN, T. R.; BERKOVITZ, G. D. Abnormal gonadal differentiation in two subjects with ambiguous genitalia, mullerian structures, and normally developed testes: evidence for a defect in gonadal ridge development. **Hum Genet**, 97: 506-11, 1996.

GESSLER, M.; POUSTKA, A.; CAVENEE, W.; NEVE, R. L.; ORKIN, S. H.; BRUNS, G. A. P. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. **Nature**, 343: 774-778, 1990.

GOURLAY, W. A.; JOHNSON, H. W.; PANTZAR, J. T.; MCGILLIVRAY, B.; CRAWFORD, R.; NIELSEN, W. R. Gonadal tumors in disorders of sexual differentiation. **Urology**, 43(4):537-40,1994.

GUERRA JR., G. & MACIEL-GUERRA, A. T. Classificação dos Distúrbios da Diferenciação do Sexo: os conhecimentos em constante renovação. **Revista FCM**, VII(1): 103-24, 1999.

GUERRA JR., G. **Delineamento da Disgenesia Gonadal XY associada a ambigüidade genital em seus aspectos genéticos, clínicos, hormonais e histológicos**. Campinas, 2003 (Tese – Livre-docência – Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas).

HABER, D. A.; SOHN, R. L.; BUCKLER, A. J.; PELLETIER, J.; CALL, K. M.; HOUSMAN, D. E. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene *WT1*. **Genetics**, 88: 9618-22, 1991.

HABIB, R.; LOIRAT, C.; GUBLER, M.C.; NIAUDET, P.; BENSMAN, A.; LEVY, M.; BROYEY, M. The nephropaty associate with male pseudohermaphroditism and Wilms tumor (Drash syndrome): a distinctive glomerular lesion – report of 10 cases. **Clin Nephrol**, 24: 269-78, 1985.

- HEWITT, S. M.; FRAIZER, G. C.; WU, Y. J.; RAUSCHER, F. J. 3RD.; SAUNDERS, G. F. Differential function of Wilms' tumor gene WT1 splice isoforms in transcriptional regulation. **J Biol Chem**, 271(15):8588-92, 1996.
- HOBAN, P. R. & KELSEY, A.M. *Hinf* I polymorphism within the 3' untranslated region of the candidate Wilms tumour gene. **Nucl Acids Res**, 19:1164, 1991.
- HOSSAIN, A. & SAUNDERS, G.F. The Human Sex-determining gene SRY is a direct target of *WT1*. **J Biol Chem**, 18(20): 16817-23, 2001.
- IKEDA, Y.; LUO, X.; ABBUD, R.; NILSON, J. H.; PARKER, K.L. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. **Mol Endocrinol**, 9: 478-86, 1995.
- JEANPIERRE, C.; DENAMUR, E.; HENRY, I.; CABANIS, M. O.; LUCE, S.; CECILLE, A.; ELION, J.; PEUCHMAR, M.; LOIRAT, C.; NIAUDET, P.; GUBLER, M. C.; JUNIEN, C. Identification of constitutional *WT1* mutations in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis, and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutation database. **Am J Hum Genet**, 62: 824-33, 1998.
- JOST, A.; VIGIER, B.; PREPIN, J.; PERCHELLET, J.P. Studies on sex differentiation in mammals. **Rec Prog Horm Res**, 29:1-41. 1973.
- KENT, J.; WHEATLEY, S. C.; ANDREWS, J. E.; SINCLAIR, A. H.; KOOPMAN, P. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. **Development**, 122: 2813-22, 1996.
- KREIDBERG, J. A.; SARIOLA, H.; LORING, J. M.; MAEDA, M.; PELLETIE, R. J.; HOUSMAN, D.; JAENISCH, R. *WT1* is required for early kidney development. **Cell**, 74: 679-91, 1993.
- LAITY, J. H.; DYSON, H. J.; WRIGHT, P. E. Molecular basis for modulation of biological function by alternative splicing of the Wilms' tumor suppressor protein. **Proc Nat. Acad Sci USA**, 97(22): 11932-35, 2000.

