



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

***JULIANA GABRIEL RIBEIRO DE ANDRADE***

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E CITOGENÉTICA MOLECULAR  
DAS DISGENESIAS GONADAIS PARCIAIS XY**

Campinas

2015

JULIANA GABRIEL RIBEIRO DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E CITOGENÉTICA MOLECULAR  
DAS DISGENESIAS GONADAIS PARCIAIS XY**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, na área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Andrea Trevas Maciel-Guerra**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
PELA ALUNA JULIANA GABRIEL RIBEIRO  
DE ANDRADE E ORIENTADA PELA  
PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> ANDREA TREVAS MACIEL-  
GUERRA,



Campinas

2015

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

An24a Andrade, Juliana Gabriel Ribeiro de, 1980-  
Avaliação clínica e citogenética molecular das disgenesias gonadais  
parciais XY / Juliana Gabriel Ribeiro de Andrade. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Andréa Trevas Maciel-Guerra.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Ciências Médicas.

1. Transtornos do desenvolvimento sexual. 2. Disgenesia gonadal. 3.  
Disgenesia gonadal 46 XY. 4. Análise citogenética. I. Maciel-Guerra, Andréa  
Trevas, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências  
Médicas. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Clinical and molecular cytogenetic evaluation of XY partial gonadal dysgenesis

**Palavras-chave em inglês:**

Disorders of sex development

Gonadal dysgenesis

Gonadal dysgenesis, 46,XY

Cytogenetic analysis

**Área de concentração:** Saúde da Criança e do Adolescente

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Andréa Trevas Maciel-Guerra [Orientador]

Isabella Lopes Monlleó

Ângela Maria Spinola-Castro

Sofia Helena Valente de Lemos-Marini

Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

**Data de defesa:** 25-08-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Saúde da Criança e do Adolescente

---

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

JULIANA GABRIEL RIBEIRO DE ANDRADE

---

Orientador (a) PROF(A) DR(A) ANDRÉA TREVAS MACIEL GUERRA

---

---

**MEMBROS:**

1. PROF(A). DR(A). ANDRÉA TREVAS MACIEL-GUERRA



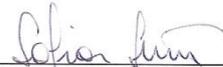
2. PROF(A). DR(A). ISABELLA LOPES MONLLEÓ



3. PROF(A). DR(A). ÂNGELA MARIA SPINOLA-CASTRO



4. PROF(A).DR(A). SOFIA HELENA VALENTE DE LEMOS MARINI



5. PROF(A).DR(A). VERA LÚCIA GIL DA SILVA LOPES



---

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

---

Data: 25 de agosto de 2015

---

## DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha família, em especial meu pai, minha mãe e meu irmão. Por todo o apoio emocional, psicológico, motivacional e financeiro... Sem eles, jamais teria sido possível vencer todos os obstáculos e chegar ao final desta corrida.

Dedico também a minha orientadora e meu chefe, que me possibilitaram a maravilhosa oportunidade de aprimoramento e ganho de conhecimento contínuos e que, após anos de trabalho e convivência, acabaram por se tornar meu “pai e mãe científicos”.

## AGRADECIMENTOS

*A continuação de uma jornada...*

Escrever a seção de agradecimentos nunca é fácil – revisitar sua trajetória, lembrar os erros e acertos, as perdas e vitórias... Momento de fazer o balanço de tudo o que foi (ou não) conquistado, das pessoas que fizeram parte da caminhada, de sentir saudade, arrependimento, gratidão, emoção... Mas acima de tudo, um momento de alegria, de sensação de dever cumprido!

A decisão de sair do Rio de Janeiro para morar em Campinas e fazer o Mestrado foi uma grande guinada. No entanto, continuar por aqui para fazer o Doutorado não estava nos planos... Se por um lado, foi uma continuação natural de um trabalho que começou – devido principalmente ao enorme apoio e carinho da equipe GIEDDS/UNICAMP; por outro foi uma triste surpresa para os que aguardavam ansiosamente meu retorno, na terra da Guanabara...

Ao longo destes cinco anos e meio (um pouco além do planejado, pelo tempo dedicado à confecção de projeto e ao estágio no exterior), muita coisa mudou e muitas pessoas tiveram papel importantíssimo. Tento resumir nestes agradecimentos e prestar homenagem àqueles que foram capítulos importantes desta parte da minha história.

À Dra. Sofia, que me permitiu fazer parte da equipe de Endocrinologia Pediátrica e me “adotou” como sua estagiária e, posteriormente, como colaboradora do serviço. Graças a essa experiência, foi possível obter o título de especialista na área onde atuo em termos de pesquisa...

À Dra. Lilia que, num dia de chuva onde ficamos presas (coincidentemente – *ou não?*) numa padaria, plantou a semente que me levou a querer desbravar o mundo e, mais uma vez, sair da minha zona de conforto; seu constante apoio e reforço positivo, também no papel de coordenadora da pós-graduação, foram importantíssimos nessa caminhada!

Aos outros docentes da UNICAMP, que com sua competência, seriedade e dedicação me inspiraram todos os dias a ser um profissional melhor, em especial Profs. Antônia Paula (da Genética) e Roberto (da Psicologia); e um agradecimento especial à Profa. Maricilda (CBMEG), que praticamente me adotou como aluna, permitiu minha constante “intrusão” no seu laboratório e, com toda paciência, me tirou muitas e muitas dúvidas moleculares.

À Dra. Cidinha da PUC-Campinas, que me deu a oportunidade de me tornar verdadeiramente professora e mais do que isso, que me ensinou dia após dia a lidar com os desafios da carreira docente.

À Dra. Maria Tereza que além de ter sempre acreditado na minha capacidade, me deu a oportunidade de trabalhar num lugar onde é possível fazer

a medicina que eu acredito (o Hospital Boldrini), além de aprender a difícil arte da preceptoria de residentes.

Aos meus colegas de pós: Guilherme e Georgette, pelo café nosso de cada dia, momentos onde nos apoiávamos e nos recarregávamos com a energia necessária para continuar a jornada; à Letícia por sua amizade e por ser fonte de inspiração com a sua competência e simplicidade; à Helena que além de colaboradora competente e aluna dedicada, acabou se tornando mais do que uma amiga – uma irmã – nas aventuras do doutorado-sanduíche!

Ao Tarcísio, meu professor da academia, treinador, amigo, consultor de vida e muitas vezes psicólogo, que me ensinou a me fortalecer (no corpo e na mente) e muitas vezes me ajudou a não cair diante dos desafios!

À equipe do CS Ipaussurama que apesar de não fazer mais parte do meu convívio diário atualmente, vai sempre morar no meu coração. Em especial Aninha, Ricardo, Priscila e Martha!

Aos grandes amigos que sempre estiveram presentes e aqueles que passaram a fazer parte da vida! Em especial: Renata, Flávia, Ana Lúcia, Monaliza, Fernandinha, Luciane, Odila: amo vocês! Luciana, Vanessa, Aline, Leonel e Wilon: vocês são minha família e moram no meu coração! Obrigada por tudo!

Aos tios, primos e toda a família! Apesar de longe sempre fizeram questão de participar de cada segundo e vibraram com cada passo! Sem a implicância de vocês a vida não teria a menor graça!

Aos colegas de trabalho e amigos que fiz na Alemanha! Meu orientador Olaf que me ensinou a olhar o mundo de uma outra maneira! À Louise, psicóloga do serviço, que me acolheu e me ajudou inclusive a ter um lugar para morar... ao Ralf, chefe do laboratório, que me adotou como filha! Ao Markus e a Bettina, colegas de laboratório, que tantas vezes nos alentavam quando as coisas não davam certo... E aos amigos que fiz na cidade e que ajudaram a amenizar a saudade de casa!

À Deus, que me possibilitou reencontrar minha fé no meio dessa trajetória louca... E à Vida, que além de ter me dado tantas oportunidades fantásticas e de ter me trazido tantas pessoas maravilhosas, permitiu que ao final de tudo isso eu ainda encontrasse o amor!

Apreendi com tudo isso que são as dificuldades que nos permitem o crescimento... Que são as mudanças, os desafios, que deixam a nossa história mais interessante... E que ampliar o horizonte nos permite enxergar o que há de mais belo na vida: as pessoas!

***OBRIGADA POR TUDO!***

## RESUMO

O diagnóstico diferencial entre as disgenesias gonadais parcial 46,XY (DGP) e mista (DGM) foi estabelecido inicialmente em termos histológicos, porém há diferenças clínicas e prognósticas em presença de mosaicismo com linhagem 45,X. Apesar disso, não há uniformidade na literatura médica quanto à classificação e diferenciação entre as duas condições. O objetivo deste trabalho foi analisar o quadro clínico e laboratorial de pacientes 46,XY com ambiguidade genital decorrente de disgenesia testicular com e sem linhagem 45,X e comparar essas condições em termos clínicos e de prognóstico. Para isso, foram levantados todos os casos de disgenesia testicular atendidos em nosso serviço de 1989 a 2013. Casos de DGP com suspeita de mosaicismo tiveram a análise citogenética aprofundada, incluindo a técnica de FISH; esta também foi empregada em pacientes com DGP ainda acompanhados no serviço. Os pacientes foram separados em dois grupos (com e sem linhagem 45,X), comparados em relação a histologia gonadal, anatomia genital interna e externa, função hormonal das gônadas, presença de distúrbios e doenças associadas, crescimento, puberdade e prognóstico de fertilidade. A casuística final consistiu de 61 pacientes, 25 com DGM e 36 com DGP. Os grupos não diferiram em relação à idade da primeira consulta, história gestacional e familiar, grau de virilização dos genitais externos, posição, histologia e função hormonal das gônadas, evolução puberal espontânea e necessidade de reposição hormonal, presença de comorbidades e prognóstico de fertilidade. Houve diferença significativa quanto ao sexo final (mais frequentemente feminino nas DGM), presença de útero (mais frequente nas DGM), idade materna mais avançada (nas DGP), menor peso e comprimento ao nascer (nas DGM) e presença de baixa estatura (mais frequente nas DGM). Portanto, DGP e DGM foram indistinguíveis em termos de histologia e função gonadal e características genitais, exceto a maior frequência de útero na DGM, que sugere disfunção mais grave das células de Sertoli. Diferiram, porém, em relação ao crescimento pré e pós-natal, em relação ao qual pacientes com DGM requerem medidas terapêuticas específicas. Assim sendo, a antiga classificação baseada na histologia deve ser abandonada em favor daquela baseada no cariótipo, e a

busca da linhagem 45,X deve ser aprofundada em todos os pacientes com disgenesia testicular 46,XY.

**Palavras-chave:** Distúrbios da diferenciação do sexo; Disgenesia gonadal; citogenética molecular; disgenesia testicular; disgenesia gonadal mista; seguimento de longo prazo.

## ABSTRACT

Differential diagnosis between XY partial (PGD) and mixed gonadal dysgenesis (MGD) was initially established by histological evaluation; however, when there is a 45,X lineage there are differences not only in clinical aspects but also in prognosis. Nonetheless, many present-day studies still refer to this old histological classification. The aim of this work was to analyze clinical and laboratorial picture of patients with genital ambiguity due to testicular dysgenesis, with and without a 45,X lineage, and compare these conditions in terms of phenotype and prognosis. We selected all patients with a diagnosis of testicular dysgenesis who were seen in our service between 1989 and 2013. Those with previous diagnosis of PGD who had a clinical suspicion of hidden mosaicism were subject to deeper cytogenetic analysis, including FISH; this technique was also employed to screen PGD patients who were still being followed at our service. The patients were then divided in two groups (with and without a 45,X cell line), which were compared in regard to gonadal histology, anatomy of external and internal genitalia, gonadal hormone function, presence of dysmorphic features and associated conditions; growth, puberty and fertility prognosis. Our sample included 61 patients, 25 with mosaicism (MGD) and 36 with an homogenous 46,XY karyotype (PGD). There were no differences between the groups in terms of age at the first visit, gestational and family history, degree of external virilization, position and histology of gonads, gonadal hormone function, spontaneous pubertal development and need for hormonal replacement, presence of associated conditions and fertility prognosis. There were significant difference regarding sex of rearing (more often female in MGD); presence of uterus (more common in MGD); higher maternal age (in PGD); lower birth weight and length (in MGD) and short stature (more frequent in MGD). Thus, PGD and MGD were indistinguishable in terms of gonadal histology and function and genital features, except for the higher frequency of uterus in MGD, which may indicate more severe dysfunction of Sertoli cells. They did differ in terms of pre and post-natal growth; in this regard, patients with MGD require specific therapeutic measures. Therefore, the old classification based on histological findings should be abandoned in favor of that based on chromosome constitution,

and screening for a 45,X lineage should be thorough in all patients with 46,XY testicular dysgenesis.

**Keywords:** Disorders of sex differentiation; gonadal dysgenesis; molecular cytogenetics; testicular dysgenesis; mixed gonadal dysgenesis; long-term follow-up.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: GENES ENVOLVIDOS NA DIFERENCIAÇÃO TESTICULAR. ADAPTADO DE MENDONÇA <i>ET AL</i> , 2000 (13).....	27
FIGURA 2: CLASSIFICAÇÃO DE PRADER – ADAPTADA DE OGILVY-STUART <i>ET AL</i> , 2004 (116). ....	50
FIGURA 3: CÁLCULO DO EMS (EXTERNAL GENITAL MASCULINIZATION SCORE) .....	50
FIGURA 4: FLUXOGRAMA DA CASUÍSTICA. ....	55
FIGURA 5: BOXPLOT DAS IDADES MATERNA E PATERNA AO NASCIMENTO (EM ANOS) SEGUNDO O TIPO DE DISGENESIA GONADAL. ....	61
FIGURA 6 : BOXPLOT DOS VALORES DE PESO (EM G) E COMPRIMENTO (EM CM) AO NASCER DOS PACIENTES NASCIDOS A TERMO SEGUNDO O TIPO DE DISGENESIA GONADAL. ....	62
FIGURA 7: DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM DISGENESIA GONADAL MISTA E PARCIAL SEGUNDO O ESTADIAMENTO DE PRADER. ....	65
FIGURA 8: LOCALIZAÇÃO DAS GÔNADAS SEGUNDO A LATERALIDADE (DIREITA OU ESQUERDA) NOS CASOS DE DISGENESIA GONADAL MISTA E PARCIAL E NOS DOIS GRUPOS ANALISADOS EM CONJUNTO. ...	66
FIGURA 9: BOXPLOT DOS VALORES DE FSH (EM MUI/ML), LH (EM MUI/ML) E TESTOSTERONA TOTAL (EM NG/ML) DURANTE O PERÍODO DE MINIPUBERDADE (30 A 180 DIAS) SEGUNDO O TIPO DE DISGENESIA GONADAL.....	69
FIGURA 10: BOXPLOT DOS VALORES DE FSH (EM MUI/ML), LH (EM MUI/ML) E TESTOSTERONA TOTAL (EM NG/ML) DE PACIENTES PÚBERES OU PÓS PÚBERES (ACIMA DE 15 ANOS DE IDADE) SEGUNDO O TIPO DE DISGENESIA GONADAL.....	71

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

### QUADROS:

QUADRO 1: NOVA CLASSIFICAÇÃO DOS DDS, SEGUNDO O CONSENSO DE CHICAGO. ....	23
QUADRO 2: CARACTERIZAÇÃO DOS DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO GONADAL. ....	25
QUADRO 3: CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS E MOLECULARES DOS 36 PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE DISGENESIA GONADAL PARCIAL XY.....	58
QUADRO 4: CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS E MOLECULARES DOS 25 PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE DISGENESIA GONADAL MISTA.....	59

### TABELAS:

TABELA 1:DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DOS PACIENTES INCLUÍDOS NA CASUÍSTICA.....	57
TABELA 2: IDADE DA PRIMEIRA CONSULTA POR DÉCADA DE NASCIMENTO .....	61
TABELA 3: DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM A IDADE MATERNA AO NASCIMENTO (ACIMA E ABAIXO DE 35 ANOS). ....	62
TABELA 4: DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM O PESO AO NASCER (ACIMA E ABAIXO DE 2500g). ....	63
TABELA 5: DADOS GERAIS E DE HISTÓRIA CLÍNICA.....	64
TABELA 6: PALPAÇÃO DE GÔNADAS SEGUNDO O TIPO DE DISGENESIA GONADAL.....	65
TABELA 7: LOCALIZAÇÃO DAS GÔNADAS SEGUNDO O TIPO DE DISGENESIA GONADAL. ....	66
TABELA 8: RESULTADOS DO EXAME ANATOMOPATOLÓGICO SEGUNDO O TIPO DE DISGENESIA GONADAL E A LATERALIDADE.....	67
TABELA 9: PRODUÇÃO DE FSH, LH E TESTOSTERONA TOTAL DURANTE O PERÍODO DE MINIPUBERDADE (30 A 180 DIAS) SEGUNDO O TIPO DE DISGENESIA GONADAL. ....	69
TABELA 10: PRODUÇÃO DE FSH, LH E TESTOSTERONA TOTAL DE PACIENTES PÚBERES OU PÓS PÚBERES (ACIMA DE 15 ANOS DE IDADE) SEGUNDO O TIPO DE DISGENESIA GONADAL.....	71
TABELA 11: DADOS DO ESPERMOGRAMA DOS PACIENTES. ....	72
TABELA 12: ANOMALIAS ASSOCIADAS .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

- CYP* – genes da família Citocromo P450
- DAX-1* – *DSS-AHC critical region on the X chromosome*;
- DDS – Distúrbios da Diferenciação Sexual;
- DDG – Distúrbios da diferenciação gonadal;
- DG – Disgenesia Gonadal;
- DHT – Diidrotestosterona;
- DMRT1* – gene *Doublesex- and MAB3-related transcription factor 1*
- DMRT2* – gene *Doublesex- and MAB3-related transcription factor 2*
- ESPE – Sociedade Europeia de Endocrinologia Pediátrica
- FCM – Faculdade de Ciências Médicas;
- FGF9* – gene *Fibroblast growth factor 9*
- FISH – *Fluorescent in situ hybridization* ou Híbridaçã *in situ* por fluorescência;
- FSH – Hormônio Folículo-estimulante;
- GIEDDS – Grupo Interdisciplinar de Estudo da Determinação e Diferenciação do Sexo;
- HAM – Hormônio Anti-Mulleriano;
- HC – Hospital das Clínicas;
- hCG – *Human Chorionic Gonadotropin* (Gonadotrofina coriônica humana)
- HMG-box – *high mobility group box*
- HSD3B2* – 3-beta Hidroxiesteroide Desidrogenase
- KTS – trinca de aminoácidos lisina, treonina e serina
- LH – Hormônio luteinizante;
- LHX9* – *Lim Homeobox Gene 9*;
- LWPES – Sociedade Norte-Americana de Endocrinologia Pediátrica  
Lawsons Wilkins
- MLPA – *Multiplex Ligationdependent Probe Amplification*
- MURCS – associação entre alterações do ducto de Muller, Renais e de coluna (somitos cervicais, no inglês: “*Cervicothoracic Somite dysplasia*”)
- NROB1* – gene *Nuclear Receptor subfamily 0, group B, member 1*

*NR5A1* – gene *Nuclear Receptor subfamily 5, group A, member 1*

OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*

*PAX6* – *Paired Box gene 6*

PHF – Pseudo-hermafroditismo feminino;

PHM – Pseudo-hermafroditismo masculino;

*RSPO1* – *R-spondin 1 gene*

SCOS - “*Sertoli-cell-only syndrome*”

SDD – Síndrome de Denys-Drash

SF – Síndrome de Frasier

SF1 – *steroidogenic factor 1*;

*SOX9* – *SRY homeobox 9*;

*SRY* – *sex-determining region in Y chromosome*;

*STAR* – *Steroidogenic Acute Regulatory Protein*

TDF – fator determinante testicular (no inglês: *Testis Determining Factor*);

UGT - “tecido gonadal indiferenciado” ou, no inglês “*undifferentiated gonadal tissue*”

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas;

WAGR – Síndrome clínica caracterizada por tumor de Wilms, Aniridia, anormalidades Genitourinárias e Retardo mental

WNT - família de genes que codificam proteínas de sinalização extracelular “*Wingless-type MMTV integration site Family*”;

*WNT4* - *Wingless-type MMTV integration site family 4*

*WT1* – *Wilm’s tumor 1 gene*.

# SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	5
AGRADECIMENTOS.....	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	12
LISTA DE QUADROS E TABELAS .....	13
LISTA DE ABREVIATURAS .....	14
SUMÁRIO .....	16
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
I.1  CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO DOS DDS.....	21
<i>I.1.1  Conceitos Básicos .....</i>	<i>21</i>
<i>I.1.2  Classificação dos DDS .....</i>	<i>22</i>
<i>I.1.3  Os Distúrbios da Diferenciação Gonadal.....</i>	<i>24</i>
I.2  COMPREENDENDO OS DDS: A DIFERENCIAÇÃO SEXUAL NORMAL .....	25
<i>I.2.1  Genes envolvidos na diferenciação gonadal .....</i>	<i>27</i>
I.3  AS DISGENESIAS GONADAIS 46,XY E 45,X/46,XY .....	31
<i>I.3.1  Disgenesia Gonadal Parcial XY.....</i>	<i>33</i>
<i>I.3.2  A Disgenesia Gonadal Mista.....</i>	<i>34</i>
<i>I.3.3  Aspectos Histológicos das disgenesias gonadais Mista e Parcial .....</i>	<i>35</i>
<i>I.3.4  Quando suspeitar de uma disgenesia testicular.....</i>	<i>39</i>
<i>I.3.5  O papel das técnicas moleculares e citogenéticas no diagnóstico diferencial</i> 40	
<b>II. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>42</b>
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
III.1  GERAL .....	43
III.2  ESPECÍFICOS.....	43
<b>IV. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
IV.1  TIPO DO ESTUDO.....	44

IV.2	LOCAL DO ESTUDO .....	44
IV.3	CASUÍSTICA.....	44
IV.4	METODOLOGIA .....	45
IV.4.1	<i>Ampliação da análise citogenética em pacientes com cariótipo 46,XY ...</i>	45
IV.4.2	<i>Análise clínica.....</i>	49
IV.4.3	<i>Análise estatística.....</i>	54
IV.4.4	<i>Aspectos Éticos e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</i>	54
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
V.1	DADOS GERAIS E HISTÓRIA CLÍNICA.....	60
V.2	EXAME CLÍNICO .....	64
V.3	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E CONDUTA CIRÚRGICA.....	67
V.4	FUNÇÃO GONADAL.....	68
V.4.1	<i>Concentrações Hormonais Iniciais.....</i>	68
V.4.2	<i>Função Gonadal dos pacientes criados no sexo masculino .....</i>	70
V.5	CRESCIMENTO.....	72
V.6	ANOMALIAS ASSOCIADAS .....	73
<b>VI.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>84</b>
<b>VIII.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>85</b>
<b>IX.</b>	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>97</b>
IX.1	APÊNDICE 1 - DADOS DOS 61 PACIENTES QUE COMPÕEM A AMOSTRA, REFERENTES A SEXO INICIAL E FINAL, CARACTERÍSTICAS GENITAIS E GONADAIS E AVALIAÇÃO HORMONAL INICIAL... 97	97
IX.2	APÊNDICE 2 - DADOS DOS 61 PACIENTES QUE COMPÕEM A AMOSTRA REFERENTES A ANTECEDENTES FAMILIARES E GESTACIONAIS..... 101	101
IX.3	APÊNDICE 3 - DADOS DOS 61 PACIENTES QUE COMPÕEM A AMOSTRA REFERENTES A GONAECTOMIA, AVALIAÇÃO HORMONAL FINAL E PUBERDADE. .... 104	104
IX.4	APÊNDICE 4 - DADOS DOS 61 PACIENTES QUE COMPÕEM A AMOSTRA REFERENTES A CRESCIMENTO, ATRASO DE DESENVOLVIMENTO MOTOR E(OU) DIFICULDADE ESCOLAR E ANOMALIAS ASSOCIADAS. 107	107
IX.5	APÊNDICE 5: ASPECTO HISTOLÓGICO DE <i>STREAKS</i> E TESTÍCULOS DISGENÉTICOS DE PACIENTES COM DG MISTA E PARCIAL DESTA AMOSTRA..... 110	110

<b>X.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>111</b>
X.1	ANEXO 1: FICHA DE COLETA DE DADOS .....	111
X.2	ANEXO 2: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) .....	113
X.3	ANEXO 3: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - PACIENTES.....	115

## I. INTRODUÇÃO

O cuidado de pacientes com ambiguidade genital passa por várias etapas, a começar pela identificação, muitas vezes ainda no berçário, da presença de ambiguidade genital; pela observação de outros sinais clínicos associados aos distúrbios da diferenciação sexual (DDS), passando pela abordagem diagnóstica específica, até chegar ao momento da definição do sexo de criação e prognóstico quanto à puberdade, fertilidade, risco de neoplasias gonadais, entre outros.

Esta abordagem, tanto diagnóstica quanto de tratamento, passou por vários momentos históricos. Até a década de 1990, o cuidado era centrado no papel do médico – em especial, do cirurgião; não havia abordagem multiprofissional, ainda não se conhecia o gene *SRY* e pouco se sabia sobre o prognóstico em longo prazo dos tratamentos realizados. No entanto, as últimas duas a três décadas foram palco de uma enorme evolução nas técnicas diagnósticas e no conhecimento dos genes envolvidos na diferenciação sexual. A última década, particularmente (depois da confecção do primeiro consenso para o diagnóstico e tratamento dos DDS), foi marcada por uma mudança na abordagem destes pacientes, não só com a inclusão de novos profissionais na equipe mínima (como psicólogos e assistentes sociais), mas também com mudança de postura em relação à escolha do sexo de criação, decisão que num primeiro momento passou a ser compartilhada com a família e, atualmente, pode ser postergada a ponto de em alguns países ser possível um registro civil “neutro”.

Ainda assim, esta etapa do cuidado – a definição do sexo, a indicação ou não de gonadectomia profilática, o estabelecimento do prognóstico individual e familiar – muitas vezes é dificultada pela carência de conhecimento acerca da história natural dessas condições. Apesar dos grandes avanços técnicos e moleculares, poucos estudos de seguimento de longo prazo estão disponíveis, principalmente em se tratando de condições cujos quadros clínicos só recentemente estão sendo delineados, como é o caso das disgenesias gonadais (DG) parciais 46,XY com mutações em genes específicos, como o *NR5A1*.

Além disso, com o constante desenvolvimento de técnicas diagnósticas e a crescente participação de pacientes e familiares no processo de cuidado, mudanças

de paradigma vêm acontecendo no campo de estudo dos DDS. Isso inclui mudanças na classificação, necessidade da atualização dos consensos e novas diretrizes, incluindo o questionamento de condutas até então bem estabelecidas, como as indicações de retirada profilática das gônadas e a busca de uma definição sobre o sexo de criação o mais precocemente possível.

As disgenesias testiculares parciais (DG Parcial XY e DG Mista) são um capítulo especial dessa área do conhecimento. Há grande variabilidade em sua apresentação clínica (de fenótipo feminino a masculino, passando por diferentes graus de ambiguidade genital) e histológica (combinação variável de achados histológicos nas gônadas desses indivíduos). Decisões sobre definição do sexo de criação e preservação ou não das gônadas nos indivíduos criados no sexo masculino têm sido tomadas com base principalmente em fatores individuais. Além de serem poucos os estudos de seguimento em longo prazo, até os dias de hoje há pouca uniformidade na literatura especializada quanto aos critérios diagnósticos dessas duas condições.

Inicialmente a distinção era feita pelos achados histológicos independentemente do resultado do cariótipo, sendo considerado como DG Parcial a presença de testículo disgenético bilateralmente e DG Mista a presença de uma gônada disgenética associada a testículo disgenético contralateral. Posteriormente, a presença de um mosaico 45,X/46,XY ou variantes passou a caracterizar a DG Mista e o cariótipo 46,XY sem mosaicismo a DG Parcial, independentemente dos achados histológicos. Esta distinção de acordo com o cariótipo é de grande importância, devido à presença, na DG Mista, de sinais clínicos semelhantes aos da síndrome de Turner, tais como baixa estatura, alterações cardíacas, renais e auditivas, entre outras.

A presença, na literatura médica, de grande número de trabalhos nos quais os pacientes foram classificados histologicamente dificulta o delineamento do quadro clínico, histológico e de função gonadal dessas duas condições isoladamente e, conseqüentemente, sua comparação em relação a essas características fenotípicas.

A existência de um serviço de referência em distúrbios da diferenciação do sexo há mais de 25 anos (o Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo – GIEDDS – da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp) permitiu reunir um número significativo de casos de disgenesias testiculares (DG Mista e DG Parcial XY) obedecendo a critérios de inclusão bem definidos, de forma a ampliar o conhecimento sobre essas condições.

## I.1 CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO DOS DDS

### I.1.1 Conceitos Básicos

Representantes da Sociedade Europeia de Endocrinologia Pediátrica (ESPE) e da Sociedade Norte-Americana de Endocrinologia Pediátrica Lawsons Wilkins (LWPES) reuniram-se em Chicago em 2005 para redigir o primeiro consenso para diagnóstico e tratamento dos Distúrbios da Diferenciação do Sexo (DDS). Esse consenso teve papel importante na uniformização dos diagnósticos e das condutas relativas a esses pacientes, além de propor nova nomenclatura e classificação desses casos (1). Nesse chamado “Consenso de Chicago”, os DDS foram assim definidos:

*“Um DDS é a situação em que não há acordo entre os vários sexos do indivíduo, ou seja, o sexo genético, retratado pela sua constituição cariotípica 46,XX ou 46,XY, o sexo gonadal/hormonal, e o sexo fenotípico.”*

A investigação de um DDS, segundo o consenso, deve ser realizada sempre que houver:

- (a) clara ambiguidade genital;
- (b) genitália de aparência feminina com aumento clitoriano, fusão labial posterior ou massa inguinal ou labial;
- (c) genitália de aparência masculina com criptorquidia bilateral, micropênis, hipospadia perineal isolada ou hipospadia leve com testículos não descidos;
- (d) história familiar de DDS, como, por exemplo, insensibilidade total a andrógenos;
- (e) discordância entre a aparência genital e o cariótipo pré-natal.

Esses critérios propostos pelo consenso de Chicago têm muitos pontos em comum com aqueles propostos em 1982 por Danish e colaboradores (2) para uniformizar a caracterização de uma genitália ambígua por meio de critérios semiológicos que levam em consideração características do exame clínico da genitália. Segundo os critérios de Danish, considera-se ambiguidade genital quando quaisquer das manifestações a seguir estiverem presentes:

- a) Numa genitália de aspecto masculino:

- Gônadas não palpáveis;
- Tamanho peniano esticado mais de 2,5 desvios-padrão abaixo da média de tamanho peniano normal para a idade;
- Gônadas pequenas, ou seja, maior diâmetro inferior a 8 mm;
- Presença de massa inguinal (que poderá corresponder a útero e trompas rudimentares);
- Hipospadia.

b) Numa genitália de aspecto feminino:

- Diâmetro clitoriano superior a 6 mm;
- Gônada palpável em bolsa labioescrotal;
- Fusão labial posterior;
- Massa inguinal (que possa corresponder a testículos).

Portadores de DDS que apresentam genitália ambígua são frequentemente detectados ao nascimento, permitindo uma abordagem diagnóstica precoce. Nem sempre, porém, um caso de DDS se apresenta com ambiguidade genital; nesses, o diagnóstico muitas vezes é feito somente na adolescência ou mesmo na idade adulta, por alterações puberais ou da fertilidade, levando a várias consequências negativas para a saúde física e psíquica do indivíduo.

### **I.1.2 Classificação dos DDS**

Os DDS vinham sendo classificados tradicionalmente em: distúrbios da diferenciação gonadal (situações em que a estrutura da gônada é anômala, incluindo gônadas em fita ou streak, testículos disgenéticos e hermafroditismo verdadeiro, onde há coexistência de tecido ovariano e testicular no mesmo indivíduo); pseudo-hermafroditismo masculino (PHM), que se caracteriza por sexo genético e gonadal masculino e androgenização parcial ou ausente dos genitais externos e internos e, por fim, o pseudo-hermafroditismo feminino (PHF), no qual há sexo genético e gonadal femininos e androgenização dos genitais externos em graus variáveis.

**Quadro 1: Nova classificação dos DDS, segundo o Consenso de Chicago.**

<b>DDS por alteração nos cromossomos sexuais</b>	<b>DDS 46,XY</b>	<b>DDS 46,XX</b>
<b>45,X</b> (Síndrome de Turner e variantes)	<b>Distúrbios da diferenciação gonadal (testicular):</b> <i>Disgenesia gonadal pura (Síndrome de Swyer); Disgenesia gonadal parcial; Regressão testicular; DDS ovotesticular</i>	<b>Distúrbios da diferenciação gonadal (ovariano):</b> <i>Disgenesia gonadal pura; DDS ovotesticular; DDS testicular</i>
<b>47,XXY</b> (Síndrome de Klinefelter e variantes)	<b>Quadros não associados a distúrbios da diferenciação gonadal:</b> <u>Distúrbios da síntese ou ação dos hormônios testiculares:</u> <i>Defeitos de síntese androgênica (p.ex, deficiência de 17-hidroxisteróide desidrogenase, deficiência de 5<math>\alpha</math>-redutase tipo 2); defeitos na ação androgênica (Síndromes de Insensibilidade androgênica); defeito no receptor de LH; defeitos na síntese do HAM ou receptor de HAM (Síndrome de persistência dos dutos de Müller)</i>	<b>Quadros não associados a distúrbios da diferenciação gonadal:</b> <u>Excesso de Andrógenos: fetal</u> (p.ex, deficiência de 21-hidroxilase), fetoplacentaria (p.ex, deficiência de aromatase), materna (p.ex, luteoma, hormônios exógenos)
<b>45,X/46,XY</b> (Disgenesia gonadal mista; DDS ovotesticular)		
<b>46,XX/46,XY</b> (DDS ovotesticular por quimera)	<u>Outros:</u> ex, hipospádia grave, extrofia de cloaca	<u>Outros:</u> p.ex, associação MURCS, extrofia de cloaca

HAM = Hormônio anti-Mulleriano; LH = Hormônio Luteinizante; MURCS= associação entre alterações do ducto de Muller, Renais e de coluna (somitos cervicais, no inglês: "CervicothoracicSomitedysplasia"). Adaptado de (1).

A mudança de nomenclatura proposta pelo consenso de Chicago buscou uniformizar a designação dessas afecções e diminuir o estigma relacionado a palavras como "intersexo", "ambiguidade" e "hermafrodita", entre outras (1). Assim, esse grupo de afecções passou a ser denominado "Distúrbios da Diferenciação do Sexo" (DDS); o termo pseudo-hermafroditismo foi abolido e os casos passaram a ser classificados de acordo com o cariótipo ("DDS, 46,XY", "DDS, 46,XX" e "DDS com anomalia de cromossomos sexuais") (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Assim, no consenso de Chicago os distúrbios da diferenciação gonadal não constituem um grupo à parte, mas sim foram subdivididos de acordo com o cariótipo. Para fins didáticos, porém, a classificação tradicional pode ser mesclada à do consenso com a distribuição dos DDS em três grupos (3):

1. *Distúrbios da Diferenciação Gonadal* (ou DDG): disgenesias gonadais (completa, parcial e mista), síndromes de regressão testicular, DDS

ovotesticular (antigo hermafroditismo verdadeiro), DDS XX testicular (antigo homem XX), síndrome de Turner e síndrome de Klinefelter e suas variantes.

2. *Distúrbios da Diferenciação do Sexo 46,XY* (DDS 46,XY) não associados a DDG (antigo Pseudo-Hermafroditismo Masculino);
3. *Distúrbios da Diferenciação do Sexo 46,XX* (DDS 46,XX) não associados a DDG (antigo Pseudo-Hermafroditismo Feminino).

### I.1.3 Os Distúrbios da Diferenciação Gonadal

Os Distúrbios da Diferenciação Gonadal (DDG) incluem condições nas quais há alteração na formação embriológica do tecido gonadal, que contempla desde alterações testiculares em graus variáveis em indivíduos 46,XY e falência ovariana prematura em pacientes 46,XX até ausência de diferenciação gonadal, como nas disgenesias gonadais puras XX e XY. Esse grupo também inclui o hermafroditismo verdadeiro (ou DDS ovotesticular).

Falhas na diferenciação gonadal durante a embriogênese podem levar ao surgimento de gônadas disgenéticas, testículos rudimentares ou disgenéticos e hermafroditismo. Entende-se por *gônada disgenética* (em fita ou *streak*) aquela constituída somente por tecido fibroso, sem função hormonal ou capacidade de produção de gametas, e sem estruturas que permitam caracterizá-la como testículo ou ovário. O *testículo rudimentar ou disgenético*, por sua vez, é caracterizado histologicamente por anomalias tubulares e intersticiais em graus variáveis, associadas à fibrose e hialinização. Já o termo *hermafroditismo* é empregado nos casos em que há tecido ovariano e testicular no mesmo indivíduo, em gônadas separadas ou na mesma gônada (denominada ovotestis).

A apresentação clínica de um caso de DDG varia, portanto, conforme o grau de alteração do desenvolvimento do tecido gonadal ou a combinação dos diferentes tipos histológicos (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

**Quadro 2: Caracterização dos distúrbios da diferenciação gonadal.**

DDG	Cariótipo	Fenótipo (genitália externa)	Fenótipo (genitália interna)
<b>Disgenesia Gonadal Pura XX</b>	46,XX	F	F
<b>Disgenesia Gonadal Pura XY</b>	46,XY	F	F
<b>Disgenesia Gonadal Parcial XY</b>	46,XY	M ou A	M, F ou A
<b>Disgenesia Gonadal Mista</b>	45,X/46,XY (ou variantes)	M ou A	M, F ou A
<b>Hermafroditismo Verdadeiro ou DDS ovotesticular</b>	46,XX, 46,XY, quimeras 46,XX/46,XY e outras anomalias de cromossomos sexuais	M, F ou A	M, F ou A
<b>Homem XX ou DDS XX testicular</b>	46,XX	M ou A	M
<b>Síndrome de Turner</b>	45,X (ou variantes)	F	F
<b>Síndrome de Klinefelter</b>	47,XXY (ou variantes)	M	M

F: feminino; M: masculino; A: ambíguo.

## I.2 COMPREENDENDO OS DDS: A DIFERENCIAÇÃO SEXUAL NORMAL

A determinação sexual ocorre na gametogênese, quando um espermatozóide que contém um cromossomo X ou Y dá origem, ao fecundar um óvulo contendo um cromossomo X, a um zigoto com 23 pares de cromossomos, sendo 22 pares de cromossomos chamados *autossomos* e 2 *cromossomos sexuais* – a constituição cromossômica 46,XX ou 46,XY determinará o sexo genético do embrião, respectivamente feminino ou masculino.

A diferenciação gonadal começa em torno da terceira semana gestacional, quando as células germinativas primordiais começam a migrar da parede do saco vitelínico em direção ao local onde se desenvolvem as cristas genitais. Essas cristas começam a surgir em cada lado do embrião em torno da quarta semana, mas é na quinta semana que as células germinativas as alcançam e penetram em seu interior, formando a chamada gônada primitiva ou indiferenciada. Participam da formação desta gônada primitiva os genes *WT1* (4), *NR5A1 (SF1)* (5) e *NR0B1 (DAX-1)* (6).

Em torno da sétima semana gestacional, na presença do gene *SRY (sex-determining region on the Y chromosome)*, localizado na região 1A1 do cromossomo Y, é iniciada uma cascata de eventos que culmina na diferenciação da gônada primitiva em testículo. O gene *SRY* produz uma proteína antigamente chamada “fator de diferenciação testicular” (TDF – *Testis Determining Factor*), que atua como fator de

transcrição, regulando a ação de outros genes (7). Na ausência do cromossomo Y e na presença de dois cromossomos X íntegros e das células germinativas, a gônada primitiva se diferencia em ovário em torno da décima semana gestacional (8).

No estágio indiferenciado, tanto embriões de sexo genético masculino quanto feminino apresentam dois pares de primórdios de condutos genitais internos: os dutos de Müller, que dão origem aos genitais internos femininos, e os de Wolff, precursores da genitália interna masculina. A formação dos genitais internos masculinos começa ainda na sétima semana gestacional, quando o testículo em formação começa a produzir o hormônio anti-Mülleriano (HAM), que age de forma parácrina levando à regressão do duto de Müller. Em torno da oitava semana gestacional, o testículo em formação já é capaz de produzir testosterona, hormônio que estimulará (também de forma parácrina) o desenvolvimento do duto de Wolff em estruturas genitais internas masculinas (duto deferente, vesículas seminais e epidídimo). Em embriões do sexo feminino, na ausência desses estímulos hormonais, o duto de Wolff regride e o de Müller se diferencia nas estruturas genitais internas femininas (trompas, útero e porção superior da vagina).

Em embriões de ambos os sexos, os rudimentos genitais externos encontrados no estágio indiferenciado compreendem o tubérculo genital, as pregas genitais, as saliências lábio-escrotais e o seio urogenital. A genitália externa masculina é formada pela ação da diidrotestosterona (DHT), um hormônio que é um metabólito mais potente da testosterona, formado a partir desta última pela ação da enzima  $5\alpha$ -redutase do tipo 2. Esse hormônio se liga ao receptor androgênico com maior afinidade do que a testosterona, e é responsável pela androgenização dos genitais externos e formação da próstata. Por ação da DHT, o tubérculo genital dá origem à glândula e à maior parte do corpo do pênis, as pregas genitais se alongam e se fundem na linha média, dando origem à porção ventral do pênis, as saliências lábio-escrotais formam a bolsa escrotal e o seio urogenital origina a uretra peniana. Na ausência desse estímulo hormonal, a genitália externa segue diferenciação feminina, com o tubérculo genital originando o clitóris, as pregas genitais os pequenos lábios e as saliências lábio-escrotais os grandes lábios; o seio urogenital se divide, dando origem à uretra feminina e à porção inferior da vagina.

## I.2.1 Genes envolvidos na diferenciação gonadal

Cada etapa da formação gonadal tem a participação de um ou mais genes, atuando em cascata de forma tempo e dose-dependente.

Na formação dos primórdios genitais (da crista urogenital até a formação da gônada primordial, indiferenciada), destacam-se os genes *WT1* (4), *NR5A1* (também conhecido pelo nome de sua proteína, SF-1) (9) e *NROB1* (também denominado *DAX-1*) (6). Vários genes participam da formação testicular a partir da gônada primordial, com destaque para *SRY* (10), *SOX9* (11,12), *DMRT1* e *FGF9* (13) (Figura 1).

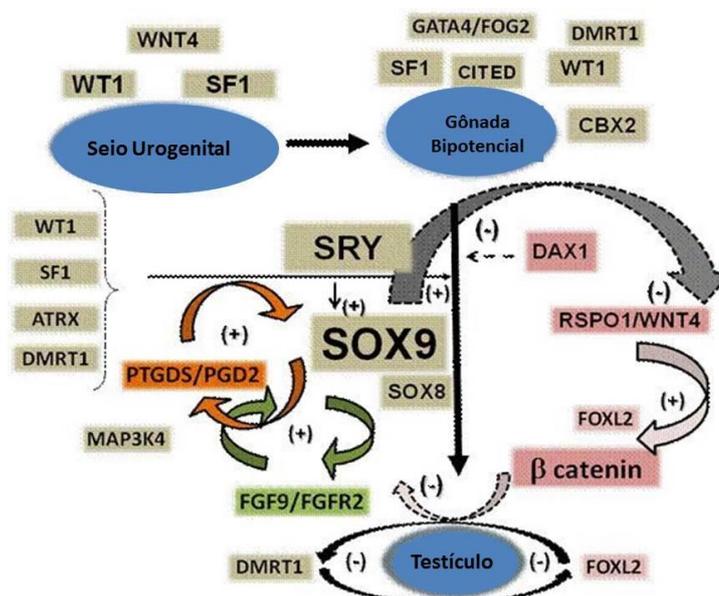


Figura 1: Genes envolvidos na diferenciação testicular. Adaptado de Mendonça *et al*, 2000 (13).

### I.2.1.1 Gene *WT1*

O gene *WT1* (*Wilms tumor 1*, OMIM 607102), localizado no braço curto do cromossomo 11 (região 11p13) (14), tem papel de ativação ou repressão da transcrição do DNA. Atua na formação do sistema genito-urinário e de tecidos mesoteliais (4), e tem ainda um papel na gênese do tumor de Wilms (15,16).

A proteína *WT1* atua como fator de transcrição do tipo “dedo de zinco” (*zinc finger*) e possui quatro isoformas principais: com ou sem a trinca de aminoácidos “KTS” (lisina, treonina e serina, respectivamente) entre o terceiro e quarto dedo de zinco e com ou sem a inserção de um segmento alternativo de 17 aminoácidos codificado pelo éxon 5 no meio da proteína.

Essas isoformas são altamente conservadas entre as espécies e desempenham papel importante na função normal do gene, cuja ação depende da isoforma predominante – acredita-se que as isoformas KTS (-) estejam envolvidas na atividade transcricional propriamente dita, e que as isoformas KTS (+) participem na regulação de certos genes em nível pós-transcricional (17–19).

Isoformas KTS (-) do *WT1* agem em associação com o produto do *NR5A1* para promover a expressão do hormônio anti-Mülleriano, responsável, em embriões do sexo masculino, pela regressão dos dutos de Muller. O produto do *NR0B1*, por sua vez, antagoniza este sinergismo, provavelmente por interação direta com *NR5A1*, indicando que *WT1* e *NR0B1* agiriam de maneira funcionalmente oposta na regulação da transativação de *NR5A1* (20). Essas mesmas isoformas atuam na ativação do gene *SRY*, responsável pela diferenciação gonadal masculina (19).

As principais síndromes clínicas decorrentes de alterações no *WT1* são as de Denys-Drash (SDD), de Frasier (SF) e a síndrome de genes contíguos WAGR. A SDD caracteriza-se por ambiguidade genital devido à presença de testículos disgenéticos, nefropatia grave que evolui rapidamente para insuficiência renal terminal e alta incidência de tumor de Wilms. Nessa síndrome ocorrem mutações em regiões dos domínios “*zinc fingers*” do gene, afetando diretamente a sequência de reconhecimento do DNA.

Já na SF observa-se disgenesia gonadal completa (pura), com fenótipo feminino em pacientes de sexo genético masculino (46,XY). As pacientes apresentam ainda síndrome nefrótica, que usualmente progride para insuficiência renal. Há ainda alto risco de ocorrência de gonadoblastoma, mas não de tumor de Wilms. Na SF as mutações ocorrem no sítio de *splicing* do íntron 9, com perda da isoforma KTS (+) (21). Tanto na SDD quanto na SF as formas mutantes do *WT1* exercem efeito dominante negativo (22), ou seja, a proteína mutante não funcional interfere com a proteína codificada pelo alelo normal.

A síndrome WAGR (23), por sua vez, caracteriza-se pela associação de tumor de Wilms (W), aniridia (A), anormalidades geniturinárias (G) e retardo mental (R). Trata-se de uma síndrome de genes contíguos (24) causada por deleção da região cromossômica 11p13, onde se localizam os genes *WT1* e *PAX6* (*Paired Box gene 6* – OMIM: 607108). O diagnóstico diferencial deve ser feito primeiramente

baseado na clínica do paciente, com subsequente confirmação citogenética ou molecular da deleção (25).

### ***1.2.1.2 Gene NR5A1***

O gene *NR5A1* (*nuclear receptor subfamily 5, group a, member 1*, OMIM 184757), localizado na região cromossômica 9q33, codifica a proteína SF1 (*Steroidogenic factor 1*). Essa proteína é assim chamada por regular vários genes envolvidos na esteroidogênese; além disso, está envolvida em diversos passos da embriogênese gonadal e adrenal. O gene *NR5A1* é extremamente conservado entre as espécies, havendo 95% de homologia entre humanos e murinos (26). É expresso durante o desenvolvimento do seio urogenital, dos tecidos esteroidogênicos (gônadas, adrenais, placenta), do hipotálamo e da adeno-hipófise (27–29). Ativa a expressão do HAM nas células de Sertoli e de várias enzimas esteroidogênicas nas células de Leydig, contribuindo, portanto, para regressão dos dutos de Müller e androgenização da genitália interna e externa (9,29,30). Também é expresso nas células da granulosa e da teca, regulando a esteroidogênese ovariana e a maturação e crescimento dos folículos (28,29). Entre os genes alvo da regulação pelo *NR5A1* estão os *CYPs* (genes da família Citocromo P450), *HSD3B2* (3-beta Hidroxiesteroide Desidrogenase), *StAR* (*Steroidogenic Acute Regulatory Protein*), *SOX9* e *NR0B1* (31).

Os primeiros casos de DDS associado a mutação no *NR5A1* em humanos foram descritos em pacientes que apresentavam insuficiência adrenal primária e disgenesia gonadal pura (32,33). Após essas primeiras descrições, trabalhos subsequentes demonstraram que alterações nesse gene são responsáveis por um espectro bem mais amplo de apresentação clínica em indivíduos 46,XY e 46,XX, com expressividade variável, penetrância incompleta e mais de um modo de herança (autossômico dominante ou recessivo). Clinicamente, pode haver desde ambiguidade genital franca até fenótipo feminino normal com falência ovariana prematura ou masculino normal com infertilidade, associados ou não a alterações adrenais; além disso, há relatos de associação com tumor adrenal e endometriose (34–41). Existe variação na apresentação clínica mesmo dentro de uma mesma família (42) e recentemente foram relatados casos nos quais a apresentação clínica e o padrão de recorrência familiar podem simular insensibilidade parcial a andrógenos (43–45).

### **I.2.1.3 Gene SRY**

O gene *SRY* (OMIM: 480000), localizado na região cromossômica Yp11.3, foi primeiramente identificado em 1990 por Sinclair e colaboradores (7). Após a clonagem do gene homólogo em modelo animal, o papel desse gene na diferenciação sexual masculina foi confirmado por Gubbay e colaboradores (46). Esse gene codifica uma proteína que é um fator de transcrição da família HMG-box (*high mobility group box family*), família de proteínas de ligação ao DNA (47).

O gene *SRY* atua como um “gatilho”, ou seja, como o iniciador de uma cascata de ativação gênica, interagindo com genes como *SOX9* e *NR5A1* (SF1) para promover a diferenciação testicular (48). A primeira descrição de um paciente com DDS e alteração no *SRY* foi publicada por Jäger e colaboradores em 1990 (49). Desde então, diversos trabalhos relacionaram alterações neste gene com quadros de DG Pura, DG Parcial, DDS Ovotesticular e DDS XX testicular (Homem XX).

### **I.2.1.4 Outros genes**

O gene *NR0B1* (*nuclear receptor subfamily 0, group b, member 1*, também denominado *DAX-1*, OMIM: 300473), localizado na região cromossômica Xp21.2, participa da diferenciação da gônada bipotencial e da supra-renal nos estágios iniciais do desenvolvimento embriológico. Atua antagonizando o sinergismo entre *WT1* e *NR5A1* (SF1), inibindo a cascata gênica (20). Quando em dose dupla, suprime a diferenciação testicular, o chamado “efeito *anti-testis*” (50). Alterações neste gene estão relacionadas, além dos DDS, à hipoplasia adrenal congênita.