- LARSSON, S., CHARLIEU, J. P., MIYAGAWA, K., ENGELKAMP, D., RASSOULZADEGAN, M., ROSS, A., CRUZIN, F., VAN HEYNINGEN, V.; HASTIE, N.D. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell*, 81: 391-401, 1995.
- LITTLE M & WELLS . A clinical overview of *WT1* gene mutations. *Hum Mut*, 9: 209-25, 1997.
- LUKUSA, T.; FRYNS, J. P.; KLECZKOWSKA, A.; VAN DEN BERGHE, H. Role of gonadal dysgenesis in gonadoblastoma induction in 46, XY individuals. The Leuven experience in 46, XY pure gonadal dysgenesis and testicular feminization syndromes. *Genet Couns*, 2(1):9-16, 1991.
- LUO, X.; IKEDA, Y.; PARKER, K. L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77: 481-90, 1994.
- MACIEL-GUERRA, A. T. & GUERRA JR., G. Determinação e diferenciação sexuais normais. In: MACIEL-GUERRA, A. T. & GUERRA JR., G. **Menino ou Menina? Distúrbios da diferenciação do sexo**. Barueri: Manole, 2002a. p. 4-12.
- MACIEL-GUERRA, A. T. & GUERRA JR., G. Ambigüidade Genital: Classificação. In: MACIEL-GUERRA, A. T. & GUERRA JR., G. **Menino ou Menina? Distúrbios da diferenciação do sexo**. Barueri: Manole, 2002b. p. 31-6.
- MACIEL-GUERRA, A. T. & GUERRA JR., G. Outras disgenesias gonadais. In: MACIEL-GUERRA, A. T. & GUERRA JR., G. **Menino ou Menina? Distúrbios da diferenciação do sexo**. Barueri: Manole, 2002c. p. 45-52.
- MARQUES-DE-FARIA, A. P. Disgenesia gonadal mista. In: MACIEL-GUERRA, A. T. & GUERRA JR., G. **Menino ou Menina? Distúrbios da diferenciação do sexo**. Barueri: Manole, 2002a. p. 4-17.
- MARQUES-DE-FARIA, A. P. Disgenesias gonadais puras. In: MACIEL-GUERRA, A. T. & GUERRA JR., G. **Menino ou Menina? Distúrbios da diferenciação do sexo**. Barueri: Manole, 2002b. p. 299-302.

- MOORE, K. L. & PERSAUD, T. V. N. Início do desenvolvimento humano: Primeira semana. In: MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 6ª Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 15-42.
- MORRIS, J. F.; MADDEN, S. L.; TOURNAY, O. E.; COOK, D.M.; SUKHATME, V. P.; RAUSCHER, F. J. 3RD. Characterization of the zinc finger protein encoded by the WT1 Wilms' tumor locus. **Oncogene**, 6(12): 2339-48, 1991.
- MROWKA, C. & SCHEDL, A. Wilms tumor supressor gene *WT1*: From structure to renal pathophysiologic features. **J Am Soc Nephrol**, 11:S106-S115, 2000.
- NACHTIGAL, M. W.; HIROKAWA, Y.; ENYEART-VANHOUTEN, D. L.; FLANAGAN, J. N.; HAMMER, G. D.; INGRAHAM, H. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. **Cell**, 93: 445-54, 1998.
- NISTAL, M. & PANIAGUA, R. Non-neoplastic diseases of the testis. In: BOSTWICK DG & EBLE, JN (ed). **Urol Surg Pathol**. St. Louis, Mosby, 1996, pg 468-565.
- NORDENSKJÖLD, A.; FRIEDMAN, E.; SANDSTEDT, B.; SÖDERHÄLL, S.; ANVRET, M. Constitutional and somatic mutations in the *WT1* gene in Wilms tumor patients. **Int J Cancer**, 63: 516-22, 1995a.
- NORDENSKJOLD, A.; FRICKE, G.; ANVRET, M. Absence of mutations in the *WT1* gene in patients with XY gonadal dysgenesis. **Hum Genet**, 96: 102-4, 1995b.
- ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. **Genomics**, 5: 874-9, 1989.
- PARKER, K. L. & SCHIMMER B. P. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. **Endocr Rev**, 18: 361-77, 1997.
- PARKER, K. L.; SCHIMMER, B. P.; SCHEDEL, A. Genes essential for early events in gonadal development. **Cell Mol Life Sci**, 55: 831-8, 1999.

PELLETIER, J.; BRUENING, W.; KASHTAN, C. E.; MAUER, S. M.; MANIVEL, J.C.; STRIEGEL, J. E.; HOUGHTON, D. C.; JUNIEN, C.; HABIB, R.; FOUSER, L.; FINE, R. N.; SILVERMAN, B. L.; HABER, D. A.; HOUSMAN, D. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell*, 67: 437-47, 1991.

PRITCHARD-JONES, K.; FLEMING, S.; DAVIDSON, D.; BICKMORE, W.; PORTEOUS, D.; GOSDEN, C.; BARD, J.; BUCKLER, A.; PELLETIER, J.; HOUSMAN, D.; VANHEYNINGEN, V.; HASTIE, N. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature*, 346: 194-7, 1990.

QUIGLEY, C. A.; DE BELLIS, A.; MARSCHKE, K. B.; EL-AWADY, M. K.; WILSON, E. M.; FRENCH, F. S. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev*, 16(3):271-321, 1995.

RAUSCHER F J 3rd. The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *FASEB J*, 7(10):896-903, 1993.

REDDY, J. C. & LICHT, J. D. The WT1 Wilms' tumor suppressor gene: how much do we really know? *Biochim Biophys Acta*, 1287(1):1-28, 1996.

REY, R. A.; BELVILLE, C.; NIHOUL-FEKETE, C.; MICHEL-CALEMARD, L.; FOREST, M. G.; LAHLOU, N.; JAUBERT, F.; MOWSZOWICZ, I.; DAVID, M.; SAKA, N.; BOUVATTIER, C.; BERTRAND, A. M.; LECOINTRE, C.; SOSKIN, S.; CABROL, S.; CROSNIER, H.; LEGER, J.; LORTAT-JACOB, S.; NICOLINO, M.; RABL, W.; TOLEDO, S. P.; BAS, F.; GOMPEL, A.; CZERNICHOW, P.; JOSSO, N. Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum antimullerian hormone measurement. *J Clin Endocrinol Metab* 84(2):627-31, 1999.

SCHARNHORST, V.; DEKKER, P.; VAN DER EB, A. J.; JOCHEMSEN, A. G. Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. *J Biol Chem*. 274(33):23456-62, 1999.

SCHUMACHER, V.; SCHNEIDER, S.; FIGGE, A.; WILDHARDT, G.; HARMS, D.; SCHMIDT, D.; WEIRICH, A.; LUDWIG, R.; ROYER-POKORA, B. Correlation of germ-line mutations and two-hit inactivation of the *WT1* gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology. **Proc Nat. Acad Sci USA**, 94: 3972-7, 1997.

SCOLFARO, M.R. **Estudo Morfométrico Gonadal: Condição Necessária a Confirmação Histológica da Disgenesia Gonadal Parcial**. Campinas, 2001 (Tese – Doutorado – Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas).

SCOLFARO, M. R.; CARDINALLI, I. A.; STUCHI-PEREZ, E. G.; DE MELLO, M. P.; ASSUMPÇÃO, J. G.; BAPTISTA, M. T. M.; SILVA, J. M. B.; MACIEL-GUERRA, A. T.; GUERRA JR., G. Morphometry and histology of gonads from 13 children with dysgenetic male pseudohermaphroditism. **Arch Pathol Lab Med**, 125, 2001.

SCULY, R. E. Gonadoblastoma: a review of 74 cases. **Cancer**, 25: 1340-53, 1970.

SHARMA, P. M; BOWMAN M.; MADDEN, S. L., RAUSCHER, F.J. 3RD; SUKUMAR, S. RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, *WT1*. **Genes Dev.** 8(6): 720-731, 1994.