O gene *SOX9* (*SRY-related HMG-box gene 9*, OMIM: 608160), localizado na região cromossômica 17q24.3-q25.1, é alvo da ativação do *SRY*, aumentando a expressão do gene do HAM. É também regulador do gene *FGF9* (*fibroblast growth factor 9*), que por sua vez participa do controle da migração das células mesonéfricas para as gônadas XY (necessária para a organização dos túbulos seminíferos em cordões). Mutações em um dos alelos do gene *SOX9* levam, por haploinsuficiência, à síndrome clínica chamada Displasia Campomélica (na qual há DDS XY associado a malformações esqueléticas graves). Foi observado inicialmente em modelos animais que sua “*up-regulation*” leva a diferenciação testicular independente de *SRY* (51); isso foi posteriormente confirmado em humanos, após a descoberta de

alterações na região promotora deste gene em alguns casos de DDS 46,XX testicular (Homem 46,XX) (52–54).

Os genes *DMRT1* e *DMRT2* (*Doublesex- and MAB3-related transcription factor 1* e 2, OMIM 602424 e 604935, respectivamente), ambos localizados na região cromossômica 9p24.3, participam da formação testicular em vertebrados e são altamente conservados entre as espécies (55). Foram identificados após diversos relatos de casos de DDS associados a deleção (ou microdeleção) no braço curto do cromossomo 9 (9p) (56,57). Alterações nesse gene em indivíduos 46,XY podem levar a diferentes fenótipos, incluindo a disgenesia gonadal pura XY, DG parcial, agonadismo e também DDS Ovotesticular (58,59).

O gene *WNT4* (OMIM 603490), localizado na região cromossômica 1p36.12, faz parte da família de genes que codificam proteínas de sinalização extracelular WNT (“*Wingless-type MMTV integration site Family*”). Tem papel na formação renal e na cascata de diferenciação sexual, como um promotor (“*up-regulator*”) do *NROB1* (DAX1). Apresenta também um “efeito *anti-testis*”, uma vez que sua duplicação em fetos XY leva a um fenótipo completamente feminino (60). Atua principalmente na diferenciação feminina, tanto na diferenciação gonadal (formação dos folículos primordiais e manutenção ovariana) quanto na diferenciação e manutenção dos dutos de Müller (61). Mutações nesse gene podem levar à androgenização de fetos XX (62) ou a síndromes clínicas relacionadas com aplasia ou displasia Mülleriana (63,64).

O gene *RSPO1* (OMIM 609595), localizado na região cromossômica 1p34.3, teve sua participação na cascata da diferenciação sexual elucidada após descrição de um caso de virilização de indivíduo 46,XX associada à hiperkeratose palmo-plantar e predisposição a câncer de pele. O estudo desse caso sugeriu que este gene se expressa em fibroblastos e atua na diferenciação sexual de forma sinérgica com o gene *WNT4* (65). Posteriormente, alterações nesse gene também foram descritas em pacientes com DDS Ovotesticular (66).

### **I.3 AS DISGENESIAS GONADAIS 46,XY E 45,X/46,XY**

Em embriões 46,XY, a falha no desenvolvimento gonadal pode ser tão grave a ponto de levar a uma gônada completamente disgenética (gônada em fita ou

*streak*) ou ser mais leve, levando a quadros intermediários do desenvolvimento testicular.

Na disgenesia gonadal pura 46,XY (também chamada síndrome de Swyer), a presença de duas gônadas disgenéticas leva à diferenciação de genitais internos e externos femininos. O diagnóstico é feito geralmente na época da puberdade por falta de caracteres sexuais secundários (hipogonadismo hipergonadotrófico) e amenorreia primária. Pode ser decorrente de deleção ou mutação no gene *SRY* (67) ou de mutação em genes autossômicos, como o *NR5A1* (30). Há risco de desenvolvimento de gonadoblastoma e disgerminoma nas gônadas disgenéticas, principalmente a partir da adolescência.

Por sua vez, os quadros intermediários de disgenesia testicular foram inicialmente classificados histologicamente em disgenesia gonadal (DG) mista, quando da presença de uma gônada disgenética e um testículo disgenético contralateral, e DG Parcial XY, quando fossem encontrados testículos disgenéticos bilateralmente (68,69).

O quadro histológico de DG Mista é aparentemente mais frequente em indivíduos com mosaicismo 45,X/46,XY, enquanto que naqueles com cariótipo 46,XY predominariam os achados histológicos da DG Parcial (70). Assim, com o tempo, a denominação DG Mista foi consagrada pelo uso para designar os casos de disgenesia testicular com cariótipo 45,X/46,XY e o termo DG Parcial XY para aqueles com cariótipo 46,XY, independentemente dos achados histológicos. Na verdade, ambos os quadros histológicos podem estar presentes em indivíduos com e sem mosaicismo com linhagem 45,X (70–73). Além disso, o fato do quadro clínico associado ao mosaicismo ser mais complexo, como será visto adiante, faz com que seja de fato mais adequado separar as disgenesias testiculares com cariótipo em mosaico daquelas sem linhagem 45,X.

Finalmente, há ainda quadros sindrômicos associados a disgenesia testicular em indivíduos com cariótipo 46,XY, como a disgenesia gonadal associada a doença renal (Síndromes de Frasier e de Denys-Drash), decorrente de mutação no gene *WT1* (21,74), e a disgenesia gonadal associada à displasia campomélica (por mutação no gene *SOX9*) (11,12).

### I.3.1 Disgenesia Gonadal Parcial XY

A DG Parcial XY é também chamada disgenesia gonadal incompleta, atípica, pseudo-hermafroditismo masculino disgenético ou, pela nova classificação, distúrbio da diferenciação sexual (DDS) 46,XY disgenético. Como já mencionado, nesses casos o cariótipo é 46,XY sem mosaicismo e podem ser encontrados dois testículos disgenéticos ou um testículo disgenético e uma gônada em fita contralateral (75).

Ipsilateral a um testículo disgenético há baixa produção de testosterona e hormônio anti-Mülleriano (HAM) e, conseqüentemente, desenvolvimento variável dos dutos de Wolff e graus variáveis de persistência dos dutos de Müller. Ao lado de uma gônada em fita (se houver), encontram-se somente derivados de Müller. Os pacientes podem apresentar desde genitália externa completamente feminina (76) ou com clitoromegalia discreta e queixa de amenorreia primária até genitália masculina normal com queixa de infertilidade, passando por vários graus de ambigüidade genital (3).

A importância do diagnóstico precoce nesses casos reside no fato de que tanto testículos disgenéticos quanto gônadas em fita apresentam alto risco de transformação neoplásica, chegando a 30% em algumas casuísticas (77). Os principais tumores encontrados são gonadoblastoma e disgerminoma (seminoma), havendo indicação de gonadectomia bilateral nos pacientes criados no sexo feminino e de retirada profilática de gônadas em fita e testículos acentuadamente disgenéticos naqueles criados no sexo masculino.

Com exceção dos pacientes com genitais muito feminizados, o sexo de criação preferencial é o masculino, uma vez que o prognóstico quanto ao desenvolvimento puberal espontâneo, ao crescimento e a altura final são favoráveis (78). No entanto, estes pacientes podem evoluir com falência testicular secundária, necessitando reposição hormonal masculina, motivo pelo qual devem ser acompanhados regularmente durante toda a puberdade e também na vida adulta (79).

Além do acompanhamento da função gonadal e crescimento, estudo recentemente publicado pela autora deste trabalho (78) revelou que esses pacientes também devem ser acompanhados em relação à função tireoidiana e à possibilidade de surgimento de dificuldades de aprendizado. Devem ser encaminhados para correção cirúrgica dos genitais externos e, nos indivíduos criados no sexo masculino com

preservação de ao menos um dos testículos, deve ser sugerida, ao final do desenvolvimento puberal, a realização de espermograma para a avaliação do prognóstico quanto à fertilidade. No caso dos pacientes para os quais foi indicada gonadectomia profilática, deve ser realizada indução da puberdade com andrógenos exógenos.

Apesar de inicialmente ter sido considerada por alguns autores uma variante da disgenesia gonadal pura XY, geralmente não se encontram mutações no gene *SRY* desses pacientes (80), nem em outros genes sabidamente participantes da diferenciação gonadal, como *WT1* e *SOX9* (81). Também não foram detectadas mutações do gene *SRY* no tecido gonadal (82) nem mutações no gene *LHX9* (83). Tagliarini e colaboradores (84) pesquisaram mutações nos genes *SRY* e *WT1* em dez pacientes com DG Parcial XY; foi encontrada mutação no *WT1* em apenas um paciente, que tinha história prévia de tumor de Wilms, e em nenhum dos casos estudados havia mutações no *SRY*.

Recentemente, como já mencionado, o gene *NR5A1* tem sido implicado na etiologia de diversos casos de DG Parcial XY, além de variados fenótipos relacionados aos DDS (40) e seu papel na diferenciação gonadal e nos DDS 46,XY disgenéticos tem sido amplamente revisados na literatura (30,36,42).

### **1.3.2 A Disgenesia Gonadal Mista**

O cariótipo 45,X/46,XY ou suas variantes associa-se a diferentes fenótipos de acordo com a histologia gonadal, a qual, por sua vez, deve depender da proporção das duas linhagens nas gônadas (85–88): fenótipo feminino com síndrome de Turner (duas gônadas disgenéticas ou em fita); ambiguidade genital com diferenciação testicular parcial (DG Mista) ou DDS Ovotesticular e fenótipo masculino com esterilidade.

Nos indivíduos com cariótipo 45,X/46,XY e diferenciação testicular parcial (DG Mista), o quadro histológico gonadal e as características genitais internas e externas são os mesmos já descritos para a DG Parcial XY. Porém, além da ambiguidade genital e das questões a ela relacionadas (como definição do sexo de criação, risco de malignização gonadal e genitoplastias), possivelmente associam-se sinais clínicos decorrentes da linhagem 45,X semelhantes aos encontrados na

síndrome de Turner: baixa estatura, dismorfismos, alterações cardíacas, renais e de vias urinárias e de doença tireoidiana autoimune, entre outras (89,90).

A definição do sexo de criação é complexa, pois envolve vários aspectos do quadro clínico e do prognóstico. Nos casos criados no sexo masculino, pode haver puberdade espontânea incompleta ou falência testicular secundária e é pouco provável que haja fertilidade; deve ser levado ainda em consideração o prognóstico quanto a resultados cirúrgicos satisfatórios em cirurgias de correção de hipospádia, bem como a perspectiva de baixa estatura (91–93). Assim, muitas vezes o sexo de escolha é o feminino. De todo modo, devem ser levados em consideração o quadro clínico como um todo e o desejo da família.

Além do acompanhamento da função gonadal e do crescimento, esses pacientes também devem ser investigados em relação a todas as comorbidades relacionadas à linhagem 45,X: no momento do diagnóstico, investigação de cardiopatias e malformações renais; ao longo do seguimento, pesquisa de alterações auditivas, disfunção tireoidiana e síndrome metabólica, entre outros, de modo idêntico ao indicado para pacientes com síndrome de Turner (94).

Assim sendo, devido às diferenças no prognóstico e no acompanhamento clínico, em casos de ambiguidade genital associados à disgenesia testicular deve-se estar atento à presença de sinais clínicos sugestivos de uma linhagem 45,X que não tenha sido detectada ao exame do cariótipo, como baixa velocidade de crescimento, cardiopatias e anomalias renais. Na presença desses sinais deve ser ampliado o número de células analisadas no exame de cariótipo ou mesmo, dependendo do grau de suspeita clínica, solicitado FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*) com sondas específicas para os cromossomos X e Y (95).

### **I.3.3 Aspectos Histológicos das disgenesias gonadais Mista e Parcial**

A interpretação dos achados patológicos de testículos disgenéticos depende do conhecimento sobre a histologia normal do testículo nas diversas fases da vida, motivo pelo qual esta será apresentada resumidamente no próximo tópico.

#### ***I.3.3.1 Histologia testicular normal (96):***

O testículo é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea, que se projeta para o interior formando o mediastino da gônada, de onde

partem septos fibrosos que dividem o testículo em cerca de 300 lóbulos, cada um contendo de um a quatro túbulos seminíferos. Abaixo da túnica albugínea há uma camada de tecido conjuntivo frouxo altamente vascularizado, a túnica vascularizada.

O parênquima testicular, ou o tecido gonadal propriamente dito, é constituído por três tipos principais de célula: as que constituem os túbulos seminíferos, onde ocorre a espermatogênese – células de Sertoli e células germinativas – e as células de Leydig, localizadas entre os túbulos, responsáveis pela produção hormonal.

Próximo ao ápice dos lóbulos, os túbulos seminíferos se reúnem formando os túbulos retos, que posteriormente se anastomosam para formar a chamada *rete testis*, um sistema de cavidades labirínticas no mediastino testicular. Essa rede de canais se continua nos túbulos eferentes, que penetram na túnica albugínea e desembocam no epidídimo. Este, por sua vez, se continua como ducto deferente, que penetra na próstata até chegar à região prostática da uretra. Antes de penetrar na próstata, o ducto deferente se alonga formando uma ampola, que se liga à vesícula seminal. As vesículas seminais, juntamente com a próstata, secretam líquidos que compõem o sêmen, fornecendo nutrição e energia aos espermatozoides.

No testículo adulto, os túbulos medem aproximadamente 180-200 micrômetros de diâmetro e possuem luz em seu interior. As células germinativas se apresentam em vários estágios de espermatogênese, desde espermatogônias, mais próximas da membrana basal do túbulo, passando por espermatócitos I e II e espermátides, até espermatozoides, mais próximos da luz. Entre os túbulos se encontram as células de Leydig, cujo citoplasma é vacuolado (devido à presença de gotículas lipídicas) e que geralmente se encontram agrupadas (em “*clusters*”).

No entanto, nas fases pré-puberal e puberal os achados histológicos diferem daqueles do adulto, refletindo o processo de amadurecimento desse órgão. Até os seis meses de vida, na época da chamada “minipuberdade”, o testículo passa por uma fase inicial onde as características histológicas são muito próximas às do testículo adulto. No entanto, a partir de então e até os três anos de idade entram num período de repouso (“*resting period*”) onde ocorre parada da espermatogênese e apoptose de células de Leydig, das quais restam apenas algumas células quiescentes. Após esse período, passam por uma fase de crescimento (“*growth*”).

*period*") até a chegada da puberdade, quando surgem progressivamente as características do testículo adulto.

Na fase de repouso observam-se histologicamente túbulos com diâmetro reduzido, entre 60-80 $\mu$ m (uma vez que o diâmetro depende diretamente do número de células de Sertoli e seu estímulo pelo FSH), e ausência de células de Leydig. O diâmetro tubular só volta a aumentar por volta do terceiro ano de vida, porém só alcança o tamanho normal (160-170 micrômetros) por volta de 15 anos de idade. Até os três anos de idade as células germinativas evoluem apenas até espermatogônias; posteriormente, na fase de crescimento, até espermatócitos e espermátides, só evoluindo para espermatozoides na época da puberdade.

### ***1.3.3.2 Achados histológicos nas DG parciais***

O tecido gonadal de indivíduos com disgenesia gonadal mista e parcial XY pode apresentar vários graus de comprometimento ou disgenesia, que podem ser encontrados em toda a gônada ou em partes dela. Como já mencionado, são característicos os achados de gônadas disgenéticas (ou "em fita") e testículos disgenéticos; recentemente, porém, acrescentou-se ao espectro da disgenesia testicular o achado de tecido gonadal indiferenciado (97).

Uma descrição histopatológica comum nesses casos e bem característica é a de "estroma tipo ovariano" ou "**tecido celular tipo estroma ovariano**", geralmente associado a fibrose e hialinização; esse é o tecido predominante nas gônadas disgenéticas, nas quais o estroma celular tem aspecto ondulado.

O chamado "**tecido gonadal indiferenciado**" ou, em inglês, "*undifferentiated gonadal tissue*" (UGT) foi recentemente descrito por Coombs e colaboradores (97) e é caracterizado pelo aspecto global de tecido tipo "estroma ovariano", porém com presença de células agrupadas em cordões primitivos, que podem representar túbulos primitivos que não se desenvolveram embriologicamente. Nesse tecido pode haver células germinativas que, estando fora de seu microambiente normal, têm maior risco de transformação neoplásica (98).

Por sua vez, o **testículo disgenético** é aquele que apresenta, em maior ou menor grau, as seguintes características:

- Túbulos seminíferos – diminuição do diâmetro tubular e do número de células de Sertoli por túbulo.
- Células germinativas – diminuição do número dessas células por túbulo (baixo índice de fertilidade tubular) ou ausência delas (a chamada hipoplasia germinativa ou SCOS - “*Sertoli-cell-only syndrome*”).
- Células de Leydig – geralmente ausentes nos estágios pré-puberais; podem estar ainda patologicamente presentes em pré-púberes (como ocorre, por exemplo, nos casos de mutação no gene *NR5A1*) (99); ou hiperplasiadas, como ocorre em gônadas de pacientes mais velhos, onde o LH cronicamente elevado pode levar a um aumento do número destas células, porém sem o aumento de tamanho e o aspecto vacuolizado característico das mutações em *NR5A1*.
- Outras características – Edema intersticial, fibrose e hialinização; crescimento tubular intracapsular; alteração no formato dos túbulos (irregulares; ramificados); áreas de calcificação; litíase tubular; nódulos de células de Sertoli; presença de derivados de Muller adjacentes ao testículo, entre outros.

Sabemos que a presença de tecido gonadal disgenético em pacientes com cromossomo Y em sua constituição cromossômica está relacionada a maior risco de tumor gonadal (principalmente gonadoblastoma) (69,77,100–105); assim, a avaliação de características histológicas que indiquem maior risco de tumor é uma etapa importante da avaliação desses pacientes (77). Algumas dessas características são:

- Irregularidade na morfologia de células germinativas (citoplasma aumentado, núcleo irregular);
- Posicionamento anormal das células germinativas (próximo à membrana basal do túbulo, principalmente se coladas a outras células desse tipo);
- Sinais de expansão clonal de células germinativas e formação do gonadoblastoma;
- Presença de outros elementos, como: disgerminomas, seminomas; “*burned out*” gonadoblastoma (tumores que não evoluíram e se apresentam apenas como um foco de fibrose e calcificação).

É interessante assinalar que o diagnóstico de uma disgenesia testicular leve pode ser feito somente no momento em que esses pacientes se apresentam com um tumor gonadal. De fato, o estudo do tecido gonadal adjacente ou contralateral de pacientes com tumores testiculares pode revelar várias características de DG, como

hiperplasia de células de Leydig, microlitíase testicular, nódulos de células de Sertoli, disgenesia e involução das células de Sertoli, SCOS (*Sertoli-cell-only syndrome*), atrofia tubular, hipoespermatogênese, parada de maturação e espermatogônias hipertróficas e multinucleadas, entre outras (101).

A diferenciação entre um testículo pré-púbere e uma DG leve nem sempre é fácil; muitas vezes é necessária a realização de análise mais detalhada do padrão histológico, ou seja, de uma análise histomorfológica. Em 2001, Scolfaro e colaboradores publicaram um trabalho onde essas características foram revisadas em pacientes com diagnóstico clínico de DG Parcial XY, ajudando na elucidação diagnóstica de forma mais precisa (106).

Além do fato de que casos de disgenesia testicular leve podem ser difíceis de distinguir de um testículo pré-púbere normal, há ainda outros fatores que dificultam a avaliação histológica. Um deles é a *idade em que foi realizada a biópsia*, pois sabe-se que existe uma mudança fisiológica do padrão histológico (e do risco de tumor) ao longo do tempo. Outro é a *localização da gônada*, pois gônadas intra-abdominais tem maior probabilidade de apresentarem alterações degenerativas do que gônadas tópicas.

Outros fatores que dificultam essa avaliação são a variedade de fatores etiológicos, pois o risco de tumor varia de acordo com a etiologia; a qualidade e idade do material (degeneração do material); fixação do material durante a cirurgia (fixação inadequada pode levar a mudança da característica do tecido, como, por exemplo, um túbulo “descolado” da sua membrana basal); o tipo de corte (que deve ser fino e liso, caso contrário é difícil a visualização ao microscópio e a obtenção de um foco adequado para fotografia); além da técnica empregada para a obtenção do material, incluindo o local da biópsia e o tamanho do material biopsiado. As questões técnicas na obtenção de amostras de biópsia, sua validade como padrão ouro e a interpretação dos achados em casos de biópsia testicular foram revisadas em 2012 por Dohle e colaboradores, em estudo sobre pacientes encaminhados para tratamento de fertilidade (107).

#### **1.3.4 Quando suspeitar de uma disgenesia testicular**

Em pacientes com ambiguidade genital e cariótipo 45,X/46,XY a primeira hipótese é a de DG Mista, sendo raros os casos em que a histologia revela

hermafroditismo (DDS ovotesticular) (108). De todo modo, o achado dessa constituição cromossômica indica a necessidade de biópsia gonadal, a qual, por sua vez, permitirá que se defina o diagnóstico.

Já o diagnóstico da disgenesia testicular em um paciente com ambiguidade genital e cariótipo 46,XY deve ser suscitado na presença dos seguintes sinais clínicos e laboratoriais:

- Gônada não palpável uni- ou bilateralmente ou assimetria gonadal;
- Hipogonadismo hipergonadotrófico (gonadotrofinas elevadas com testosterona total normal ou diminuída) na avaliação hormonal basal da minipuberdade ou na fase puberal;
- Resposta diminuída ou ausente da testosterona no teste do hCG (sem acúmulo de precursores);
- Presença de útero na ultrassonografia pélvica ou laparoscopia.

Assim como nos pacientes com cariótipo 45,X/46,XY, essa suspeita deve se confirmar pela biópsia gonadal; esta, além do diagnóstico histológico, permite também avaliar o risco de tumor e a indicação de gonadectomia.

### **1.3.5 O papel das técnicas moleculares e citogenéticas no diagnóstico diferencial**

Ao avaliar o resultado de uma análise cromossômica a partir de linfócitos de sangue periférico deve ser levado em conta que esse tecido, derivado da mesoderme, não necessariamente reflete a distribuição de linhagens celulares em outros tecidos. Além disso, na dependência do número de células analisadas no cariótipo há risco de que uma linhagem celular em mosaico deixe de ser diagnosticada.

Esses riscos foram expressos por Hook (109) em uma tabela que mostra que ao analisar 16 células, como é feito rotineiramente nos laboratórios em casos sem suspeita prévia de mosaicismo, há 95% de chance de detectar uma linhagem em mosaico cuja frequência seja maior ou igual a 18%. Ao analisar 50 ou 100 células, há 95% de chance de detectar mosaicismo de pelo menos 6% e de pelo menos 3%, respectivamente.

Assim, na presença de sinais clínicos relacionados à linhagem 45,X (como baixa estatura e malformações cardíacas e renais), em vários casos esta pode ser detectada simplesmente com aumento da contagem do número de células (109). No entanto, o mosaicismo de cromossomos sexuais pode vir a ser confirmado somente com o exame de cariótipo a partir de biópsia de outros tecidos, como pele e gônadas (85), ou por meio de hibridação in situ (FISH), com sondas específicas para o centrômero dos cromossomos X e Y, o que permite analisar centenas ou milhares de células (110–112).

## II. JUSTIFICATIVA

As DG Mista e Parcial são afecções raras e que se assemelham quanto ao fenótipo gonadal e genital; entretanto, o prognóstico quanto à estatura final, puberdade espontânea e anomalias associadas pode ser diferente. Até recentemente, porém, a distinção entre esses casos não vinha sendo feita em grande parte dos estudos encontrados na literatura médica.

O diagnóstico diferencial entre estas duas condições é feito basicamente pelo cariótipo. No entanto, os exames citogenéticos de rotina podem não detectar mosaicismos de baixa frequência, o que permite que casos não diagnosticados de DG Mista sejam incluídos em amostras de pacientes com DG Parcial, prejudicando, assim, o delineamento do quadro clínico dessa última, que na maioria dos casos não tem etiologia definida.

Até o presente momento, não há estudos publicados em que grupos de pacientes com essas condições, diagnosticados com critérios clínicos e citogenéticos rigorosos, tenham sido analisados detalhadamente e comparados entre si em relação a suas características clínicas e histológicas. O preenchimento dessa lacuna no conhecimento atual dos DDS deve ser de grande auxílio no estabelecimento do diagnóstico, do prognóstico e das diretrizes de conduta perante esses pacientes.

### **III. OBJETIVOS**

#### **III.1 GERAL**

Analisar o quadro clínico e laboratorial de pacientes com ambiguidade genital associada à disgenesia testicular 46,XY com ou sem linhagem 45,X em mosaico (disgenesias gonadais mista e parcial, respectivamente).

#### **III.2 ESPECÍFICOS**

Comparar os pacientes com disgenesia testicular 46,XY e 45,X/46,XY em relação a :

- a) Antecedentes pessoais e familiares
- b) Anatomia genital interna e externa;
- c) Histologia das gônadas;
- d) Função Gonadal (níveis hormonais, puberdade espontânea, perspectiva de fertilidade espontânea);
- e) Crescimento e altura final;
- f) Presença de distúrbios e afecções associadas.

## IV. CASUÍSTICA E MÉTODOS

### IV.1 TIPO DO ESTUDO

Realizou-se um estudo descritivo com dados obtidos de forma retrospectiva, com base em dados dos prontuários dos pacientes da primeira à última consulta realizada em nosso serviço, e também uma avaliação transversal com revisão diagnóstica por meio de aprofundamento citogenético e revisão histológica.

### IV.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), nos ambulatórios de Endocrinologia Pediátrica e do GIEDDS (Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo).

### IV.3 CASUÍSTICA

Foram selecionados inicialmente todos os pacientes com diagnóstico prévio de disgenesia gonadal atendidos no ambulatório do GIEDDS desde a sua criação em 1988 até dezembro de 2013, num total de 95.

Foram incluídos neste trabalho os pacientes que preencheram os seguintes critérios:

- 1) Cariótipo 46,XY ou 45,X/46,XY ou suas variantes (mais de duas linhagens em mosaico e(ou) anomalias estruturais do cromossomo Y).
- 2) Ambiguidade genital evidente ou presença de ao menos um dos critérios propostos por Danish (2), descritos na introdução deste trabalho.
- 3) Ao menos um sinal de disfunção testicular ou alteração histológica que caracterize uma disgenesia testicular, ou ainda mutação em um dos genes reconhecidamente participantes da diferenciação testicular (como *WT1* e *NR5A1*).
  - a) Sinais de disfunção testicular:

- i) Aumento de FSH durante o período da “minipuberdade” (de 30 a 180 dias de vida) (113);
  - ii) Resposta diminuída da testosterona ao estímulo com hCG (teste do hCG – ver adiante); para a análise estatística, foram usados somente os casos em que o teste havia sido realizado até 2 anos de idade;
- b) Critérios histológicos – estudos realizados em material de biópsia gonadal ou gonadectomia:
- i) Gônada em fita unilateral associada a testículo contralateral (com ou sem descrição de disgenesia testicular na análise histológica);
  - ii) Disgenesia testicular, caracterizada por redução do diâmetro tubular médio, grave hipoplasia tubular, redução do índice de fertilidade tubular, grave hipoplasia de células germinativas e(ou) hiperplasia de células de Sertoli e presença de áreas de fibrose.

Foi critério de exclusão o achado de tecido ovariano, caracterizando DDS ovotesticular.

## **IV.4 METODOLOGIA**

### **IV.4.1 Ampliação da análise citogenética em pacientes com cariótipo 46,XY**

Nos pacientes com cariótipo inicial 46,XY em que havia características clínicas sugestivas da síndrome de Turner (como baixa estatura, baixa velocidade de crescimento e(ou) anomalias congênitas), a ampliação da análise citogenética básica (contagem ampliada para 50 metáfases) ou o estudo citogenético molecular por meio de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) com sondas de X e Y em metáfases e(ou) núcleos interfásicos de linfócitos e(ou) de mucosa oral foram realizados para pesquisa de mosaicismo com linhagem 45,X.

A FISH também foi realizada em outros pacientes com cariótipo 46,XY que ainda estivessem em acompanhamento em nosso serviço e nos quais não tivesse sido detectada, no início do trabalho, mutação em algum gene participante da diferenciação testicular. Buscou-se, com isso, reduzir ainda mais a probabilidade de que houvesse uma linhagem 45,X em mosaico, mesmo na ausência de sinais clínicos sugestivos (Figura 4).

- *Preparação cromossômica*

Foi feita de modo idêntico ao empregado para realização do cariótipo de rotina nos pacientes atendidos neste serviço, pelo Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética Médica da FCM. Este exame foi realizado por meio de punção venosa com coleta de sangue periférico em frasco heparinizado, após assepsia local com álcool iodado ou álcool 70%.

Foram adicionadas de 25 a 30 gotas de sangue total heparinizado a frascos de cultura contendo 5 ml de meio de cultura (RPMI) com 15% de soro fetal bovino e 0,1ml de fitohemaglutinina. Os frascos de cultura foram colocados em estufa a 37°C por 72 horas. Duas horas antes do fim deste período, foram acrescentadas uma gota de brometo de etídio 1mg/ml e duas gotas de colquicina  $4 \times 10^{-5}M$  ao meio de cultura. As células foram utilizadas de imediato para aumento da contagem de células no cariótipo e(ou) estocadas em solução de metanol + ácido acético (3:1) à temperatura de -20°C para depois serem utilizadas para preparação de lâminas para o emprego da técnica de FISH.

- *Aumento da contagem de células no cariótipo*

Ao final do período de incubação, foi realizada a hipotonia progressiva utilizando solução hipotônica de KCl 0,075M a 37°C. Após a hipotonia foi realizada a fixação utilizando como fixador metanol + ácido acético (3:1).

Nos casos em que se optou por aumento da contagem de células do exame de cariótipo, 3 a 4 gotas do material, após fixação, foram pingadas sobre lâminas para microscopia. Para a obtenção de bandas G, as lâminas foram incubadas em tampão fosfato 0,06 M pH 6,8 em banho-maria a 37°C por um período que variou de 10 a 60 minutos. Após incubação as lâminas foram coradas com o corante Wright diluído em tampão fosfato na proporção de 1:3 por 3 a 6 minutos. A análise cromossômica foi realizada ao microscópio óptico comum.

- *Hibridação in situ*

A técnica de FISH baseia-se na capacidade de hibridação de sondas de DNA, marcadas por fluorescência, às sequências que lhes são complementares no DNA genômico, permitindo sua visualização e análise. Essas sondas, altamente específicas, podem ser utilizadas para o estudo de um sítio específico no cromossomo, ou para identificação de um cromossomo inteiro. Neste trabalho foram

utilizadas sondas tipo alfa-satélite específicas para as regiões centroméricas dos cromossomos X (DXZ1, marcada em verde) e Y (DYZ3, marcada em vermelho) (Vysis, Inc., Downers Grove, IL). A visualização dos sinais foi feita em microscópio de epifluorescência Olympus (BX51-BF-II/BX2 ®) utilizando um sistema automático de análise de imagem.

Para a realização da técnica foram utilizadas as suspensões de linfócitos de sangue periférico estocadas em solução de metanol e ácido acético 3:1 a -20°C. De 3 a 4 gotas de cada material foram pingadas sobre lâminas para microscopia. Antes do procedimento, as lâminas permaneceram à temperatura ambiente em média por 24 horas. Em seguida foram incubadas a 37°C por 2 horas em solução de 2XSSC (pH 7,0). Na sequência, as lâminas foram colocadas em ácido acético 70% e depois em solução PBS1X por 1 minuto e então lavadas em solução de PBS1X 3 vezes por 4 minutos cada. Logo após, passaram por re-hidratação em uma série de etanóis (70%, 85% e 100%) e depois foram lavadas em solução de PBS1X. Na sequência, foram incubadas à temperatura ambiente por 6 minutos em solução de 1% formaldeído/ PBS. Depois, as lâminas foram lavadas em solução de PBS1X e novamente passadas na série de etanóis.

Após esta etapa, as sondas foram aplicadas em uma área previamente selecionada e marcada com caneta diamante, e a área de hibridação foi coberta com uma lamínula e selada com cola especial (*rubber cement*). Em seguida, as lâminas foram incubadas a 75°C por 10 minutos para a desnaturação dos cromossomos e do DNA da sonda. A hibridação ocorreu em caixa umedecida a 37°C por 16 horas. Após a hibridação, as lâminas passaram por um processo de lavagem rápida que utilizou as soluções 0,4XSSC/0,3% Tween 20 a 73 °C e 2X SSC/0,1% Tween 20. Em seguida, o DAPI contra-corante foi aplicado e após 10 minutos a análise foi feita em microscópio de fluorescência.

- Mucosa oral

Para a realização da FISH em mucosa oral, as células da mucosa bucal foram coletadas com uma haste de madeira das laterais internas da bochecha. A amostra foi colocada imediatamente em tubo contendo solução salina estéril, o qual foi centrifugado três vezes com salina e mais três vezes com solução fixadora (3:1 de metanol e ácido acético). Após 24 horas, as amostras foram pingadas em lâminas e

armazenadas em estufa 65°C por 2 horas. As lâminas foram previamente avaliadas em microscópio de fase para seleção da área de hibridação.

Após essa etapa, foram colocadas em solução de 2xSSC a 73°C por 2 minutos, e colocadas em solução contendo pepsina (SIGMA®) 0,005% em 10 mM HCl a 37°C por 40 minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes no tampão PBS 1X, deixadas em solução de PBS 1x/formol puro por 5 minutos e passadas novamente duas vezes no tampão PBS 1X.

Após essas etapas, as lâminas foram passadas em três concentrações de etanóis gelados (70%, 85% e 100%) por 1 minuto cada. Na fase de pré-desnaturação, as lâminas foram deixadas em solução de 2xSSC/formamida 70% por 2 minutos a 72°C e novamente passadas por 1 minuto em cada concentração de etanol gelado (70%, 85% e 100%). Após a secagem das lâminas, foram colocados 10µl de sonda na região selecionada e esta foi coberta com uma lamínula. Para hibridação, as lâminas foram colocadas na chapa aquecedora a 73°C por 10 minutos e logo depois foram armazenadas em caixas úmidas e escuras por aproximadamente 20 horas a 65°C.

Para a lavagem foi necessário retirar as lamínulas e deixar as lâminas na solução de 2xSSC/0,05% tween 20 a 37°C por 5 minutos, na solução 0,4xSSX/0,15% tween 20 a 73°C por 2 minutos, passá-las em seguida em 2xSSC/0,05% tween em temperatura ambiente e posteriormente em água milique. Após a secagem das lâminas, foram colocados 10µl de DAPI e as regiões selecionadas foram cobertas com lamínulas.

A análise das lâminas, tanto de linfócitos quanto de mucosa oral, foi realizada em microscópio de fluorescência BX51-BF-II/BX2 da Olympus® com filtros de fluorescência adequados e as imagens foram capturadas utilizando o software FISHView da Applied Spectral Imaging®. Buscou-se analisar 1000 núcleos interfásicos de linfócitos e mucosa oral de cada um dos pacientes.

- Critérios diagnósticos

A presença de mosaicismos com linhagem 45,X foi definida pela identificação de três ou mais metáfases com essa constituição cromossômica e(ou) mais de 1,3% de núcleos de linfócitos mostrando apenas o sinal correspondente ao cromossomo X (cor verde) (111).

#### IV.4.2 Análise clínica

Os dados clínicos foram obtidos por meio do levantamento dos arquivos do Departamento de Genética da FCM-UNICAMP e dos prontuários do HC - UNICAMP. Foram obtidos os seguintes dados, anotados em um protocolo previamente elaborado (Anexo 1) e posteriormente digitados em planilha Excel®:

1. *Dados gerais* (identificação e antecedentes gestacionais, neonatais e familiares):

- Idade na primeira consulta e na última avaliação (em anos);
- Sexo social na primeira consulta (masculino, M, feminino, F, ou indefinido);
- Sexo social definitivo (M ou F);
- Idade materna e paterna ao nascimento (em anos);
- Intercorrências gestacionais (como sangramento uterino, hiperêmese gravídica, hipertensão arterial, quadros febris, enfermidades agudas e crônicas, uso de medicações potencialmente teratogênicas, exposição a radiação ionizante);
- Tempo de gestação (pré-termo, termo ou pós-termo);
- Peso ao nascer (em g);
- Comprimento ao nascer (em cm);
- Consanguinidade entre os pais;
- Recorrência familiar de ambiguidade genital.

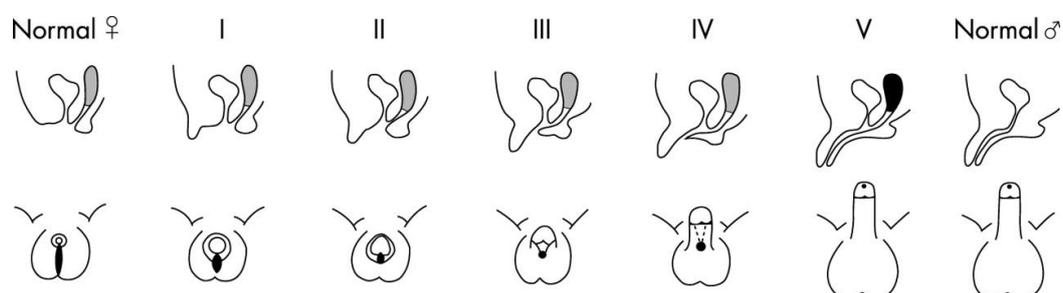
2. *Anomalias genitais internas e externas*:

A presença de derivados de Müller (útero ou hemi-útero e trompas) foi avaliada por meio do resultado de exames de imagem, como ecografia pélvica (ao menos dois exames com visualização dessas estruturas) e genitografia, bem como pelo relato da inspeção da cavidade pélvica durante procedimentos cirúrgicos (laparoscopia ou laparotomia).

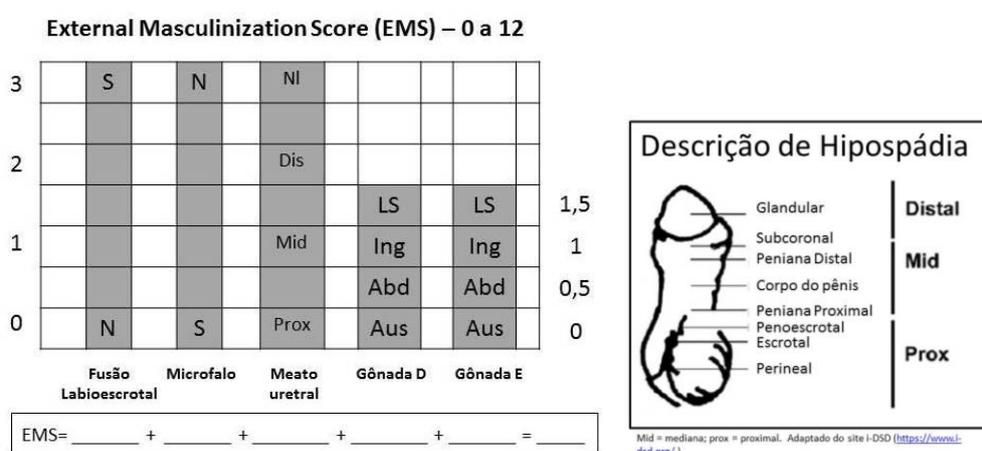
Os genitais externos foram avaliados por meio do tamanho do falo, da localização do meato uretral, do grau de fusão das saliências lábio-escrotais, da presença de introito vaginal e da localização das gônadas. Com base nessas características, os genitais externos foram classificados de acordo com:

- Localização e lateralidade das gônadas;
- Estadiamento de Prader (114), que varia de I a V (Figura 2);

- Escore de masculinização da genitália externa ou EMS (115), que varia de zero a 12 (Figura 3).



**Figura 2: Classificação de Prader – adaptada de Ogilvy-Stuart et al, 2004 (116).**



**Figura 3: Cálculo do EMS (External Genital Masculinization Score)**

### 3. Histologia das gônadas

Foi anotado o resultado do exame histopatológico das gônadas, obtido por meio de biópsia ou gonadectomia. Nos casos em que a avaliação histológica havia sido realizada no HC-Unicamp (25 casos de DGP e 18 casos de DGM), as lâminas foram revistas pela aluna durante estágio de Doutorado Sanduíche na Divisão de Endocrinologia Pediátrica e Diabetes do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina e Hospital Universitário Schleswig-Holstein da Universidade de Lübeck (Alemanha), sob a supervisão do chefe do serviço (Prof. Dr. Olaf Hiort), do pesquisador responsável pelo laboratório molecular (Dr. Ralf Werner) e da patologista responsável por aquele serviço (Dra. Konstanze Holl-Ulrich), além da Prof. Dr. Martine Cools, da Universidade de Gante, num trabalho de colaboração (STSM – short term scientific mission).

A histologia gonadal foi então classificada (sempre que possível, de acordo com os achados histológicos obtidos na Alemanha) em gônada em fita, testículo (disgenético ou histologicamente normal – esses últimos praticamente restritos a laudos de pacientes cujas lâminas de biópsia não puderam ser obtidas para revisão) ou ausência de tecido gonadal. Foram anotados ainda os casos em que havia tecido gonadal indiferenciado associado à gônada em fita ou a testículo.

Em relação aos achados gonadais, levou-se em conta tanto a histologia quanto a lateralidade (achados histológicos das gônadas direita e esquerda).

#### 4. *Função Gonadal*

- Concentrações hormonais

Foram obtidos os resultados de exames hormonais durante todo o período em que os pacientes foram acompanhados em nosso serviço – no início da investigação (em todos os casos) e durante o seguimento (nos pacientes que permaneceram no serviço e não foram submetidos à gonadectomia bilateral).

A mensuração das concentrações de gonadotrofinas (hormônio folículo-estimulante, FSH, e hormônio luteinizante, LH) e de testosterona foi realizada por meio da técnica de radioimunoensaio até 1990 e de enzimo-imunoensaio (EIE/Elisa) a partir de então.

Considerou-se como faixa de normalidade de FSH para o sexo masculino, púberes (com idade maior ou igual a 15 anos) ou na fase de minipuberdade (de 30 a 180 dias de vida, quando o eixo hipotálamo-hipófise gônada se comporta de modo similar ao do período puberal) (113) de 1,5 a 12,4 mUI/mL, de LH 1,7 a 8,6 mUI/mL e de testosterona total de 2,86 a 8,10 ng/mL.

A avaliação da produção de testosterona em pacientes pré-púberes com mais de seis meses de vida foi feita por meio do teste de estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG), que atua nas células de Leydig por meio do mesmo receptor do hormônio hipofisário LH. Existem vários protocolos para a realização deste teste; em nosso serviço, o protocolo utilizado foi o da injeção intramuscular de 1500 a 2500 UI de hCG por dia durante três dias, comparando a concentração sérica basal de testosterona total com aquela obtidas 24h após a terceira injeção. Foi considerado como resposta normal o aumento na concentração de testosterona superior a 1,5 ng/mL da testosterona em relação à concentração basal.

- Puberdade espontânea

Foi avaliada – nos pacientes que não haviam sido submetidos à gonadectomia bilateral – por meio de:

- Idade de surgimento dos primeiros sinais puberais (considerada normal se entre 9 e 13,5 anos de idade) (117);
- Progressão da puberdade até o último estágio de Tanner (118) (se espontânea ou induzida);
- Presença de ginecomastia.

- Perspectiva de fertilidade espontânea

Nos pacientes púberes criados no sexo masculino com preservação de um ou ambos os testículos a perspectiva de fertilidade espontânea foi avaliada por meio do espermograma, usando como referência a 5ª edição do “World Health Organization - WHO laboratory manual for the examination of human semen” (119). Nesse exame foram avaliados:

- Volume do ejaculado (valor de referência, VR: >1,5 mL), com base no qual os pacientes foram classificados como portadores de hipoespermia, normoespermia ou hiperespermia;

- Contagem de espermatozoides (VR: >15 milhões/mL), com base na qual os pacientes foram classificados como portadores de azoospermia, oligospermia, normospermia ou poliespermia;

- Mobilidade total (VR: >40%) e mobilidade progressiva [VR: rápidos (grau a) + lentos (grau B) >32%], com base nas quais os pacientes foram classificados como portadores de motilidade normal ou astenospermia;

- vitalidade (VR: >58% vivos), com base na qual os pacientes foram classificados como portadores de vitalidade normal ou necrospermia;

- morfologia (VR: >4% normais), com base na qual os pacientes foram classificados como portadores de morfologia normal ou teratospermia.

Nos casos em que não foi possível obter um espermograma, o prognóstico em relação à fertilidade futura foi estimado com base somente nos níveis séricos de FSH.

### 5. *Crescimento:*

Foi levantado todo o histórico de crescimento contido no prontuário, dando ênfase às medidas de altura ao diagnóstico e na última consulta. No caso de pacientes que faziam uso de hormônio de crescimento, foi anotada a altura na consulta que antecedeu o início da terapia.

Para a medida da altura, em nosso serviço, emprega-se um antropômetro vertical, construído em madeira, com 230 cm de comprimento. A altura é medida estando as pacientes com os pés juntos e as plantas totalmente apoiadas na base e com os calcanhares, glúteos, ombros e cabeça apoiados no plano vertical do antropômetro. O examinador posiciona a cabeça do paciente de modo que um plano horizontal passe pelas fendas palpebrais e condutos auditivos e, segurando com a mão esquerda a mandíbula, faz uma leve tração para cima enquanto com a mão direita desce a peça cefálica até apoiá-la no ponto mais alto da cabeça, realizando a leitura na escala em cm e mm (120).

Os dados de estatura foram transformados em desvios-padrão da média (escore z) por meio do software SISCREs (121), que usa como referência os dados do NCHS 2000 (122). Foi considerada altura final quando a velocidade de crescimento era menor ou igual a 0,5 cm/ano, tendo o paciente completado a puberdade (ao menos estágio 4 de Tanner) e(ou) idade óssea maior do que 18 anos.

Assim, as variáveis analisadas neste trabalho foram o escore-z da última altura na amostra como um todo e naqueles que chegaram a atingir a altura final. Além disso, foi avaliada também a presença ou ausência de baixa estatura, considerada presente quando o z-score da última altura (nos pacientes que ainda não haviam completado o crescimento) ou da altura final (nos pacientes que já haviam completado o crescimento) estava abaixo de -2,5 desvios-padrão.

### 6. *Anomalias associadas*

Foi avaliada a presença de anomalias associadas que já haviam sido referidas ou detectadas na primeira consulta, bem como aquelas detectadas durante o seguimento, incluindo:

- Atraso no desenvolvimento neuromotor e(ou) dificuldade escolar (relatada pela família);

- Dismorfismos;
- Malformações – incluindo anomalias viscerais diagnosticadas durante o acompanhamento clínico, como cardiopatias congênitas (resultado de ecocardiograma) e anomalias renais e de vias urinárias (resultado de ultrassonografia pélvica);
- Outras comorbidades, como doenças tireoidianas, obesidade e neoplasias (gonadais e extra-gonadais).

#### **IV.4.3 Análise estatística**

Os dados organizados em planilhas Excel foram posteriormente transportados para o *software* SPSS versão 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, USA) para análise estatística. A análise dos dados constou da comparação entre os grupos de DG Mista e DG Parcial XY por meio do teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher (variáveis discretas) e por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney (variáveis contínuas). A busca de associação entre características das gônadas (posição, tipo histológico) e sua lateralidade (direita ou esquerda) também foi feita por meio do teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

#### **IV.4.4 Aspectos Éticos e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

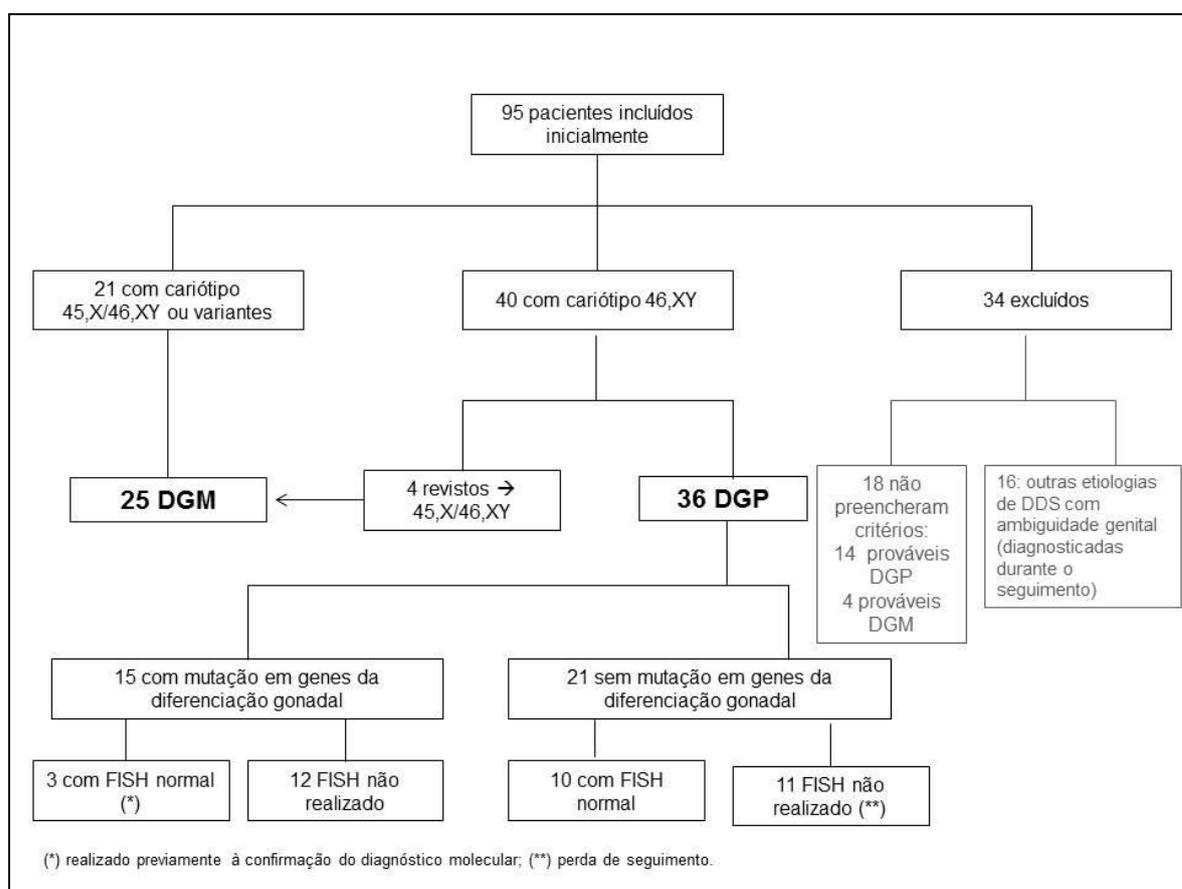
O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/Unicamp, processo 1194/2010 (Anexo 2). Por ser baseado em dados clínicos e laboratoriais cuja obtenção faz parte da rotina de diagnóstico e acompanhamento do serviço, e pelo fato de somente esses dados terem sido obtidos dos pacientes que não mais estavam em acompanhamento no HC da UNICAMP, foi solicitada dispensa de obtenção de consentimento informado dos pacientes ou de seus responsáveis nesses casos.

Por outro lado, o estudo contemplou também a realização do exame de FISH em pacientes com diagnóstico de DG Parcial XY que ainda estavam sendo seguidos. Nesses casos foi solicitada autorização dos pacientes (ou dos pais ou responsáveis) por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 3).

O sigilo das informações foi mantido mediante a criação de um número para a identificação de cada um dos pacientes, preservando sua privacidade, conforme as normas da Declaração de Helsinque.

## V. RESULTADOS

Dos 95 pacientes que constavam inicialmente da casuística do GIEDDS, 34 foram excluídos por não preencherem os critérios de elegibilidade deste trabalho (Figura 4). Dentre os demais (61), 40 tinham cariótipo 46,XY, tendo sido classificados como portadores de DG Parcial, e 21 apresentavam mosaico 45,X/46,XY ou suas variantes.