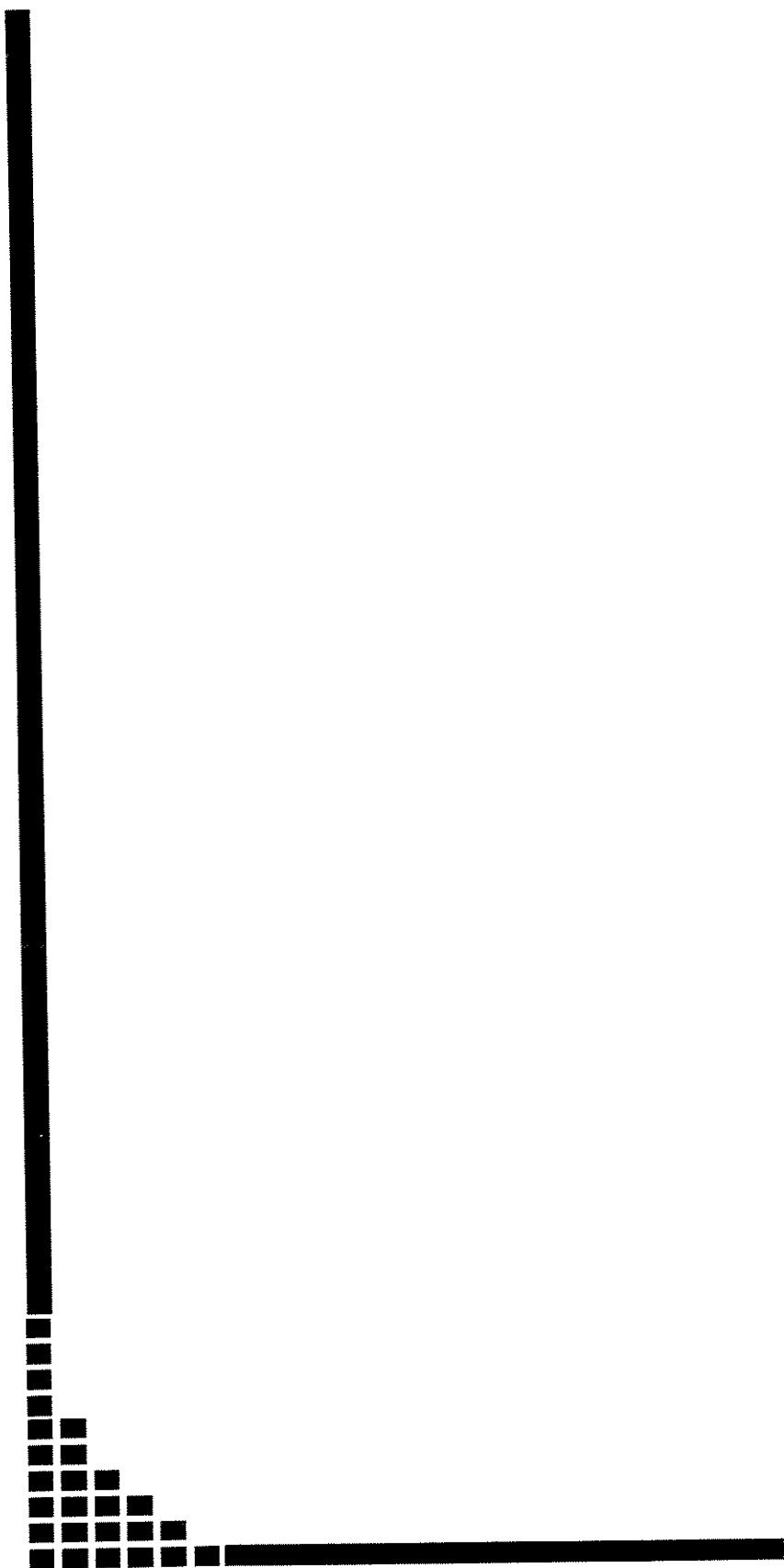
SINCLAIR, A. H.; BERTA, P.; PALMER, M. S.; HAWKINS, J. R.; GRIFFITHS, B. L.; SMITH, M. J.; FOSTER, J. W.; FRISCHAUF, A. M.; LOVELL-BADGE, R.; GOODFELLOW, P. N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif **Nature**, 346: 240-4, 1990.

SWAIN, A.; ZANARIA, E.; HACKER, A.; LOVELL-BADGE, R.; CAMERINO, G. Mouse Dax-1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal, hypothalamus function. **Nat Genet**, 12: 404-9, 1998.

TAKATA, A.; KIKUCHI, H.; FUKUZAWA, R.; ITO, S.; HONDA, M.; HATA, J-I. Constitutional *WT1* mutation correlate with clinical features in children with progressive nephropaty. **J Med Genet**, 37: 698-701, 2000.