**Figura 4: Fluxograma da casuística.**

Em quatro dos 40 casos cujo cariótipo na primeira avaliação era 46,XY a análise citogenética foi ampliada devido à presença de sinais clínicos compatíveis com a síndrome de Turner (baixa estatura, baixa velocidade de crescimento e/ou anomalias congênitas). Nesses casos o mosaicismo foi detectado por meio do aumento do número de células analisadas no cariótipo convencional (três casos: M06, M13 e M16) ou por hibridação *in situ* com fluorescência em núcleos de mucosa oral (FISH – *Fluorescent in situ hybridization*) usando sondas centroméricas de X e Y

(CytocellVysis, Inc., Downers Grove, IL) (um caso – M09). Esses quatro casos se somaram aos 21 pacientes com diagnóstico prévio de disgenesia gonadal mista, perfazendo um total de 25.

Em outros 13 pacientes cujo cariótipo era 46,XY e que ainda estavam em acompanhamento em nosso serviço foi possível realizar FISH com sondas de X e Y em metáfases e(ou) núcleos interfásicos de linfócitos, de forma a reduzir ainda mais a probabilidade de que houvesse uma linhagem 45,X em mosaico. Em nenhum deles essa linhagem foi detectada.

Assim, após a ampliação do estudo citogenético foi possível obter uma amostra total de 61 pacientes (Tabela 1), sendo 36 pacientes com DG Parcial XY (Quadro 3) e 25 com disgenesia gonadal mista (Quadro 4).

Dos 36 pacientes com DG Parcial, a análise molecular rotineiramente realizada no Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello revelou mutações em 15 casos: no gene *SRY* em dois pacientes (P14a e P14b, irmãos) (123), no *WT1* em outros dois (pacientes P12 e P18) (84) e no *NR5A1* em 11 pacientes: P01; P09; P13a; P15; P19a, P19b e P19c (irmãos); P21; P22; P27 e P32 (124). Além disso, é provável que o paciente 13b, primo de 13a, também tenha mutação no gene *NR5A1*, que não pode ser comprovada por não haver DNA disponível e o paciente não ser mais seguido em nosso serviço. De todo modo, considerando um total de 32 famílias, 12 (37%) tinham diagnóstico molecular definido, nove (28%) por mutações no *NR5A1*. Um paciente (P26) apresentava um quadro sintomático de etiologia indefinida. Os demais (19 pacientes) não apresentavam mutações nesses genes e nem quadro sintomático associado à disgenesia testicular, sendo classificados como Idiopáticos.

Em alguns pacientes foram pesquisadas também mutações em outros genes sabidamente participantes da diferenciação sexual (como *DMRT4*) e, em casos específicos, em outros genes (como o gene do receptor LH/hCG, *SOX3* e genes relacionados à Síndrome de Kallman). Também foi empregada a técnica de MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*), que detecta pequenas duplicações ou deleções, para detecção de alterações subteloméricas (paciente P26) e também para avaliação dos genes *SOX9*, *SRY*, *WNT4*, *NR5A1*, e *NR0B1*; em todos os casos o resultado foi normal.

Os pacientes com diagnóstico de DG Parcial foram incluídos num mesmo grupo e comparados com aqueles pacientes com diagnóstico de DG Mista.

**Tabela 1:Diagnóstico etiológico dos pacientes incluídos na casuística**

<b>DIAGNÓSTICO</b>	<b>N(%)</b>
<b>DG mista</b>	<b>25 (41)</b>
<b>DG parcial XY</b>	<b>36 (59)</b>
Idiopático	19 (53)
Por mutação em genes da diferenciação testicular	16 (44)
Sindrômico	1 (3)
<b>Total</b>	<b>61</b>

**Quadro 3: Características citogenéticas e moleculares dos 36 pacientes com diagnóstico de disgenesia gonadal parcial XY.**

Paciente	Cariótipo (no. de células)	FISH de metáfases	FISH de núcleos interfásicos	Estudo Molecular com resultado positivo
P01	46,XY [ND]	-	-	NR5A1: mutação p.Ser32Asn (heterozigose)
P02	46,XY[16]	46,XY.ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[111]	nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×1)[515]	-
P03	46,XY [ND]	-	-	-
P04	46,XY[49]	-	-	-
P05	46,XY [ND]	-	-	-
P06	46,XY[16]	46,XY.ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[124]	nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×1)[497]	-
P07	46,XY [ND]	-	-	-
P08	46,XY[32]	46,XY.ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[269]	nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×1)[1000]	-
P09	46,XY[16]	-	-	NR5A1: Mutação p.Asp293Asn (homozigose)
P10	46,XY[16]	-	-	-
P11	46,XY[32]	46,XY.ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[184]	nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×1)[1006]	-
P12	46,XY[32]	46,XY.ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[262]	nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×1)[1064]	WT1: mutação p.Gln187Argfs*99 (heterozigose)
P13a	46,XY[32]	46,XY.ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[261]	nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×1)[1046]	NR5A1: mutação p.Lys38* (heterozigose)
P13b	46,XY[16]	-	-	-
P14a	46,XY[32]	-	-	SRY: mutação p.Arg30Ile
P14b	46,XY[16]	-	-	SRY: mutação p.Arg30Ile
P15	46,XY [ND]	-	-	NR5A1: mutação - p.Leu80Trpfs*8 (heterozigose)
P16	46,XY[16]	-	-	-
P17	46,XY[100]	46,XY.ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[299]	nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×1)[1108]	-
P18	46,XY[16]	-	-	WT1: mutação p.Asp396Asn (heterozigose)
P19a	46,XY[16]	-	-	NR5A1: mutação p.Cys65Tyr (heterozigose)
P19b	46,XY[16]	-	-	NR5A1: mutação p.Cys65Tyr (heterozigose)
P19c	46,XY[16]	-	-	NR5A1: mutação p.Cys65Tyr (heterozigose)
P20	46,XY[50]	-	-	-
P21	46,XY[15]#	46,XY.ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[271]	nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×1)[1051]	NR5A1: mutação c.1138+1G>T (heterozigose)
P22	46,XY[16]	-	-	NR5A1: mutação p.Cys247* (heterozigose)
P23	46,XY[16]	46,XY.ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[258]	nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×1)[1032]	-
P24	46,XY[11]*	-	-	-
P25	46,XY[36] #	-	-	-
P26	1º: 46,XY[16] 2º: 46,XY [100]	46,XY.ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[200]	-	-
P27	46,XY[50]	-	-	NR5A1: Mutações c.-133G>A e p.Asp364ThrfsX37
P28	46,XY[20]#	46,XY.ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[254]	nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×1)[1026]	-
P29	46,XY[50]	-	-	-
P30	46,XY[50]	46,XY.ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[228]	nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×1)[1006]	-
P31	46,XY[50]	46,XY.ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[84]	nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×1)[1097]	-
P32	46,XY,16qh+[20]	-	-	NR5A1: mutação p.Lys396Argfs*34

#exame realizado em laboratório externo à Unicamp; \* exame realizado no laboratório de citogenética do CAISM – Unicamp; (-): não realizado; [ND] = não disponível.

**Quadro 4: Características citogenéticas e moleculares dos 25 pacientes com diagnóstico de disgenesia gonadal mista.**

Pacien te	Cariótipo inicial	Cariótipo (repetição)	FISH de metáfase	FISH de núcleos interfásicos de mucosa oral	Estudo molecular com resultado positivo
<b>M01</b>	45,X[4]/46,XY[32]	-	-	-	-
<b>M02</b>	45,X/46,X,i(Y)(q10)/46, X,r(?Y)/47,X,i(Y)(q10),+ r(?Y)/47,XXY [ND]	-	-	-	-
<b>M03</b>	45,X[9]/46,XY[23]	-	-	-	SRY: normal MLPA*: SRY, ZFY, UTY, SOX9, WNT4, NR0B1, NR5A1 = normal
<b>M04</b>	45,X[3]/46,XY[17]	-	-	-	-
<b>M05</b>	45,X[10]/46,XY[22]	-	-	-	-
<b>M06</b>	46,XY[16]	45,X[7]/46,XY[93]	-	-	-
<b>M07</b>	45,X[9]/46,X,+mar[41]#	-	45,X.ish (DXZ1×1)[ ]/ 46,X,+mar.ish idic(Y)(q11) (DXZ1×1,DYZ3×2)[ ]	-	-
<b>M08</b>	45,X[28]/46,XY[22]	-	-	-	-
<b>M09</b>	46,XY[50]	-	45,X.ish (DXZ1×1)[15]/ 46,XY.ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[129]	nuc ish(DXZ1×1)[234]/ nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×1)[7 66]	-
<b>M10</b>	45,X[46]/46,X,+mar[4]	-	-	-	sequências de Yq proximais positivas SRY: negativo MLPA*: SRY, ZFY, UTY = negativo MLPA*: SOX9, WNT4, NR0B1, NR5A1 = normal
<b>M11</b>	45,X[19]/46,X,+mar[11]	46,X,+mar[50]	-	-	sequências de Yp e centrômero positivas SRY: positivo MLPA*: SRY, ZFY, UTY = diminuído indicativo de mosaicismo MLPA*: SOX9, WNT4, NR0B1, NR5A1 = normal
<b>M12</b>	45,X[6]/46,XY[14]#	-	-	-	-
<b>M13</b>	46,XY[16]	45,X[1-0]/46,XY[40]	-	-	SRY: positivo sequências de Yp e Yq proximais positivas (AZFa) sequências de Yq distais negativas (AZFb e AZFc)
<b>M14</b>	45,X[16]/46,XY[34]	-	-	-	-
<b>M15</b>	45,X[34]/46,XY[16]	-	-	-	MLPA*: SRY, ZFY, UTY = diminuído indicativo de mosaicismo MLPA*: SOX9, WNT4, NR0B1, NR5A1 = normal
<b>M16</b>	46,XY [ND]	45,X[12]/46,X,+mar[38]	-	-	SRY: positivo sequências de Yp e Yq proximais positivas (AZFa e AZFb) sequências de Yq distais negativas (AZFc)
<b>M17</b>	45,X[10]/46,X,del(Y)(q1 2)[40]	45,X[16]/46,XY[34]	-	-	-

Pacien te	Cariótipo inicial	Cariótipo (repetição)	FISH de metáfase	FISH de núcleos interfásicos de mucosa oral	Estudo molecular com resultado positivo
<b>M18</b>	45,X[43]/46,X,+mar[7]	45,X[10]/46,X,del(Y)(q12)[40]	-	-	SRY: positivo sequências de Yp e Yq proximais positivas (AZFa) sequências de Yq distais negativas (AZFb e AZFc)
<b>M19</b>	46,X,i(Y)(q10)[23]/45,X[20]/47,X,i(Y)(q10)×2[7]	-	-	-	MLPA*: SRY, ZFY, UTY = duplicado indicativo de 2 cromossomos Y MLPA*: SOX9, WNT4, NR0B1, NR5A1 = normal
<b>M20</b>	45,X[29]/46,X, idic(Y)(q11)[21]	-	-	-	-
<b>M21</b>	45,X[12]/46,XY[20]	-	45,X.ish (DXZ1×1)[26]/ 46,XY.ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[224]	nuc ish(DXZ1×1)[98]/ nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×1)[1009]	MLPA*: SRY, ZFY, UTY, SOX9, WNT4, NR0B1, NR5A1 = normal
<b>M22</b>	45,X/46,X,+mar/47,X,+ 2mar [ND]	-	-	-	-
<b>M23</b>	45,X[33]/46,XY[17]	-	-	-	-
<b>M24</b>	45,X[7]/46,XY[43]	-	-	-	-
<b>M25</b>	45,X[8]/46,X,+mar[27]/4 7,X,+2mar[15]	-	-	-	-

#exame realizado em laboratório externo à Unicamp; \*MLPA = *multiplex ligation probe amplification*, analisa a variação no número de cópias; (-): não realizado; [ND] = não disponível.

## V.1 DADOS GERAIS E HISTÓRIA CLÍNICA

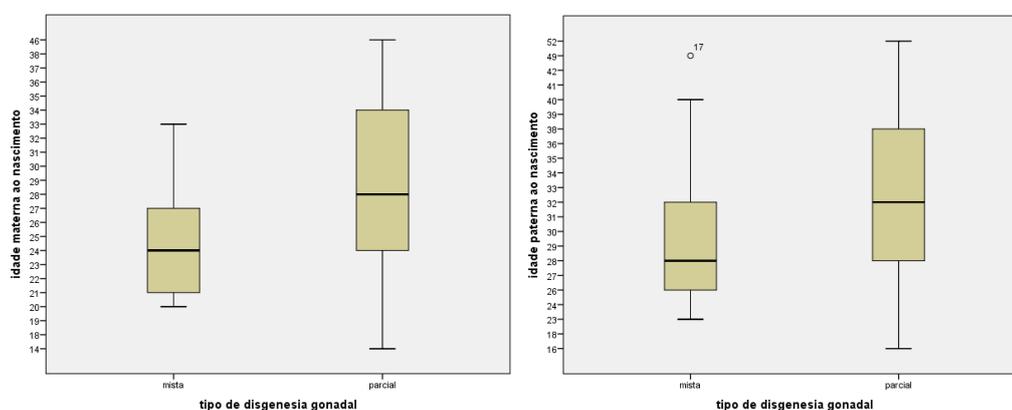
A média de idade na primeira consulta não diferiu nos dois grupos, sendo de 3,8 anos na DGM [variando de 0,02 a 42 anos, desvio-padrão (DP) de 9,19] e 2,58 anos na DGP (variando de 0,02 a 27 anos, DP = 5,68) ( $p=0,434$ ). No entanto, quando separamos os pacientes por década de nascimento, observamos que, ao longo das décadas, os pacientes passaram a ser encaminhados numa faixa etária cada vez mais jovem (Tabela 2).

Na primeira consulta, 11 pacientes com DG Mista já haviam sido registrados no sexo masculino, três no feminino e 10 ainda não tinham registro civil (em um dos pacientes, não havia relato do sexo inicial no prontuário). Nos pacientes com DG Parcial eram 13, sete e 16, respectivamente ( $p=0,676$ ). Após a avaliação em nosso serviço, o sexo final de criação foi, no grupo da DG Mista, masculino em 14 casos e feminino em 11, diferindo significativamente do grupo das DG Parciais, no qual a razão de sexo foi 29M:6F ( $p=0,023$ ). Um dos pacientes com DG Parcial não retornou ao serviço; não há, portanto, informações sobre o sexo definitivo.

Tabela 2: Idade da primeira consulta por década de nascimento

Faixa etária	Até 1980	1981-1990	1991-2000	2001-2013	Total
RN (até 28 dv)	0	0	6	11	17
Lactente (29dv-2a)	0	5	14	9	28
Pré-escolar / Escolar (2-12a)	1	2	1	5	9
Adolescente (12-18a)	0	1	3	0	4
Adulto (>18a)	3	0	0	0	3
<b>TOTAL</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>61</b>

A média da idade materna entre 34 casos de DGP (28,47 anos; DP=7,0) foi significativamente superior à de 23 casos de DGM (24,83 anos; DP=3,8) ( $p=0,029$ ). Já a média da idade paterna na DGP (32 anos; DP=7,15;  $n=35$ ), embora também superior à dos casos de DGM (29,9 anos; DP=6,05;  $n=24$ ), não diferiu significativamente desta ( $p=0,095$ ) (Figura 5).



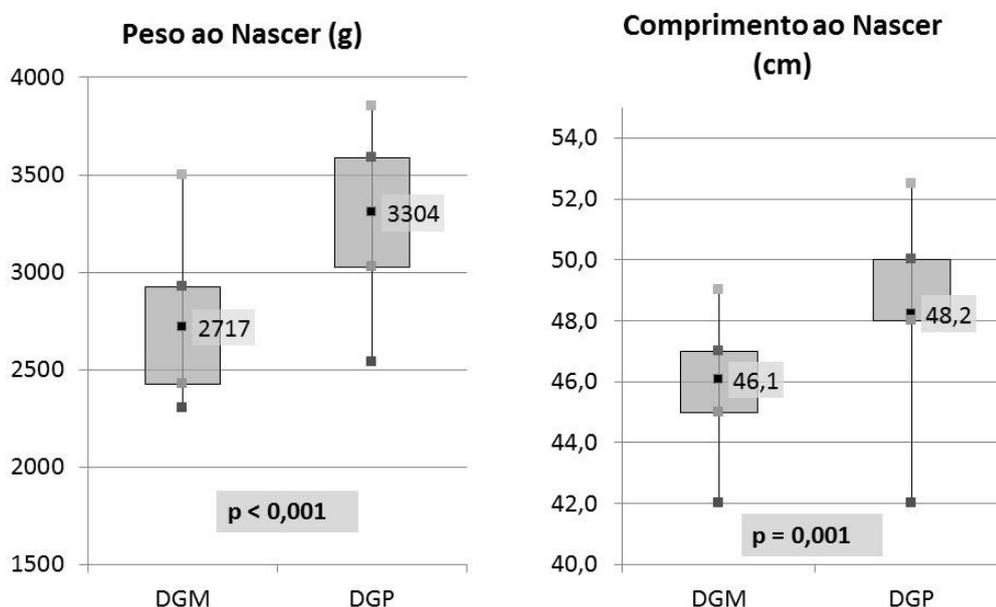
**Figura 5: Boxplot das idades materna e paterna ao nascimento (em anos) segundo o tipo de disgenesia gonadal.**

Quando os pacientes foram divididos em grupos de acordo com a idade materna (abaixo e acima de 35 anos, idade em que aumenta o risco de anomalias cromossômicas), observamos que somente no grupo das DG parciais houve mães cuja gestação ocorreu acima dos 35 anos ( $p= 0,056$ ).

**Tabela 3: Distribuição dos pacientes de acordo com a idade materna ao nascimento (acima e abaixo de 35 anos).**

Idade materna ao nascimento	Idade abaixo de 35 anos	Acima de 35 anos	Total
DG Mista	23	0	23
DG Parcial	27	7	34
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>7</b>	<b>57</b>

Houve relato de intercorrências durante a gestação de dez de 23 (43%) pacientes com DG Mista e 16 de 35 (45%) casos de DG Parcial ( $p=0,867$ ). As intercorrências relatadas foram: hipertensão (dez casos, seis de DG Parcial e quatro de Mista), edema (um caso de DG Mista), hemorragia (quatro casos, três de DG Parcial e um de Mista), anemia (um caso de DG Mista), oligoâmnio (um caso de DG Parcial), rotura prematura de bolsa (um caso de DG Mista), ameaça de abortamento (um caso de DG Parcial), infecções que requereram antibioticoterapia (cinco casos, três de DG Parcial e dois de Mista), parto gemelar com morte fetal e trabalho de parto prematuro (um caso de DG Mista), sarampo (um caso de DG Parcial) e hipotireoidismo (um caso de DG Parcial).



**Figura 6 : Boxplot dos valores de peso (em g) e comprimento (em cm) ao nascer dos pacientes nascidos a termo segundo o tipo de disgenesia gonadal.**

Dentre 23 pacientes com DG Mista, três nasceram prematuramente e 20 a termo; dos 36 pacientes com DG Parcial, seis foram prematuros, 29 nasceram a termo e um pós-termo ( $p=0,661$ ).

Dentre 20 pacientes com DG mista nascidos a termo, o peso ao nascimento médio foi de 2717g (DP = 334), significativamente inferior à de 26 casos de DG parcial, também nascidos a termo, nos quais a média foi de 3304g (DP = 352) ( $p<0,001$ ). A média de comprimento ao nascer dos nascidos a termo também diferiu significativamente: foi de 46,06 cm (DP = 1,8) em 16 casos de DG Mista e de 48,23 (DP = 2,1) em 22 casos de DG Parcial ( $p=0,001$ ) (Figura 6).

Quando dividimos o peso ao nascimento dos pacientes nascidos a termo em grupos acima e abaixo de 2500g, observamos que nenhum paciente com diagnóstico de DGP nascido a termo apresentou peso ao nascimento abaixo de 2500g e a diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa ( $p=0,011$ ).

**Tabela 4: Distribuição dos pacientes de acordo com o peso ao nascer (acima e abaixo de 2500g).**

<b>Peso ao nascer</b>	<b>Abaixo de 2500g</b>	<b>Acima de 2500g</b>	<b>Total</b>
<b>DG Mista</b>	6	14	20
<b>DG Parcial</b>	0	26	26
<b>Total</b>	6	40	46

Havia consanguinidade entre os pais em um dos 23 casos de DG Mista em que esta informação estava disponível e em uma das 31 famílias com DG Parcial ( $p=1,000$ ). Houve relato de outros casos de ambiguidade genital na família em três de 23 pacientes com DG Mista e em oito de 32 famílias com DG parcial em que havia essa informação ( $p=0,326$ ). Seis dos oito propósitos com DG Parcial e história familiar positiva tinham mutações já detectadas (quatro no *NR5A1*, uma no *SRY* e uma no *WT1*), incluindo um par de irmãos com mutação no *SRY* e três irmãos com mutação no *NR5A1*.

O resumo dos resultados encontrados nos dados gerais encontra-se na Tabela 5.

**Tabela 5: Dados gerais e de história clínica.**

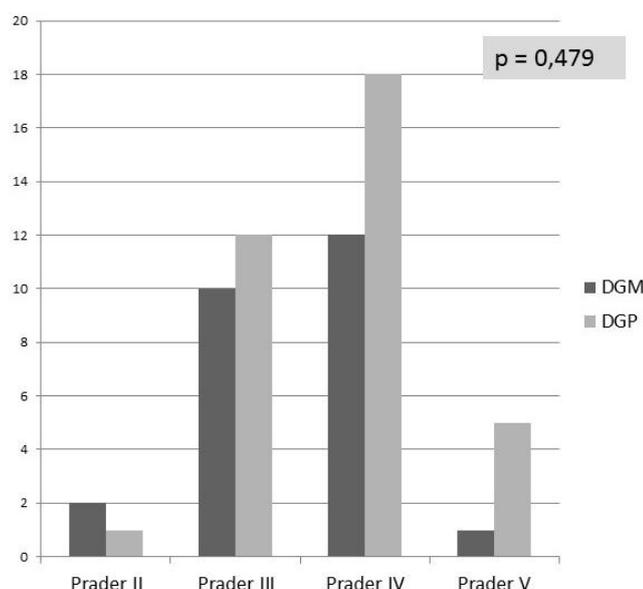
<b>Variável Analisada</b>	<b>DGM</b>	<b>DGP</b>	<b>p-Valor</b>
Idade na primeira consulta (média)	3,8	2,58	0,434
Sexo inicial (M:F:I)	11:3:10	13:7:16	0,676
Sexo final (M:F)	14:11	29:6	<b>0,023</b>
Idade materna (média)	24,8	28,5	<b>0,029</b>
Idade paterna (média)	29,9	32	0,095
Consanguinidade entre os pais	1/23	1/31	1,00
História familiar de AG	3/23	8/32*	0,326
Intercorrências gestacionais	10/23 (43%)	16/35 (45%)	0,867
Nascidos a termo	20/23	29/36	0,661

## V.2 EXAME CLÍNICO

### Genitais externos

Entre os pacientes com DG Mista, dois foram classificados como grau 2 de Prader, dez como grau 3, 12 como grau 4 e um como grau 5. Entre aqueles com DG Parcial, um tinha grau 2, 12 grau 3, 18 grau 4 e cinco grau 5 ( $p=0,479$ ) (Figura 7). Quando foram agrupados os pacientes com genitais menos virilizados (Prader 2 e 3) e com androgenização mais evidente (Prader 4 e 5), a proporção observada na DG Mista (12 e 13, respectivamente) e na Parcial (13 e 23) revelou predominância de genitais mais masculinizados no segundo grupo, porém também sem significância estatística ( $p=0,353$ ).

Também não houve diferença em relação ao grau de androgenização com base no EMS. Este variou de 1 a 8 no grupo das DG Mistas (média= 4,82; DP=2,0) e de 1,5 a 10 nas DG Parciais (média= 5,48; DP = 1,8) ( $p=0,355$ ).



**Figura 7: Distribuição dos pacientes com disgenesia gonadal mista e parcial segundo o estadiamento de Prader.**

### Palpação e localização das gônadas

Os dois grupos também não diferiram em relação à palpação de gônadas. Ambas eram palpáveis em 11 casos de DG Mista e 18 de DG Parcial, e somente uma em oito e dez casos, respectivamente. Nos demais, não havia gônadas palpáveis ( $p=0,895$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6: Palpação de gônadas segundo o tipo de disgenesia gonadal.**

Gônadas	DGM	DGP	Total
Palpáveis bilateralmente	11	18	29
Palpável unilateralmente	8	10	18
Não palpáveis	6	8	14
Total	25	36	61

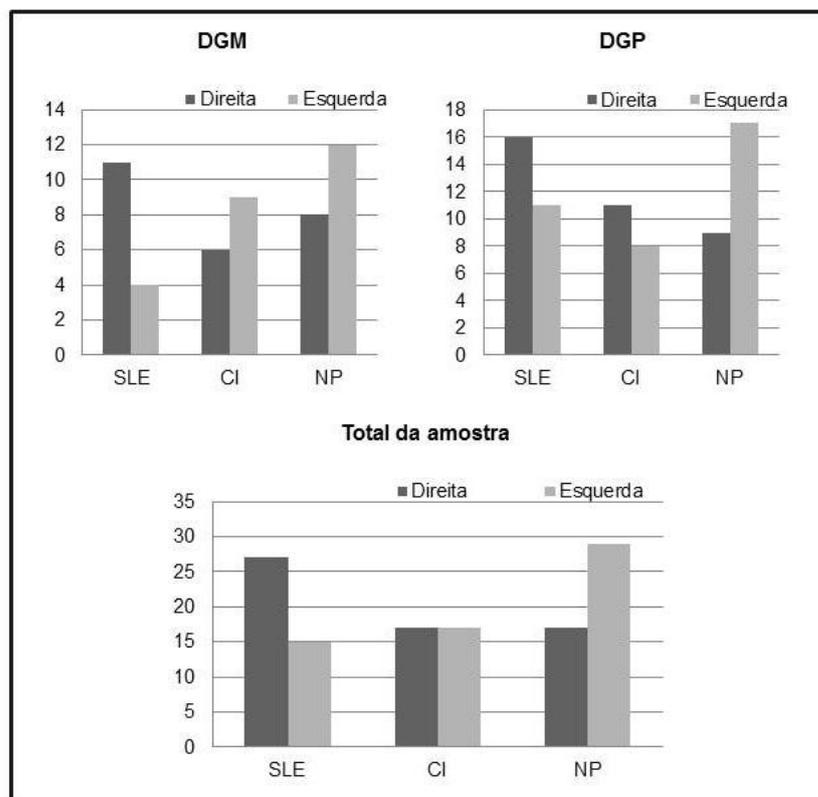
A posição das gônadas (se em saliência lábio-escrotal, canal inguinal ou não palpável) não diferiu nos dois grupos, tanto quando se avalia a gônada direita quanto a esquerda ( $p=0,784$  e  $p=0,320$ , respectivamente) (Tabela 7). Quando se verifica se há associação entre a posição da gônada e a lateralidade, observa-se que,

apesar de uma aparente tendência a haver à direita mais gônadas em saliência lábio-escrotal e à esquerda mais gônadas não palpáveis, essa diferença não é significativa quando se avalia os casos de DG Mista e DG Parcial separadamente ( $p=0,097$  e  $p=0,145$ , respectivamente). Torna-se significativa, porém, quando se analisa os dois grupos em conjunto ( $p=0,038$ ) (Tabela 7, Figura 8).

**Tabela 7: Localização das gônadas segundo o tipo de disgenesia gonadal.**

<i>Gônada</i>	<i>Localização</i>	<i>DGM</i>	<i>DGP</i>	<i>Total</i>
Direita	SLE	11	16	27
	CI	6	11	17
	NP	8	9	17
Esquerda	SLE	4	11	15
	CI	9	8	17
	NP	12	17	29

SLE = saliências labioescrotais; CI = canal inguinal; NP = não palpáveis



**Figura 8: Localização das gônadas segundo a lateralidade (direita ou esquerda) nos casos de disgenesia gonadal mista e parcial e nos dois grupos analisados em conjunto.**

## Genitais internos

Havia útero em 14 de 24 pacientes com DG Mista, proporção significativamente superior à observada entre os casos de DG Parcial (oito de 35 pacientes) ( $p=0,005$ ).

### V.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E CONDUTA CIRÚRGICA

Foi realizada a retirada completa de 19 das 25 gônadas direitas (76%) e 16 das 25 gônadas esquerdas (64%) dos pacientes com DG Mista e sete das 33 gônadas direitas (21%) e 12 das 34 gônadas esquerdas (35%) dos pacientes com DG parcial nos quais essa informação estava disponível. A gonadectomia foi mais frequentemente realizada nos pacientes com DG Mista, tanto à direita ( $p<0,001$ ) quanto à esquerda ( $p=0,029$ ). Nos demais pacientes em que foi realizada análise histopatológica, o material havia sido obtido por biópsia.

**Tabela 8: Resultados do exame anatomopatológico segundo o tipo de disgenesia gonadal e a lateralidade**

<i>Diagnóstico Histológico</i>	<i>Disgenesia Gonadal Mista</i>			<i>Disgenesia Gonadal Parcial</i>			<i>Total</i>
	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>Total</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>Total</i>	
Streak	3	4	7	2	5	7	14
Testículo disgenético	12	10	22	18	16	34	56
Testículo Pré-puberal	3	7	10	3	2	5	15
Testículo pós Puberal	1	0	1	0	0	0	1
Testículo normal	1	0	1	0	0	0	1
Torção testicular	1	0	1	0	0	0	1
Tumor testicular	1	0	1	0	0	0	1
Não avaliado	2	1	3	12	9	21	24
Ausência de tecido gonadal	1	3	4	1	4	5	9
<b>Total</b>	25	25	50	36	36	72	122

A Tabela 8 resume os resultados da avaliação anatomopatológica das gônadas. Quatro delas estavam ausentes em pacientes com DG Mista e cinco em pacientes com DG Parcial, sendo duas à direita e sete à esquerda; nesses casos, a exploração cirúrgica revelou somente derivados de Wolff e Müller. Não havia sido realizada avaliação histológica de três gônadas de pacientes com DG mista e 21 de pacientes com DG Parcial.

Quando se desconsidera as gônadas não avaliadas e as ausentes, a proporção entre gônadas em fita (streak) e testículos (com ou sem disgenesia detectada no exame histológico) não diferiu entre os casos de DG Mista (7 streaks e 36 testículos) e Parcial (7 streaks e 39 testículos) ( $p=0,891$ ). Nove dos 14 streaks situavam-se à esquerda e 40 dos 75 testículos à direita, porém essa diferença não foi significativa ( $p=0,226$ ).

Em 19 casos de DG Mista e 19 de DG parcial a histologia de ambas as gônadas era conhecida. Dentre os casos de DG Mista, sete apresentavam streak associada a testículo disgenético contralateral (diagnóstico histológico tradicional de disgenesia gonadal mista), e os 12 demais apresentavam testículos bilateralmente (diagnóstico histológico tradicional de disgenesia gonadal parcial). Essa proporção foi praticamente idêntica àquela observada entre os casos de DG Parcial: seis e 13, respectivamente ( $p=0,732$ ).

O Apêndice 5 contém imagens que ilustram o aspecto histológico de streaks e testículos disgenéticos de pacientes com DG Mista e Parcial desta amostra.

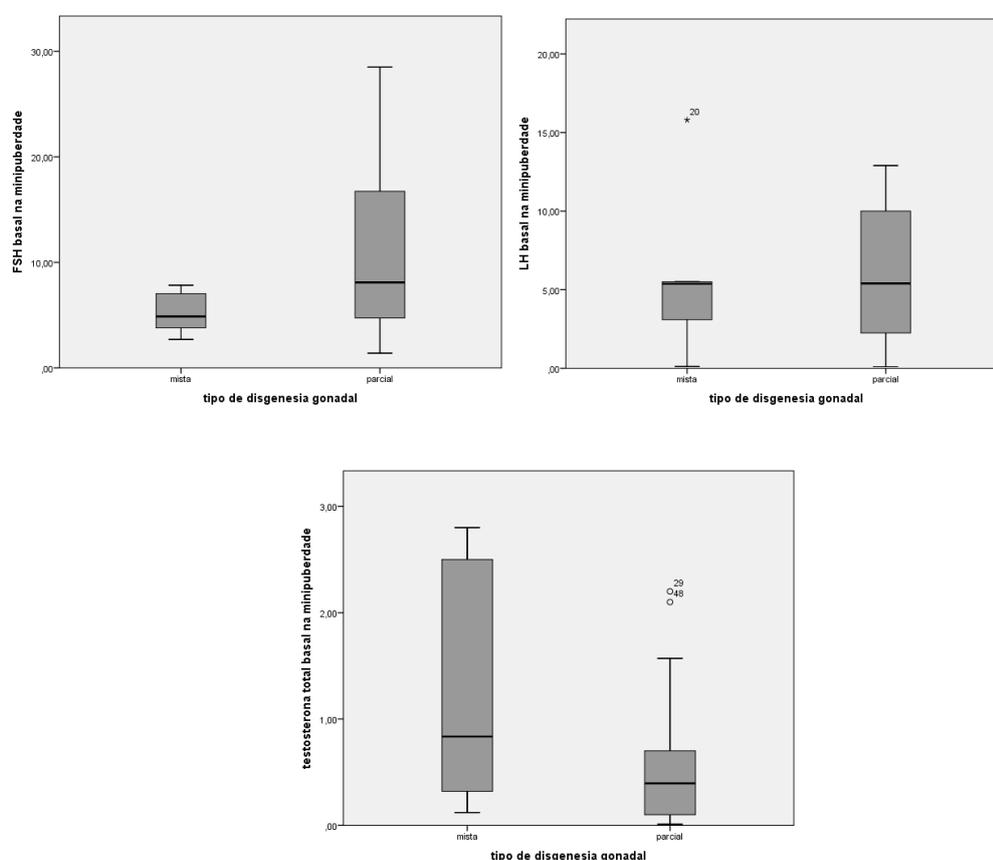
## **V.4 FUNÇÃO GONADAL**

### **V.4.1 Concentrações Hormonais Iniciais**

Vinte e três pacientes (oito com DG Mista e 15 com DG Parcial) haviam realizado a mensuração de ao menos um dos hormônios (FSH, LH e testosterona total) na minipuberdade. A maioria deles, em ambos os grupos, apresentava concentrações normais de FSH e LH, e todos apresentavam testosterona total baixa. Não houve diferença estatística entre os grupos DGP e DGM (Tabela 9, Figura 9).

**Tabela 9: Produção de FSH, LH e testosterona total durante o período de minipuberdade (30 a 180 dias) segundo o tipo de disgenesia gonadal.**

DG	FSH BASAL			LH Basal			Testosterona Total		
	Normal	Elevado	Total	Normal	Elevado	Total	Normal	Diminuída	Total
Mista	7	0	7	7	1	8	0	8	8
Parcial	11	4	15	9	6	15	0	14	14
Total	18	4	22	16	7	23	0	22	22
p	0,131			0,172			-		



**Figura 9: Boxplot dos valores de FSH (em mUI/mL), LH (em mUI/mL) e testosterona total (em ng/mL) durante o período de minipuberdade (30 a 180 dias) segundo o tipo de disgenesia gonadal.**

Foi realizado teste de estímulo com hCG na avaliação inicial de 15 pacientes pré-púberes fora do período de minipuberdade. Este foi considerado não responsivo em três de quatro pacientes com DG Mista e oito de 11 pacientes com DG Parcial, diferença essa que não é significativa ( $p=0,930$ ).

#### **V.4.2 Função Gonadal dos pacientes criados no sexo masculino**

Dos 61 pacientes incluídos nesta casuística, seis com DG Mista e 19 com DG Parcial foram criados no sexo masculino, não foram submetidos a gonadectomia bilateral, permaneciam em seguimento no nosso serviço e estavam, ao final do estudo, na faixa etária puberal ou pós puberal; assim, foi possível avaliar nesses casos a função gonadal. Esta avaliação foi feita por meio da puberdade e sua progressão e do acompanhamento das concentrações hormonais durante o seguimento.

##### ***V.4.2.1 Puberdade Espontânea***

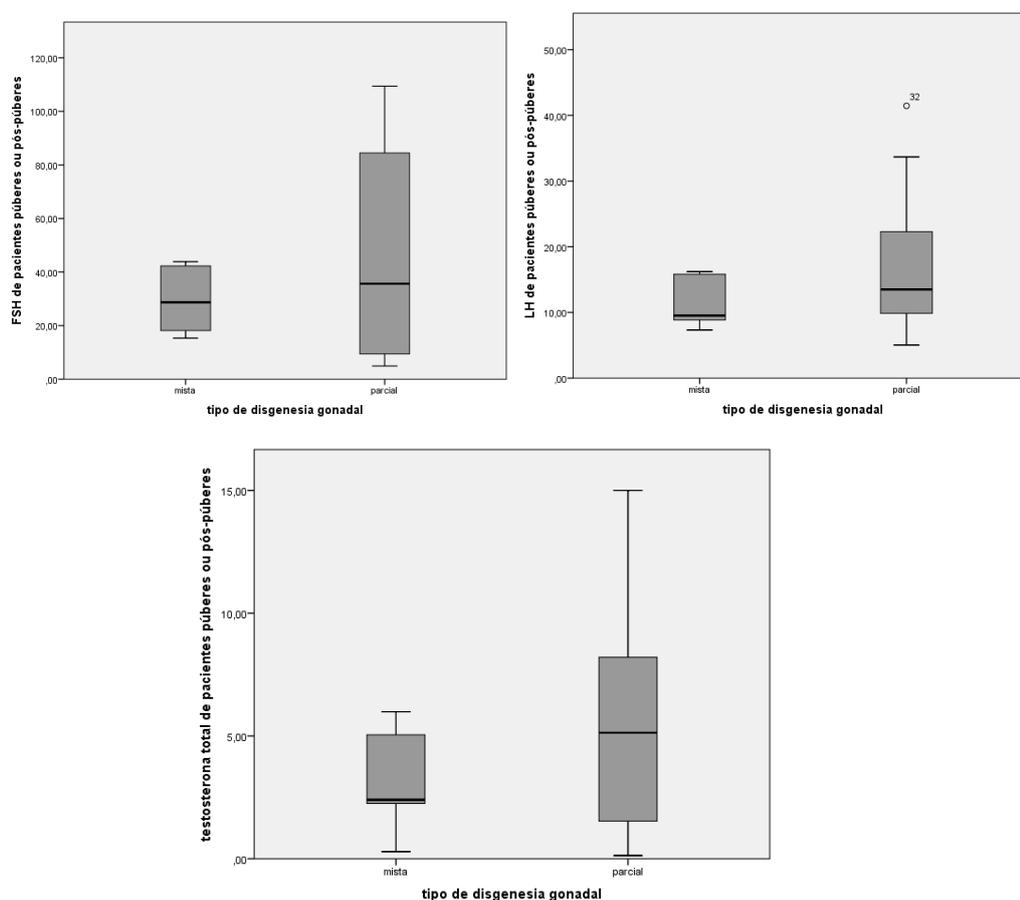
Dentre os pacientes que não foram gonadectomizados bilateralmente, a puberdade foi semelhante nos dois grupos. Houve desenvolvimento puberal espontâneo em cinco de seis casos de DG Mista e 17 de 19 pacientes com DG Parcial ( $p=0,687$ ). Três dos cinco pacientes com DG mista e quatro dos 17 com DG parcial não completaram a puberdade, tendo sido necessária reposição hormonal com testosterona já durante a fase peripuberal ( $p=0,124$ ). Assim, 15 pacientes (dois com DG Mista e 13 com DG Parcial) completaram a puberdade espontaneamente.

##### ***V.4.2.2 Última Avaliação Hormonal***

Foram obtidos os resultados das últimas mensurações hormonais de 14 pacientes acima de 15 anos de idade que permaneciam em seguimento em nosso serviço e que não haviam sido submetidos à gonadectomia bilateral, cinco deles com DG Mista e nove com DG Parcial. O comportamento dos dois grupos foi semelhante: a maioria dos pacientes apresentou FSH e LH elevados, enquanto que a testosterona total variou entre normal e diminuída (Tabela 10, Figura 10).

**Tabela 10: Produção de FSH, LH e testosterona total de pacientes púberes ou pós púberes (acima de 15 anos de idade) segundo o tipo de disgenesia gonadal.**

DG	FSH			LH			Testosterona Total		
	Normal	Elevado	Total	Normal	Elevado	Total	Normal	Diminuída	Total
Mista	0	5	5	1	4	5	2	3	5
Parcial	3	6	9	2	7	9	5	3	8
Total	3	11	14	3	11	14	7	6	13
p-valor	0,14			0,92			0,42		



**Figura 10: Boxplot dos valores de FSH (em mUI/mL), LH (em mUI/mL) e testosterona total (em ng/mL) de pacientes púberes ou pós púberes (acima de 15 anos de idade) segundo o tipo de disgenesia gonadal.**

#### **V.4.2.3 Perspectiva de fertilidade espontânea**

Dentre os pacientes que completaram a puberdade espontaneamente, o espermograma foi realizado em cinco casos: um paciente com DG Mista e quatro com DG parcial. No paciente com DG Mista (M18) havia azoospermia; entre os casos de

DG Parcial, um era azoospermico (P15) e três oligospermicos (P02, P05 e P10). Com exceção do paciente P05, todos tinham níveis elevados de FSH na última avaliação hormonal.

Nos três casos de oligospermia a DG Parcial era idiopática. Em um deles (P02) havia relato de aumento da viscosidade e raros espermatozóides; o paciente P10 apresentava raros espermatozoides, com e sem diminuição da motilidade e, no caso P05, havia apenas oligospermia, sem outras alterações (Tabela 11).

**Tabela 11: Dados do espermograma dos pacientes.**

<i>Paciente</i>	<i>M18</i>	<i>P2</i>	<i>P5</i>	<i>P10</i>	<i>P15</i>
Volume	ND	0,2 ml (hipoespermia)	2,5 ml (normospermia)	1,5 ml (normospermia)	0,6ml (hipoespermia)
Contagem	0 (Azoospermia)	NR	9,6 milhões (oligospermia)	0,04 milhões (oligospermia)	0 (Azoospermia)
Mobilidade total	NR	NR (visualizados raros espermatozoides imóveis) – astenospermia	20% móveis (astenospermia)	NR (visualizados raros espermatozoides móveis e imóveis)	NR
Vitalidade	NR	NR	Normal	NR	NR
Morfologia	NR	NR	85% normais	NR	NR
Observação		Viscosidade aumentada	Viscosidade normal	Viscosidade normal	

ND = dado não disponível; NR= não realizado devido a ausência ou pequeno número de espermatozóides

Dos 15 pacientes com puberdade espontânea com progressão normal, 12 têm valores elevados de FSH (os dois com DG Mista e dez dos 13 com DG Parcial), com mau prognóstico em relação à fertilidade.

## V.5 CRESCIMENTO

Três pacientes, todos portadores de DG Mista, foram tratados com hormônio de crescimento (M7, M9 e M15). Deles, portanto, só foi considerada a última medida antes do início da terapia.

A presença de baixa estatura foi significativamente mais frequente nos pacientes com DG Mista (15/24 pacientes em que este dado era disponível, ou 62,5%) do que nos pacientes com DG parcial (3/36 pacientes ou 8,4%) ( $p < 0,001$ ).

O escore-z da altura medida na última consulta realizada no serviço variou, nos pacientes com DG Mista, entre -4,53 e -0,39 ( $n=25$ ; média= -2,29, DP=1,0), significativamente inferior à daqueles com DG Parcial, entre -5,30 e +1,84 ( $n= 35$ ; média= -0,43; DP=1,4) ( $p < 0,001$ ). Em três pacientes com DG Parcial o escore-z da última altura estava abaixo de -2,00: P15 (-2,10), P16 (-4,00) e P20 (-5,30).

Analisando especificamente os pacientes que haviam completado o crescimento, no grupo da DG Mista a altura final variou entre -4,53 e -2,28 (média= -3,08; DP=0,7) e no grupo das DG Parciais entre -2,10 e +1,84 (média= -0,33; DP=1,1) ( $p < 0,001$ ).

## V.6 ANOMALIAS ASSOCIADAS

O resumo dos resultados encontrados encontra-se na Tabela 12.

**Tabela 12: Anomalias associadas**

Variável Analisada	DGM	DGP	p-Valor
Dismorfismos	11/23 (48%)	9/35 (26%)	<b>0,083</b>
RDNPM ou Dificuldade escolar	2/20 (10%)	4/34 (12%)	0,842
Alterações cardíacas (ecocardiograma)	5/21 (23%)	3/4	(*)
Alterações no sistema urinário (ultrassonografia)	3/22 (14%)	6/33 (18%)	0,655
Alterações na função tireoidiana	7/23 (30%)	2/23 (9%)	<b>0,063</b>
Alterações audiológicas	2/18 (11%)	5/6	(*)
Outras alterações (**)	9/22 (41%)	14/33 (42%)	

Na maioria dos casos de DG Mista e Parcial havia informações sobre a ocorrência de atraso no desenvolvimento neuromotor e(ou) dificuldade escolar e sobre a presença de sinais dismórficos no exame físico.

Dismorfismos foram mais frequentemente observados nos pacientes com DG Mista (11 de 23, ou 48%) que naqueles com DG Parcial (nove de 35, ou 26%), porém a diferença não foi significativa ( $p=0,083$ ). Atraso no desenvolvimento neuromotor e(ou) dificuldade escolar foi observado em proporções similares: dois de 20 pacientes com DG mista (10%) e quatro de 34 pacientes com DG Parcial (12%) ( $p=0,842$ ). Essas alterações de desenvolvimento e(ou) aprendizado eram leves nos dois pacientes com DG Mista e em dois dos quatro pacientes com DG Parcial; dos demais, uma apresentava alterações moderadas e outras alterações graves.

Na maioria dos casos de DG Mista haviam sido realizadas avaliações cardiovasculares, renais e de vias urinárias, bem como exames de audiometria e de função tireoideana, como parte do protocolo de seguimento de indivíduos com linhagem cromossômica 45,X. Já entre os casos de DG Parcial, alguns desses exames, particularmente ecocardiograma e audiometria, só foram realizados na presença de sintomas ou sinais que indicassem sua realização.

Malformações cardíacas estavam presentes em cinco de 21 pacientes com DG Mista (23%). Entre aqueles com DG Parcial, apenas quatro foram submetidos a ecocardiograma, sendo que três apresentaram alterações no exame.

Foram detectadas anormalidades no sistema urinário por meio do exame de ultrassonografia em ambos os grupos: três de 22 pacientes com DG Mista (14%) e seis de 33 pacientes com DG Parcial (18%) ( $p=0,655$ ).

Alterações na função tireoidiana (hipotireoidismo subclínico ou clínico) foram mais frequentemente detectadas em pacientes com DG Mista (sete de 23, ou 30%) que naqueles com DG Parcial (dois de 23, ou 9%), porém sem atingir o nível de significância estatística ( $p=0,063$ ).

Foram encontradas alterações audiológicas em dois dos 18 pacientes com DG Mista avaliados (11%); no grupo das DG Parciais, apenas seis pacientes realizaram audiometria. Um deles havia sido submetido previamente a timpanotomia; outros quatro tinham alterações na fala (três da mesma família, com mutação em

NR5A1, e um com quadro sindrômico), porém não apresentavam hipoacusia. O outro paciente avaliado, sem queixas, também não apresentou alterações.

Outras alterações variadas foram encontradas em nove de 22 pacientes com DG Mista (40,9%) e 14 de 33 com DG Parcial (42%). Foram elas:

- Alterações neuropsiquiátricas: esquizofrenia (um caso de DG Mista e um de DG Parcial); síndrome do pânico (um caso de DG Mista); transtorno de humor (um caso de DG Parcial); histórico de convulsões (um caso de DG Parcial).
- Alterações esqueléticas: escoliose (um caso de DG Mista); malformação de coluna, descrita como sacralização de L5 na radiografia simples (um caso de DG Mista); pé torto congênito (dois casos de DG Parcial);
- Distúrbios metabólicos: dislipidemia (três casos de DG Mista e um de DG Parcial); hipertensão arterial sistêmica (um caso de DG Parcial; esse paciente também apresentava elevação de transaminases e estava em investigação de esteatose hepática);
- Neoplasias: tumor de Wilms (dois casos de DG Parcial por mutação em WT1); gonadoblastoma (um caso de DG Mista).
- Síndrome de Bazex-Dupret-Cristol, genodermatose rara de herança dominante ligada ao cromossomo X que predispõe ao aparecimento precoce de carcinomas basocelulares (um caso de DG Mista);
- Diseritropoiese congênita (um caso de DG Parcial).

O paciente P27, que apresentava DG Parcial associada a quadro sindrômico de etiologia indefinida, apresentava as seguintes características: shunt optociliar detectado na infância, e não confirmado em uma segunda avaliação na adolescência; hipertensão arterial sistêmica com remissão espontânea; malformação vascular em hemicorpo esquerdo; cardiopatia congênita (forame oval pérvio); agenesia renal unilateral; diversos sinais dismórficos. Este paciente, que não apresentava atraso de desenvolvimento nem dificuldade escolar, foi submetido a exames para investigar alterações de coluna, audiológicas e tireoidianas; todos tiveram resultado normal.

## VI. DISCUSSÃO

A casuística final de 61 pacientes em 25 anos, de 1989 a 2013 (média de três por ano) demonstra a raridade dessas condições mesmo em serviços de referência. Para efeito de comparação, até 2011 foram investigados 408 casos de ambiguidade genital em nosso serviço – em torno de 15%, portanto, portadores de DG Mista ou Parcial.

Como enfatizado na introdução deste trabalho, uma questão chave em relação às disgenesias testiculares, DG Mista e DG Parcial, é o diagnóstico diferencial entre elas com base em exame citogenético aprofundado. De fato, no estabelecimento da casuística deste estudo chamou a atenção o fato de quatro dos 40 pacientes que inicialmente tinham diagnóstico de DG Parcial terem sido diagnosticados como portadores de DG Mista após a detecção de linhagem 45,X (95,110). Isso demonstra a importância de uma avaliação citogenética aprofundada no diagnóstico e na avaliação prognóstica de pacientes com quadro sugestivo de DG associado à ambiguidade genital.

Esses quatro pacientes, com sinais que sugeriam a síndrome de Turner, estavam disponíveis para reavaliação. Infelizmente, o aprofundamento da análise citogenética por FISH não foi possível em todos os casos, já que muitos pacientes perderam seguimento.

Dentre os casos de DG Parcial que compuseram esta amostra, pouco mais de um terço tiveram diagnóstico etiológico definido (mutação em *SRY*, *NR5A1* ou *WT1*), a maioria (28%) por mutação no *NR5A1*. A comparação com dados da literatura é limitada pelo fato de que muitas casuísticas, mesmo nos dias de hoje, incluem pacientes com e sem linhagem 45,X. Apesar de não haver, até o momento atual, trabalhos publicados cujos critérios de inclusão dos pacientes tenham sido semelhantes ao do presente trabalho, permitindo, assim, que essa comparação seja feita, a importância do estudo deste gene em pacientes com diagnóstico de DG Parcial merece destaque. Estudo publicado recentemente com uma amostra muito heterogênea de pacientes com DDS 46,XY, incluindo indivíduos com hipogonadismo hipogonadotrófico, encontrou três portadores de mutação no *NR5A1* dentre 26

pacientes (125). De acordo com os autores desse trabalho, a proporção de indivíduos com mutação no *NR5A1* observada (12%) era semelhante à de outros estudos.