VAINIO, S.; HEIKKILÄ, M.; KISPERT, A.; CHIN, N.; MACMAHON, A. P. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. **Nature**, 397: 405-9, 1999.

- VARANASI, R.; BARDEESY, N.; GHAHREMANI, M.; PETRUZZI, M-J.; NOWAK, N.; ADAM, MA; GRUNDY, P.; SHOWS, T. B.; PELLETIER, J. Fine structure analysis of the *WT1* gene in sporadic Wilms tumor. **Proc Nat Acad Sci**, 91: 3554-8, 1994.
- VERP, M. S. & SIMPSON, J. L. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. **Cancer Genet Cytogenet**, 25(2):191-218, 1987.
- WAGNER, K. D.; WAGNER, N.; SCHEDL, A. The complex life of WT1. **J Cell Sci**, 116(Pt 9):1653-8, 2003
- YU, R. N.; ITO, M.; SAUNDERS, T. L.; CAMPER, S.A.; JAMESON, J. L. Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. **Nat Genet**, 20:353-7, 1998.



9- *ANEXOS*

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☒ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas-S.P.

☎ 0 __ 19 7888936

fax 0 __ 19 7888925

☒ cep@head.fcm.unicamp.br

PARECER PROJETO Nº 133/2000

I - IDENTIFICAÇÃO

Título do projeto: "AVALIAÇÃO MOLECULAR DO GENE WT1 EM PACIENTES PRÉ-PÚBERES COM TESTÍCULOS DISGENÉTICOS"

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Christine Hackel

Data de Apresentação ao CEP: 14/04/2000

II - OBJETIVOS

O Projeto se propõe a estudar a frequência e a localização de mutações no gene WT1 em pacientes pré-púberes com pseudo-hermafroditismo disgenético e verificar se essas mutações podem resultar em anomalias na maturação gonadal, e ter como consequência a formação de testículos disgenéticos.

III - SUMÁRIO

O estudo deverá ser realizado em 14~~5~~ pacientes pré-púberes com pseudohermafroditismo masculino disgenético. Será extraído DNA de uma amostra de sangue periférico para averiguar a presença da mutação.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

A metodologia a ser adotada é sustentada pela literatura. As instalações da FCM são adequadas à execução desta pesquisa. O projeto tem o termo de consentimento e seu protocolo em conformidade com a Resolução 196/96

Anexo 1

V - PARECER DO CEP

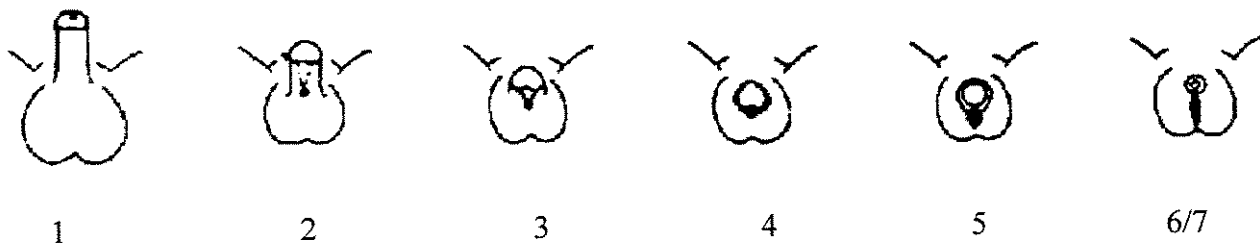
O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado os termos do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - DATA DA REUNIÃO

A ser homologado na VI Reunião Ordinária do CEP em 11 de julho de 2000


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 2. Ambiguidade genital segundo a classificação de Quigley *et al* (1995).



1. Fenótipo masculino normal.
2. Fenótipo masculino com hipospadia isolada.
3. Fenótipo masculino com grave defeito na virilização (micropênis, hipospadia perineoescrotal, escroto bífido e (ou) criptorquidismo).
4. Ambigüidade genital grave (falo semelhante a clitóris, pregas lábio-escrotais, orifício perineal único).
5. Fenótipo feminino com posterior fusão labial e clitoromegalia
- 6/7. Fenótipo feminino (grau 6 – presença de pêlos pubianos no adulto e grau 7 – ausência de pêlos pubianos no adulto).