Nos dois grupos houve pacientes cuja idade na primeira consulta era muito superior à desejável – a média (entre 2,6 e 3,8 anos) revela que nosso sistema de saúde é falho em reconhecer os sinais de ambiguidade genital e encaminhar os pacientes para investigação. No entanto, quando separamos os pacientes por década de nascimento, observamos que com o passar das décadas houve uma tendência ao encaminhamento cada vez mais precoce destes pacientes para o serviço de referência, o que demonstra que o esforço para a divulgação dos protocolos e educação das equipes de saúde vem surtindo efeito paulatinamente. Ainda assim, a realidade difere muito da situação ideal, de encaminhamento logo após o nascimento, o que se reflete no fato de que em mais da metade dos casos os pacientes já haviam sido registrados, a maioria deles no sexo masculino.

Após a avaliação em nosso serviço, o sexo definitivo continuou a ser em sua maioria masculino nos dois grupos, porém esse desvio da razão de sexo é significativamente mais acentuado nos casos de DG Parcial. Esse achado chama a atenção em vista da semelhança do fenótipo genital e gonadal.

Uma possível explicação estaria na perspectiva de baixa estatura nos casos de DG Mista, mesmo com a possibilidade de tratamento com hGH, tendo em vista a crença de que haveria maior repercussão psicossocial do déficit de crescimento no sexo masculino, o que vem sendo objeto de controvérsia em trabalhos mais recentes (126–128). No entanto, embora trabalhos recentes indiquem a necessidade de uma abordagem individualizada (129), uma revisão da literatura mostra que vários estudos antigos são enfáticos em indicar sexo de criação feminino nesses casos (130–132).

Um achado inesperado e de difícil interpretação foi o de idade materna mais avançada no grupo de DG Parcial, tanto na comparação entre médias quanto na separação em grupos acima e abaixo de 35 anos. Enquanto a idade paterna avançada se associa a maior frequência de mutações *de novo* de efeito dominante (133) (como poderia ocorrer nesse grupo de pacientes), o avanço da idade materna correlaciona-se a maior frequência de anomalias cromossômicas de origem pré-zigótica, por falta de disjunção na meiose (134).

Em relação ao fato dos dois grupos não diferirem em termos de frequência de intercorrências gestacionais, não foi possível detectar um fator ambiental que se associasse de modo consistente à ocorrência de DG Parcial. Quanto ao tempo de gestação, também semelhante nos dois grupos, os achados se assemelham aos da frequência de prematuridade na população brasileira, que é de 12,3% (135).

Já quando se analisa dados antropométricos dos nascidos a termo, o menor peso e comprimento ao nascer dos pacientes com DG Mista, decorrente da presença da linhagem 45,X, sugere que a história de ter nascido pequeno para a idade gestacional possa ser um parâmetro clínico para auxiliar na diferenciação entre DG Mista e Parcial. Em locais onde a disponibilidade de exames complementares seja limitada, esse achado pode justificar a ampliação da contagem do número de células no cariótipo ou a realização de FISH.

O fato de que o grupo de DG Parcial não difere do de DG Mista em relação ao achado de consanguinidade entre os pais indica que a herança autossômica recessiva não seja causa frequente dessa afecção. Por outro lado, mesmo também não sendo significativa, chama a atenção que a recorrência familiar de ambiguidade genital tenha sido de oito em 32 ou 25% (versus 13% na DG Mista). Essa recorrência fala a favor de um componente genético que não se limitaria a mutações de novo, mas também a mutações herdadas. Ela se deu principalmente entre os casos com mutação detectada (seis casos), tendo sido constatada em irmãos em duas das famílias. Nas demais, havia recorrência em parentes mais distantes, reforçando a hipótese de herança dominante com expressão limitada ao sexo masculino (136) (como se comprovou no caso de mutações no *NR5A1*); não se pode descartar, também, a possibilidade de penetrância incompleta.

O espectro de ambiguidade genital externa foi amplo nos dois grupos – de clitoromegalia associada a fusão posterior das saliências lábio-escrotais a genitais masculinos típicos (Prader V), porém com micropênis e gônadas não palpáveis. Foi possível comparar a variação do EMS nesta amostra de DG Mista (de 1 a 8) com a observada em outros estudos: no de Ocal et al. (137) variou de 1 a 6,5 e no de Rosa et al. (138) de 1 a 8. Embora houvesse tendência à maior androgenização dos genitais entre os pacientes com DG Parcial (maior grau de Prader e EMS mais elevado), não foi possível distinguir as duas afecções com base nas características dos genitais externos.

Também foi amplo o espectro de localização das gônadas – desde presença bilateral dentro das saliências lábio-escrotais a ambas as gônadas não palpáveis, e também em relação a elas não há distinção entre DG Mista e Parcial. Assim, embora um aspecto assimétrico ao exame físico (uma gônada presente na saliência lábio-escrotal e outra não palpável) seja sugestivo de DG Mista ou Parcial, a ausência dessa característica não afasta esses diagnósticos. É interessante assinalar que o fato da maioria dos casos de DG Mista neste trabalho apresentar ao menos uma gônada palpável contrastou com os achados de Rosa et al., que observaram ausência de gônadas palpáveis em oito dos dez pacientes estudados (138).

Nos dois grupos foi observada uma tendência a haver gônadas palpáveis predominantemente à direita e não palpáveis à esquerda, e esse achado adquire significância estatística quando se considera a amostra como um todo (61 pacientes). Esse achado está de acordo com o observado em outros DDS em que as gônadas têm diferentes constituições histológicas, como o DDS ovotesticular (hermafroditismo verdadeiro); nessas situações, a gônada mais masculina (e, portanto, a que mais provavelmente deixa a cavidade pélvica em direção à saliência lábio-escrotal) encontra-se predominantemente do lado direito (139,140).

Em relação aos genitais internos, a presença significativamente mais frequente de útero nos pacientes com DG Mista (58% *versus* 22%), sugere que a presença de estrutura uterina possa também ser um sinal que indique a necessidade de aprofundar o estudo citogenético quando o cariótipo tiver resultado inicial 46,XY. Além disso, indica maior prejuízo da secreção de HAM pelas células de Sertoli na DG Mista. Como sugeriu um estudo com portadores de DDS 46,XY, incluindo pacientes com DG Parcial e Mista, o grau de regressão dos dutos de Müller nessas afecções deve refletir o número de células de Sertoli presentes no testículo disgenético (141).

Na avaliação histológica deste trabalho observou-se ausência de tecido gonadal à direita em dois pacientes e à esquerda em sete, sendo observados apenas derivados de Wolff e Muller. É possível que a regressão gonadal (ou “*vanishing gonads*”) faça parte do espectro de alterações encontradas nessas afecções, como previamente descrito por Cools e colaboradores (142); esses autores verificaram regressão de 10% das gônadas de indivíduos com mosaico 45,X/46,XY com diversos graus de androgenização dos genitais externos. No entanto, não é possível descartar também a possibilidade deste resultado se dever a dificuldades técnicas na obtenção

do material durante a cirurgia ou a falhas na interpretação do estudo anatomo-patológico de *streaks*.

Chama a atenção o fato de não ter sido realizada avaliação histológica de três gônadas de pacientes com DG mista e 21 de pacientes com DG Parcial. A prática clínica mostra que a decisão de não biopsiar uma gônada de volume e consistência normal localizada na saliência lábio-escrotal é frequente quando se trata de crianças registradas no sexo masculino, principalmente quando não há mosaicismo com linhagem 45,X. No entanto, embora esse seja de fato um procedimento invasivo, diante do diagnóstico de DG Mista ou Parcial, as evidências atuais indicam que biópsias testiculares sejam realizadas no período pré e pós-puberal para avaliar o risco de malignização gonadal (143). À luz dos trabalhos mais recentes, é importante incluir a biópsia testicular na rotina de seguimento de pacientes com DG Mista e Parcial.

Um achado relevante deste trabalho, e que ainda não foi relatado na literatura pertinente, é o de que não há qualquer diferença histológica entre os pacientes com DG Mista e Parcial. A proporção de *streaks* em relação a testículos disgenéticos é a mesma, e a proporção em que se encontra o quadro *histológico* de disgenesia gonadal mista e o de disgenesia gonadal parcial também não difere. Portanto, os achados histológicos não são preditivos em relação à presença de linhagem 45,X no cariótipo e não deve ser usados como critério diagnóstico para diferenciar estes dois grupos de pacientes.

Embora sem significância estatística, a maior frequência de *streaks* à esquerda nos dois grupos de pacientes soma-se à maior frequência de ausência de tecido gonadal também à esquerda e à maior proporção de gônadas não palpáveis desse mesmo lado, já mencionadas anteriormente. Esses achados, tomados em conjunto, reforçam a teoria de que as gônadas direitas têm maior tendência a conter tecido testicular (144,145).

Deve-se levar em consideração, na análise das características histológicas dos dois grupos, que o fato de uma maior proporção de casos de DG Mista ter sido registrado no sexo feminino levou a maior frequência de gonadectomia bilateral nesses pacientes; assim, o estudo anatomo-patológico foi mais aprofundado nesses casos, sendo possível avaliar as gônadas como um todo. Outra consideração importante em relação ao diagnóstico histológico é que embora este muitas vezes

acabe sendo o fator decisivo para estabelecer o diagnóstico, uma biópsia pode não representar o real grau de disgenesia de uma gônada, dependendo do local de onde foi retirado o material.

Além disso, em alguns pacientes que apresentavam sinais laboratoriais de disgenesia gonadal, como níveis elevados de gonadotrofinas nos primeiros anos de vida, ou mesmo critérios histológicos de DG em uma das gônadas, o laudo histológico em uma ou ambas as gônadas foi de “testículo pré-puberal”. É de fato difícil a diferenciação entre testículo pré-puberal normal e disgenesia testicular leve; conforme foi demonstrado no estudo publicado por Scolfaro e colaboradores, em alguns casos somente a análise histomorfométrica pode fazer essa distinção (106).

Infelizmente, essa avaliação é mais detalhada e demorada, não sendo realizada de forma rotineira nos laboratórios de patologia, o que pode impedir a detecção de uma disgenesia testicular leve. O encaminhamento do material juntamente com uma descrição do caso poderia contribuir para que os patologistas pudessem definir os casos que dependem dessa avaliação.

Em relação à função hormonal gonadal na infância avaliada por meio de dosagens basais na minipuberdade, chama a atenção que a elevação das concentrações de gonadotrofinas, dado altamente sugestivo de disgenesia gonadal, não estava presente na maioria dos casos nos dois grupos. A mensuração das gonadotrofinas tem, portanto, apesar de alta especificidade, baixa sensibilidade para detecção de DG Parcial e Mista na infância. A pouca contribuição dos ensaios de gonadotrofinas para o estabelecimento do diagnóstico etiológico nessa fase da vida já havia sido observada por outros autores, assim como a existência de níveis significativamente mais baixos de testosterona em pacientes com testículos disgenéticos, também observada no presente trabalho (146).

Alguns autores sugerem que a avaliação inicial de um paciente com ambiguidade genital deva compreender principalmente a mensuração das concentrações de testosterona, HAM e inibina B; os dois últimos costumam estar em concentrações quase indetectáveis em pacientes com disgenesia gonadal. Seriam assim, uma ferramenta rápida e confiável para avaliar tanto a presença quanto a função os testículos (147). No entanto, infelizmente, a mensuração desses dois últimos hormônios não está disponível na rotina de nosso serviço. Também o fato de na maioria dos pacientes nos dois grupos não ter havido resposta normal da

testosterona ao teste de estímulo com hCG está de acordo com o observado por outros autores (146,148). Podemos considerar, portanto, que o teste do hCG, na ausência de outras ferramentas diagnósticas, pode ser útil nos pacientes que vêm para a primeira avaliação fora da minipuberdade mas ainda abaixo dos 2 anos de idade.

Por outro lado, na fase puberal ou pós puberal tornou-se evidente a elevação das gonadotrofinas na maioria dos casos nos dois grupos; portanto, o uso das gonadotrofinas como parâmetro para avaliar a função gonadal foi mais informativo na fase puberal que na minipuberdade.

O achado de concentração normal de testosterona em metade dos casos a partir dos 15 anos correlaciona-se com o fato de que a maioria dos pacientes que não se submeteram a gonadectomia bilateral nos dois grupos apresentou puberdade espontânea. Este fato poderia indicar que foram criados como meninos aqueles pacientes cujo testículo apresentava a melhor função inicial; no entanto, na avaliação inicial todos os pacientes haviam apresentado testosterona total baixa.

Entretanto, a maioria dos pacientes com DG Mista e alguns daqueles com DG Parcial não completaram o desenvolvimento puberal, requerendo reposição hormonal ainda na fase peripuberal. Os dois grupos não diferiram estatisticamente nesse aspecto, provavelmente devido ao pequeno número de pacientes em seguimento com idade suficiente para completar a puberdade no grupo de DG Mista.

De todo modo, é grande a possibilidade de que pacientes com DG Mista e, particularmente, aqueles com DG Parcial venham a entrar em puberdade espontaneamente. Esse achado é um dado importante do prognóstico que deve ser levado em consideração quando da definição do sexo de criação destes pacientes e possibilita uma reinterpretação da história natural destas afecções.

Foram poucos os pacientes onde a perspectiva de fertilidade espontânea pode ser avaliada por meio de espermograma. Nos cinco casos em que o exame foi realizado (somente um em paciente com DG Mista) o resultado foi anormal, porém a produção de espermatozoides em três dos quatro pacientes com DG Parcial sugere que possam se beneficiar de procedimentos de fertilização assistida. Esses procedimentos, na verdade, podem permitir que até mesmo pacientes com DG Mista possam vir a se reproduzir (149).

Em relação ao crescimento, a presença de baixa estatura foi significativamente mais frequente entre pacientes com DG Mista, certamente em decorrência da presença de linhagem 45,X e, conseqüentemente, da haploinsuficiência nessa linhagem celular do gene *SHOX* (*short stature homeobox-containing gene*), localizado na região pseudoautosômica dos cromossomos sexuais (150). A presença de baixa estatura é, portanto, um parâmetro clínico útil para diferenciar as duas condições e sua detecção deve indicar o aprofundamento do estudo citogenético. Infelizmente, os três pacientes do grupo de DG Parcial com estatura mais de dois desvios-padrão abaixo da média haviam perdido o seguimento e não estavam disponíveis para essa avaliação.

Embora não tenha sido significativa, a maior frequência de distúrbios no grupo de pacientes com DG Mista explica-se pela anomalia cromossômica; de fato, esses pacientes podem apresentar o mesmo quadro dismórfico da síndrome de Turner. Já a frequência de atraso no desenvolvimento neuromotor e(ou) dificuldade escolar, semelhante nos dois grupos, assemelha-se também ao observado na população em geral, de 1 a 10% (151–153).

Também pela presença da linhagem 45,X, já era esperada a ocorrência de alterações cardíacas, renais e de vias urinárias e disfunção tireoidiana nos pacientes com DG Mista (89–91,94). A detecção de anomalias cardíacas em três pacientes com DG Parcial corresponde a cerca de 8%, muito semelhante à incidência na população geral, que é de 7,7% quando são incluídas cardiopatias leves e graves (154). Anomalias renais ou de vias urinárias foram encontradas em seis casos, o que não surpreende considerando que os sistemas urinário e reprodutor têm a mesma origem embrionária.

Em suma, os resultados deste trabalho mostram que pacientes com DG Mista e Parcial diferem em relação ao crescimento e às anomalias congênitas e adquiridas decorrentes da presença de linhagem 45,X. No entanto, não se diferenciam em relação ao grau de androgenização dos genitais externos, posição e histologia das gônadas, função hormonal gonadal e perspectiva de puberdade espontânea e de infertilidade. Deve ser revista e rediscutida, portanto, a conduta de criar os pacientes com DG Mista preferencialmente no sexo feminino.

## VII. CONCLUSÕES

Na amostra estudada, pacientes com DG Mista foram mais frequentemente registrados no sexo feminino.

Em pacientes com ambiguidade genital, disgenesia gonadal e cariótipo 46,XY, o achado de baixo peso e comprimento ao nascer, baixa estatura, cardiopatias congênitas, disfunção de tireóide e(ou) presença de útero devem indicar aprofundamento da análise citogenética para pesquisa de linhagem 45,X.

Pacientes com DG Mista e Parcial não podem ser diferenciados com base no grau de androgenização dos genitais externos, posição e histologia das gônadas, função hormonal gonadal, ocorrência de puberdade espontânea e perspectiva de infertilidade.

A similaridade em termos histológicos deve reforçar a substituição da antiga classificação baseada na histologia por aquela baseada no cariótipo.

A detecção de mosaicismo com linhagem 45,X é fundamental para a investigação de anomalias congênitas e adquiridas associadas ao quadro gonadal.

A similaridade dos quadros genital e gonadal deve levantar questionamentos sobre a conduta de indicar preferencialmente o sexo de criação feminino na DG Mista.

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA, Group LC. Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child*. 2006;91(7):554–63.
2. Danish RK. Intersex problems in the neonate. *Indian J Pediatr*. 1982;49(4):555–75.
3. Maciel-Guerra A T, Guerra-Júnior G. Menino ou menina? Distúrbios da diferenciação do sexo. 2ª ed. Editora Rubio; 2010. 608 p.
4. Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, et al. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature*. 1990; 346(6280):194–7.
5. Shen WH, Moore CC, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell*. 1994;77(5):651–61.
6. Swain A, Zanaria E, Hacker A, Lovell-Badge R, Camerino G. Mouse *Dax1* expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nat Genet*. 1996;12(4):404–9.
7. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 1990;346(6281):240–4.
8. Sadler T W, Langman J. Langman's medical embryology. 12th ed. / T.W. Sadler. United States: Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2012.;
9. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*. 1994;77(4):481–90.
10. Berkovitz GD, Fechner PY, Marcantonio SM, Bland G, Stetten G, Goodfellow PN, et al. The role of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in the etiology of 46,XX true hermaphroditism. *Hum Genet*. 1992;88(4):411–6.
11. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. 1994;372(6506):525–30.
12. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, et al. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene *SOX9*. *Cell*. 1994;79(6):1111–20.
13. Mendonca BB, Arnhold IJP, Domenice S, Costa EM. 46,XY Disorders of Sexual Development. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth

- (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [cited 2015 Apr 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279170/>
14. Rose EA, Glaser T, Jones C, Smith CL, Lewis WH, Call KM, et al. Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene. *Cell*. 1990;60(3):495–508.
  15. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*. 1990;60(3):509–20.
  16. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*. 1990;343(6260):774–8.
  17. Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(21):9618–22.
  18. Laity JH, Chung J, Dyson HJ, Wright PE. Alternative splicing of Wilms' tumor suppressor protein modulates DNA binding activity through isoform-specific DNA-induced conformational changes. *Biochemistry (Mosc)*. 2000;39(18):5341–8.
  19. Hossain A, Saunders GF. The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem*. 2001;276(20):16817–23.
  20. Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell*. 1998;93(3):445–54.
  21. Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC, Grünfeld JP, Jaubert F, Kuttann F, et al. Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet*. 1997;17(4):467–70.
  22. Moffett P, Bruening W, Nakagama H, Bardeesy N, Housman D, Housman DE, et al. Antagonism of WT1 activity by protein self-association. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(24):11105–9.
  23. Miller RW, Fraumeni JF, Manning MD. Association of Wilms' Tumor with Aniridia, Hemihypertrophy and other congenital malformations. *N Engl J Med*. 1964;270:922–7.
  24. Schmickel RD. Chromosomal deletions and enzyme deficiencies. *J Pediatr*. 1986;108(2):244–6.
  25. Andrade JGR de, Guaragna MS, Soardi FC, Guerra-Júnior G, Mello MP de, Maciel-Guerra AT. Clinical and genetic findings of five patients with WT1-related disorders. *Arq Bras Endocrinol Amp Metabol*. 2008;52(8):1236–43.
  26. Ohno CK, Petkovich M. FTZ-F1 beta, a novel member of the Drosophila nuclear receptor family. *Mech Dev*. 1993;40(1-2):13–24.

27. Parker KL, Rice DA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Wong M, et al. Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:19–36.
28. Zhao H, Li Z, Cooney AJ, Lan Z-J. Orphan nuclear receptor function in the ovary. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2007;12:3398–405.
29. Buaas FW, Gardiner JR, Clayton S, Val P, Swain A. In vivo evidence for the crucial role of SF1 in steroid-producing cells of the testis, ovary and adrenal gland. *Dev Camb Engl.* 2012;139(24):4561–70.
30. Lin L, Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex Dev Genet Mol Biol Evol Endocrinol Embryol Pathol Sex Determ Differ.* 2008;2(4-5):200–9.
31. Hoivik EA, Lewis AE, Aumo L, Bakke M. Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). *Mol Cell Endocrinol.* 2010;315(1-2):27–39.
32. Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet.* 1999;22(2):125–6.
33. Achermann JC, Ozisik G, Ito M, Orun UA, Harmanci K, Gurakan B, et al. Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(4):1829–33.
34. Lourenço D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, et al. Mutations in NR5A1 Associated with Ovarian Insufficiency. *N Engl J Med.* 2009;360(12):1200–10.
35. Philibert P, Paris F, Lakhel B, Audran F, Gaspari L, Saâd A, et al. NR5A1 (SF-1) gene variants in a group of 26 young women with XX primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril.* 2013;99(2):484–9.
36. Camats N, Pandey AV, Fernández-Cancio M, Andaluz P, Janner M, Torán N, et al. Ten novel mutations in the NR5A1 gene cause disordered sex development in 46,XY and ovarian insufficiency in 46,XX individuals. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jul;97(7):E1294–306.
37. Bashamboo A, Ferraz-de-Souza B, Lourenço D, Lin L, Sebire NJ, Montjean D, et al. Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. *Am J Hum Genet.* 2010 Oct 8;87(4):505–12.
38. Röpke A, Tewes A-C, Gromoll J, Kliesch S, Wieacker P, Tüttelmann F. Comprehensive sequence analysis of the NR5A1 gene encoding steroidogenic factor 1 in a large group of infertile males. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(9):1012–5.
39. Brauner R, Neve M, Allali S, Trivin C, Lottmann H, Bashamboo A, et al. Clinical, biological and genetic analysis of anorchia in 26 boys. *PloS One.* 2011;6(8):e23292.

40. Ferraz-de-Souza B, Lin L, Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;336(1-2):198–205.
41. Mello MP de, França ES de S, Fabbri HC, Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G. Multifunctional role of steroidogenic factor 1 and disorders of sex development. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011;55(8):607–12.
42. Fabbri HC, Andrade JGR de, Soardi FC, Calais FL de, Petroli RJ, Maciel-Guerra AT, et al. The novel p.Cys65Tyr mutation in NR5A1 gene in three 46,XY siblings with normal testosterone levels and their mother with primary ovarian insufficiency. *BMC Med Genet*. 2014;15(1):7.
43. Coutant R, Mallet D, Lahlou N, Bouhours-Nouet N, Guichet A, Coupris L, et al. Heterozygous Mutation of Steroidogenic Factor-1 in 46,XY Subjects May Mimic Partial Androgen Insensitivity Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(8):2868–73.
44. van Silfhout A, Boot AM, Dijkhuizen T, Hoek A, Nijman R, Sikkema-Raddatz B, et al. A unique 970kb microdeletion in 9q33.3, including the NR5A1 gene in a 46,XY female. *Eur J Med Genet*. 2009;52(2-3):157–60.
45. Wu JY, McGown IN, Lin L, Achermann JC, Harris M, Cowley DM, et al. A novel NR5A1 variant in an infant with elevated testosterone from an Australasian cohort of 46,XY patients with disorders of sex development. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;78(4):545–50.
46. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*. 1990;346(6281):245–50.
47. Su H, Lau YF. Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am J Hum Genet*. 1993;52(1):24–38.
48. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*. 2008;453(7197):930–4.
49. Jäger RJ, Anvret M, Hall K, Scherer G. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature*. 1990;348(6300):452–4.
50. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley KC, Tonini G, et al. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet*. 1994;7(4):497–501.
51. Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet*. 2001;28(3):216–7.
52. Cox JJ, Willatt L, Homfray T, Woods CG. A SOX9 duplication and familial 46,XX developmental testicular disorder. *N Engl J Med*. 2011;364(1):91–3.

53. Benko S, Gordon CT, Mallet D, Sreenivasan R, Thauvin-Robinet C, Brendehaug A, et al. Disruption of a long distance regulatory region upstream of SOX9 in isolated disorders of sex development. *J Med Genet.* 2011;48(12):825–30.
54. Kim G-J, Sock E, Buchberger A, Just W, Denzer F, Hoepffner W, et al. Copy number variation of two separate regulatory regions upstream of SOX9 causes isolated 46,XY or 46,XX disorder of sex development. *J Med Genet.* 2015;52(4):240–7.
55. El-Mogharbel N, Wakefield M, Deakin JE, Tsend-Ayush E, Grützner F, Alsop A, et al. DMRT gene cluster analysis in the platypus: new insights into genomic organization and regulatory regions. *Genomics.* 2007;89(1):10–21.
56. Raymond CS, Parker ED, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, Kusz K, et al. A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum Mol Genet.* 1999;8(6):989–96.
57. Ottolenghi C, Veitia R, Quintana-Murci L, Torchard D, Scapoli L, Souleyreau-Therville N, et al. The region on 9p associated with 46,XY sex reversal contains several transcripts expressed in the urogenital system and a novel doublesex-related domain. *Genomics.* 2000;64(2):170–8.
58. Ounap K, Uibo O, Zordania R, Kiho L, Ilus T, Oiglane-Shlik E, et al. Three patients with 9p deletions including DMRT1 and DMRT2: a girl with XY complement, bilateral ovotestes, and extreme growth retardation, and two XX females with normal pubertal development. *Am J Med Genet A.* 2004;130A(4):415–23.
59. Ledig S, Hiort O, Wünsch L, Wieacker P. Partial deletion of DMRT1 causes 46,XY ovotesticular disorder of sexual development. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc.* 2012;167(1):119–24.
60. Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Délot E, Chen XN, Dewing P, et al. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet.* 2001;68(5):1102–9.
61. Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature.* 1999;397(6718):405–9.
62. Ottolenghi C, Pelosi E, Tran J, Colombino M, Douglass E, Nedorezov T, et al. Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum Mol Genet.* 2007;16(23):2795–804.
63. Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle EJ. A WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med.* 2004;351(8):792–8.
64. Biason-Lauber A, De Filippo G, Konrad D, Scarano G, Nazzaro A, Schoenle EJ. WNT4 deficiency--a clinical phenotype distinct from the classic Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a case report. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2007;22(1):224–9.

65. Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, et al. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet.* 2006;38(11):1304–9.
66. Tomaselli S, Megiorni F, De Bernardo C, Felici A, Marrocco G, Maggiulli G, et al. Syndromic true hermaphroditism due to an R-spondin1 (RSPO1) homozygous mutation. *Hum Mutat.* 2008;29(2):220–6.
67. Rocha VBC, Guerra-Júnior G, Marques-de-Faria AP, de Mello MP, Maciel-Guerra AT. Complete gonadal dysgenesis in clinical practice: the 46,XY karyotype accounts for more than one third of cases. *Fertil Steril.* 2011;96(6):1431–4.
68. Sohval AR. “Mixed” gonadal dysgenesis: a variety of hermaphroditism. *Am J Hum Genet.* 1963;15:155–8.
69. Lipay MVN, Bianco B, Verreschi ITN. Disgenesias gonadais e tumores: aspectos genéticos e clínicos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49(1):60–70.
70. Rohatgi M, Gupta DK, Menon PS, Verma IC, Mathur M. Mixed gonadal dysgenesis and dysgenetic male pseudohermaphroditism - a critical analysis. *Indian J Pediatr.* 1992;59(4):487–500.
71. Borer JG, Nitti VW, Glassberg KI. Mixed gonadal dysgenesis and dysgenetic male pseudohermaphroditism. *J Urol.* 1995;153(4):1267–73.
72. Alvarez-Nava F, Gonzalez S, Soto S, Pineda L, Morales-Machin A. Mixed gonadal dysgenesis: a syndrome of broad clinical, cytogenetic and histopathologic spectrum. *Genet Couns Geneva Switz.* 1999;10(3):233–43.
73. Chemes H, Muzulin PM, Venara MC, Mulhmann M del C, Martínez M, Gamboni M. Early manifestations of testicular dysgenesis in children: pathological phenotypes, karyotype correlations and precursor stages of tumour development. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2003;111(1):12–23; discussion 23–4.
74. Schmitt K, Zabel B, Tulzer G, Eitelberger F, Pelletier J. Nephropathy with Wilms tumour or gonadal dysgenesis: incomplete Denys-Drash syndrome or separate diseases? *Eur J Pediatr.* 1995;154(7):577–81.
75. Scolfaro MR, Cardinalli IA, Guerra Júnior G. Gonadal dysgenesis and morphometric histologic analysis. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2003;47(2):128–34.
76. Werner R, Merz H, Birnbaum W, Marshall L, Schröder T, Reiz B, et al. 46,XY Gonadal Dysgenesis due to a Homozygous Mutation in Desert Hedgehog (DHH) Identified by Exome Sequencing. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(7):E1022–9.
77. Cools M, Drop SLS, Wolffenbuttel KP, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Germ cell tumors in the intersex gonad: old paths, new directions, moving frontiers. *Endocr Rev.* 2006;27(5):468–84.

78. Andrade JGR, Marques-de-Faria AP, Fabbri HC, de Mello MP, Guerra-Júnior G, Maciel-Guerra AT. Long-Term Follow-Up of Patients with 46,XY Partial Gonadal Dysgenesis Reared as Males. *Int J Endocrinol*. 2014; 2014:480724.
79. Andrade JGR de, Guerra ATM. Estudo retrospectivo sobre crescimento, puberdade espontânea e anomalias associadas em pacientes com disgenesia gonadal parcial 46, XY [Internet]. 2010 [cited 2013 Mar 16]. Available from: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000478538>
80. Hawkins JR, Taylor A, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith KD, Berkovitz GD. Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *Am J Hum Genet*. 1992;51(5):979–84.
81. Fuqua JS, Sher ES, Fechner PY, Ostrer H, Oddeux C, Schafer AJ, et al. Linkage analysis of a kindred with inherited 46,XY partial gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(12):4479–83.
82. Fuqua JS, McLaughlin J, Perlman EJ, Berkovitz GD. Analysis of the SRY gene in gonadal tissue of subjects with 46,XY gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(2):701–2.
83. Ottolenghi C, Moreira-Filho C, Mendonça BB, Barbieri M, Fellous M, Berkovitz GD, et al. Absence of mutations involving the LIM homeobox domain gene LHX9 in 46,XY gonadal agenesis and dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(6):2465–9.
84. Tagliarini EB, Assumpção JG, Scolfaro MR, Mello MP de, Maciel-Guerra AT, Guerra Júnior G, et al. Mutations in SRY and WT1 genes required for gonadal development are not responsible for XY partial gonadal dysgenesis. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(1):17–25.
85. Nazarenko SA, Timoshevsky VA, Sukhanova NN. High frequency of tissue-specific mosaicism in Turner syndrome patients. *Clin Genet*. 1999;56(1):59–65.
86. Röpke A, Pelz A-F, Volleth M, Schlößer H-W, Morlot S, Wieacker PF. Sex chromosomal mosaicism in the gonads of patients with gonadal dysgenesis, but normal female or male karyotypes in lymphocytes. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;190(4):1059–62.
87. Takahashi I, Miyamoto J, Hasegawa Y. Limitations of G-banding Karyotype Analysis with Peripheral Lymphocytes in Diagnosing Mixed Gonadal Dysgenesis. *Clin Pediatr Endocrinol*. 2006;15(3):109–15.
88. Nomura R, Miyai K, Okada M, Kajiwara M, Ono M, Ogata T, et al. A 45,X/46,XY DSD (Disorder of Sexual Development) case with an extremely uneven distribution of 46,XY cells between lymphocytes and gonads. *Clin Pediatr Endocrinol*. 2015;24(1):11–4.
89. Gravholt CH, Juul S, Naeraa RW, Hansen J. Morbidity in Turner Syndrome. *J Clin Epidemiol*. 1998;51(2):147–58.

90. Carvalho AB, Guerra Júnior G, Baptista MTM, Faria APM de, Marini SHV de L, Guerra ATM. Cardiovascular and renal anomalies in Turner syndrome. *Rev Assoc Médica Bras.* 2010;56(6):655–9.
91. Martinerie L, Morel Y, Gay C-L, Pienkowski C, Kerdanet M de, Cabrol S, et al. Impaired puberty, fertility, and final stature in 45,X/46,XY mixed gonadal dysgenetic patients raised as boys. *Eur J Endocrinol.* 2012;166(4):687–94.
92. Nihoul-Fékété C, Thibaud E, Lortat-Jacob S, Josso N. Long-Term Surgical Results and Patient Satisfaction With Male Pseudohermaphroditism or True Hermaphroditism: A Cohort of 63 Patients. *J Urol.* 2006;175(5):1878–84.
93. Lindhardt Johansen M, Hagen CP, Rajpert-De Meyts E, Kjærgaard S, Petersen BL, Skakkebaek NE, et al. 45,X/46,XY mosaicism: phenotypic characteristics, growth, and reproductive function - a retrospective longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(8):E1540–9.
94. Bondy CA. Care of Girls and Women with Turner Syndrome: A Guideline of the Turner Syndrome Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(1):10–25.
95. Andrade JGR de, Guerra-Júnior G, Maciel-Guerra AT. 46,XY and 45,X/46,XY testicular dysgenesis: similar gonadal and genital phenotype, different prognosis. *Arq Bras Endocrinol Amp Metabol.* 2010;54(3):331–4.
96. Bostwick DG, Cheng L. *Urologic Surgical Pathology.* Elsevier Health Sciences; 2014. 3194 p.
97. Cools M, Stoop H, Kersemaekers A-MF, Drop SLS, Wolffenbuttel KP, Bourguignon J-P, et al. Gonadoblastoma arising in undifferentiated gonadal tissue within dysgenetic gonads. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(6):2404–13.
98. Cools M, van Aerde K, Kersemaekers A-M, Boter M, Drop SLS, Wolffenbuttel KP, et al. Morphological and immunohistochemical differences between gonadal maturation delay and early germ cell neoplasia in patients with undervirilization syndromes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(9):5295–303.
99. Nishina-Uchida N, Fukuzawa R, Numakura C, Suwanai AS, Hasegawa T, Hasegawa Y. Characteristic testicular histology is useful for the identification of NR5A1 gene mutations in prepubertal 46,XY patients. *Horm Res Pædiatrics.* 2013;80(2):119–28.
100. Manuel M, Katayama PK, Jones HW Jr. The age of occurrence of gonadal tumors in intersex patients with a Y chromosome. *Am J Obstet Gynecol.* 1976;124(3):293–300.
101. Nistal M, Gonzalez-Peramato P, Regadera J, Serrano A, Tarin V, De Miguel MP. Primary testicular lesions are associated with testicular germ cell tumors of adult men. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(10):1260–8.
102. Looijenga LHJ, Hersmus R, Oosterhuis JW, Cools M, Drop SLS, Wolffenbuttel KP. Tumor risk in disorders of sex development (DSD). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007;21(3):480–95.

103. Barros BA, Moraes SG, Coeli FB, Assumpção JG, De Mello MP, Maciel-Guerra AT, et al. OCT4 immunohistochemistry may be necessary to identify the real risk of gonadal tumors in patients with Turner syndrome and Y chromosome sequences. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2011;26(12):3450–5.
104. Beaulieu Bergeron M, Lemieux N, Brochu P. Undifferentiated gonadal tissue, Y chromosome instability, and tumors in XY gonadal dysgenesis. *Pediatr Dev Pathol*. 2011;14(6):445–59.
105. Looijenga LHJ, Stoop H, de Leeuw HPJC, de Gouveia Brazao CA, Gillis AJM, van Roozendaal KEP, et al. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res*. 2003;63(9):2244–50.
106. Ribeiro Scolfaro M, Aparecida Cardinali I, Gabas Stuchi-Perez E, Palandi de Mello M, de Godoy Assumpção J, Matias Baptista MT, et al. Morphometry and histology of gonads from 13 children with dysgenetic male pseudohermaphroditism. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125(5):652–6.
107. Dohle GR, Elzanaty S, van Casteren NJ. Testicular biopsy: clinical practice and interpretation. *Asian J Androl*. 2012;14(1):88–93.
108. Chang HJ, Clark RD, Bachman H. The phenotype of 45,X/46,XY mosaicism: an analysis of 92 prenatally diagnosed cases. *Am J Hum Genet*. 1990;46(1):156–67.
109. Hook EB. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet*. 1977;29(1):94–7.
110. Maciel-Guerra AT, De Paulo J, Santos AP, Guaragna-Filho G, Andrade JGR, Siviero-Miachon AA, et al. The use of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of hidden mosaicism: apropos of three cases of sex chromosome anomalies. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012;56(8):545–51.
111. Paulo J de, Andrade JGR de, Santos AP dos, Gil-da-Silva-Lopes VL, Guerra-Júnior G, Maciel-Guerra AT, et al. The use of FISH on buccal smear to investigate mosaicism with a 45,X cell line: study on healthy men and patients with disorders of sex development. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(4):328–34.
112. Hackel C, Varella-Garcia M. Interphase cytogenetics using fluorescence in situ hybridization: an overview of its application to diffuse and solid tissue. *Braz J Genet*, 1997;20(1).
113. Forest MG, Cathiard AM, Bertrand JA. Evidence of testicular activity in early infancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1973;37(1):148–51.
114. Prader A. [Genital findings in the female pseudo-hermaphroditism of the congenital adrenogenital syndrome; morphology, frequency, development and heredity of the different genital forms]. *Helv Paediatr Acta*. 1954;9(3):231–48.
115. Ahmed S F, Khwaja O, Hughes I A. The role of a clinical score in the assessment of ambiguous genitalia. *BJU Int*. 2000;85(1):120–4.

116. Ogilvy-Stuart AL, Brain CE. Early assessment of ambiguous genitalia. *Arch Dis Child.* 2004;89(5):401–7.
117. Normal and Abnormal Puberty [Internet]. Endotext. [cited 2015 May 18]. Available from: <http://www.endotext.org/chapter/normal-and-abnormal-puberty/>
118. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the Pattern of Pubertal Changes in Boys. *Arch Dis Child.* 1970;45(239):13–23.
119. Cooper TG, Noonan E, Eckardstein S von, Auger J, Baker HWG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update.* 2009.
120. Cameron N. The Methods of Auxological Anthropometry. In: Falkner F, Tanner JM, editors. *Human Growth*; 1978. p. 35–90.
121. André Morcilo, Sofia Lemos-Marini. SISCREs - Sistema de análise do crescimento.
122. NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTIC. Growth Curves. GROWTH CURVES [Internet]. Available from: <http://www.cdc.gov/growthcharts/>
123. Assumpção JG, Benedetti CE, Maciel-Guerra AT, Guerra G Jr, Baptista MTM, Scolfaro MR, et al. Novel mutations affecting SRY DNA-binding activity: the HMG box N65H associated with 46,XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-HMG box R30I associated with variable phenotypes. *J Mol Med Berl Ger.* 2002;80(12):782–90.
124. Fabbri HC, Mello MP de. Análise molecular do gene NR5A1 em pacientes 46,XY com distúrbios da diferenciação do sexo [Internet]. [cited 2015 Feb 6]. Available from: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000907552>
125. Baetens D, Mladenov W, Delle Chiaie B, Menten B, Desloovere A, Iotova V, et al. Extensive clinical, hormonal and genetic screening in a large consecutive series of 46,XY neonates and infants with atypical sexual development. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:209.
126. Sandberg DE, Voss LD. The psychosocial consequences of short stature: a review of the evidence. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2002;16(3):449–63.
127. Voss LD, Sandberg DE. The psychological burden of short stature: evidence against. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc.* 2004;151 Suppl 1:S29–33.
128. Stephen MD, Varni JW, Limbers CA, Yafi M, Heptulla RA, Renukuntla VS, et al. Health-related quality of life and cognitive functioning in pediatric short stature: comparison of growth-hormone-naïve, growth-hormone-treated, and healthy samples. *Eur J Pediatr.* 2011;170(3):351–8.
129. Szarras-Czapnik M, Lew-Starowicz Z, Zucker KJ. A Psychosexual Follow-Up Study of Patients with Mixed or Partial Gonadal Dysgenesis. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2007;20(6):333–8.

130. Donahoe PK, Crawford JD, Hendren WH. Mixed gonadal dysgenesis, pathogenesis and management. *J Pediatr Surg.* 1979;14(3):287–300.
131. Robboy SJ, Miller T, Donahoe PK, Jahre C, Welch WR, Haseltine FP, et al. Dysgenesis of testicular and streak gonads in the syndrome of mixed gonadal dysgenesis: Perspective derived from a clinicopathologic analysis of twenty-one cases. *Hum Pathol.* 1982;13(8):700–16.
132. Blanco JA, Martínez-Mora J, Granada M, Toran N, Isnard RM, Castellví A, et al. [The mixed gonadal dysgenesis. Diagnostic criteria and surgical treatment]. *Cir Pediátrica Organo Of Soc Esp Cir Pediátrica.* 1997;10(1):34–7.
133. Ramasamy R, Chiba K, Butler P, Lamb DJ. Male biological clock: a critical analysis of advanced paternal age. *Fertil Steril.* 2015;103(6):1402–6.
134. Wang Z-B, Schatten H, Sun Q-Y. Why is chromosome segregation error in oocytes increased with maternal aging? *Physiol Bethesda Md.* 2011;26(5):314–25.
135. Passini R, Cecatti JG, Lajos GJ, Tedesco RP, Nomura ML, Dias TZ, et al. Brazilian multicentre study on preterm birth (EMIP): prevalence and factors associated with spontaneous preterm birth. *PloS One.* 2014;9(10):e109069.
136. Le Caignec C, Baron S, McElreavey K, Joubert M, Rival J-M, Mechinaud F, et al. 46,XY gonadal dysgenesis: evidence for autosomal dominant transmission in a large kindred. *Am J Med Genet A.* 2003;116A(1):37–43.
137. Ocal G, Berberoğlu M, Sıklar Z, Ruhi HI, Tükün A, Camtosun E, et al. The clinical and genetic heterogeneity of mixed gonadal dysgenesis: does “disorders of sexual development (DSD)” classification based on new Chicago consensus cover all sex chromosome DSD? *Eur J Pediatr.* 2012;171(10):1497–502.
138. Rosa RFM, D’Ecclesiis WFB, Dibbi RP, Rosa RCM, Trevisan P, Graziadio C, et al. 45,X/46,XY mosaicism: report on 14 patients from a Brazilian hospital. A retrospective study. *São Paulo Med J Rev Paul Med.* 2014;132(6):332–8.
139. Mittwoch U. Genetics of sex determination: exceptions that prove the rule. *Mol Genet Metab.* 2000;71(1-2):405–10.
140. Krob G, Braun A, Kuhnle U. True hermaphroditism: geographical distribution, clinical findings, chromosomes and gonadal histology. *Eur J Pediatr.* 1994;153(1):2–10.
141. Rey R, al-Attar L, Louis F, Jaubert F, Barbet P, Nihoul-Fékété C, et al. Testicular dysgenesis does not affect expression of anti-müllerian hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. *Am J Pathol.* 1996;148(5):1689–98.
142. Cools M, Pleskacova J, Stoop H, Hoebeke P, Van Laecke E, Drop SLS, et al. Gonadal pathology and tumor risk in relation to clinical characteristics in patients with 45,X/46,XY mosaicism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):E1171–80.

143. Cools M, Looijenga LHJ, Wolffenbuttel KP, T'Sjoen G. Managing the risk of germ cell tumourigenesis in disorders of sex development patients. *Endocr Dev.* 2014;27:185–96.
144. van Niekerk WA, Retief AE. The gonads of human true hermaphrodites. *Hum Genet.* 1981;58(1):117–22.
145. Verkauskas G, Jaubert F, Lortat-Jacob S, Malan V, Thibaud E, Nihoul-Fékété C. The Long-Term Follow-up of 33 Cases of True Hermaphroditism: A 40-Year Experience With Conservative Gonadal Surgery. *J Urol.* 2007;177(2):726–31.
146. Morel Y, Rey R, Teinturier C, Nicolino M, Michel-Calemard L, Mowszowicz I, et al. Aetiological diagnosis of male sex ambiguity: a collaborative study. *Eur J Pediatr.* 2001;161(1):49–59.
147. Hafez M, El Dayem SMA, El Mougy F, Atef A, Kandil M, Galal A, et al. The role of anti-Mullerian and inhibin B hormones in the evaluation of 46,XY disorders of sex development. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2014;27(9-10):891–9.
148. Rey RA, Belville C, Nihoul-Fékété C, Michel-Calemard L, Forest MG, Lahlou N, et al. Evaluation of Gonadal Function in 107 Intersex Patients by Means of Serum Antimüllerian Hormone Measurement. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(2):627–31.
149. Flannigan RK, Chow V, Ma S, Yuzpe A. 45,X/46,XY mixed gonadal dysgenesis: A case of successful sperm extraction. *Can Urol Assoc J.* 2014;8(1-2):E108–10.
150. Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, et al. The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet.* 2000;9(5):695–702.
151. Croen LA, Grether JK, Selvin S. The epidemiology of mental retardation of unknown cause. *Pediatrics.* 2001;107(6):E86.
152. Battaglia A, Carey JC. Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation: An overview. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2003;117C(1):3–14.
153. Vasconcelos MM. Retardo mental. *J Pediatr Rio J.* 2004;80(2,supl):s71–82.
154. Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(12):1890–900.

## IX. APÊNDICES

### IX.1 APÊNDICE 1 - DADOS DOS 61 PACIENTES QUE COMPÕEM A AMOSTRA, REFERENTES A SEXO INICIAL E FINAL, CARACTERÍSTICAS GENITAIS E GONADAIS E AVALIAÇÃO HORMONAL INICIAL.

caso	idade na 1ª consulta (anos)	sexo inicial	sexo final	Prader	EMS	gonada D localização	gonada D histologia	gonada E localização	gonada E histologia	útero	idade das dosagens basais (anos) (avaliação inicial)	FSH na avaliação inicial	LH na avaliação inicial	Testosterona na avaliação inicial	idade no teste com hCG	Testosterona pós hCG (ng/mL)
M01	11	F	M	3	7	NP	NB	NP	TD	+	12	ELEV	NL	DIM	12	5,12
M02	0,16	I	M	4	6	CI	TD	CI	TD	+	0,16	ND	ND	DIM		
M03	0,33	M	F	2	2	SLE	TpréP	NP	STR	-		ND	ND	ND		
M04	0,25	M	F	3	5	CI	TD	CI	STR	+	0,83	ND	ND	DIM	0,83	0,5
M05	1,08	M	M	4	8	SLE	TD	SLE	TD	-	1,25	NL	NL	DIM		
M06	3	M	M	4	4,5	NP	STR	CI	TD	+	3,16	NL	NL	DIM	3,41	0,2
M07	0,5	M	F	3	4	NP	TD	NP	TpréP	+	0,41	ND	NL	DIM		
M08	0,14	I	M	3	5,5	CI	TD	SLE	TpréP	-	0,33	NL	NL	DIM	2	0,21
M09	1,75	M	M	4	6	SLE	TpréP	NP	STR	-	0,02	NL	NL	DIM		
M10	0,04	M	M	4	6	SLE	TpréP	SLE	TpréP	-	0,04	NL	ELEV	DIM		
M11	0,25	M	F	4	5	SLE	TD	NP	AUS	-	0,25	NL	NL	DIM		
M12	2,25	M	M	3	4	NP	TD	NP	TD	+	2,25	NL	NL	DIM		
M13	0,08	I	M	4	5,5	SLE	STR	CI	TpréP	+	0,16	NL	NL	DIM		
M14	3,75	ND	M	3	1,5	NP	AUS	SLE	TpréP	-	6	NL	NL	ND		
M15	0,08	I	F	3	5	CI	TD	CI	TD	+	0,08	NL	ELEV	DIM		
M16	42	F	F	2	1	NP	T	NP	NB	(-)	41	ELEV	NL	ND		

caso	idade na 1a consulta (anos)	sexo inicial	sexo final	Prader	EMS	gonada D localização	gonada D histologia	gonada E localização	gonada E histologia	útero	Idade das dosagens basais (anos) (avaliação inicial)	FSH na avaliação inicial	LH na avaliação inicial	Testosterona na avaliação inicial	Idade no teste com hCG	Testosterona pós hCG (ng/mL)
M17	15,83	M	M	4	6	SLE	NB	NP	AUS	ND	15,83	ELEV	NL	DIM		
M18	16,83	F	M	3	2	SLE	T	NP	STR	(+)	ND	ND	ND	ND		
M19	0,02	I	F	4	5	SLE	TD	NP	AUS	(+)	0,01	NL	NL	ND		
M20	0,02	I	F	3	1	NP	STR	NP	TpréP	(+)	0,12	NL	NL	ND		
M21	1,25	M	M	5	7,5	NP	TorT	NP	TpréP	(-)	1,25	NL	NL	DIM		
M22	0,08	I	F	3	7,5	SLE	TD	CI	TD	(-)	0,06	NL	NL	DIM		
M23	0,08	I	M	4	5,5	SLE	TD	CI	TD	(+)	0,04	NL	NL	DIM		
M24	0,12	I	F	4	5	CI	TuT	CI	TD	(+)	0,08	NL	NL	DIM		
M25	0,04	I	F	4	5	CI	TD	CI	TD	(+)	0,16	NL	NL	DIM		
P01	0,25	M	M	3	9	SLE	TD	SLE	TD	(-)	0,41	ND	ND	DIM	0,41	0,8
P02	0,14	I	M	4	5,5	SLE	NB	CI	TD	(-)	8	NL	NL	DIM	8	0,27
P03	0,16	I	M	4	5	CI	TD	CI	TD	(-)	0,33	NL	NL	DIM	0,33	0,1
P04	0,04	I	M	3	1,5	CI	TD	NP	STR	(+)	7	NL	NL	DIM	7	0,12
P05	0,58	M	M	4	6	SLE	TD	SLE	TD	(-)	5	NL	NL	DIM	5	0,1
P06	0,66	M	M	3	6	SLE	TD	SLE	TD	(-)	0,58	NL	NL	DIM		
P07	0,5	M	M	4	6,5	CI	TD	SLE	TD	(-)	0,66	NL	NL	DIM	0,92	2,57
P08	0,12	I	F	2	4	NP	TD	NP	AUS	(-)	0,5	NL	NL	DIM		
P09	20	F	F	3	4	NP	TD	NP	TD	(+)	20	ELEV	ELEV	NL		
P10	4,5	M	M	5	10	CI	TD	NP	AUS	(-)	4,5	NL	ELEV	DIM	4	0,34
P11	0,02	F	F	3	4	NP	TD	NP	AUS	(-)	0,16	ELEV	ELEV	DIM		
P12	0,12	I	M	4	4,5	NP	TD	NP	TD	(-)	0,16	NL	NL	ND		
P13a	0,5	M	M	4	5,5	CI	AUS	CI	TD	(+)	2	NL	NL	DIM	2	0,1
P13b	8	M	M	5	7,5	SLE	NB	NP	STR	(-)	8	NL	NL	DIM	8	0,21

caso	idade na 1ª consulta (anos)	sexo inicial	sexo final	Prader	EMS	gonada D localização	gonada D histologia	gonada E localização	gonada E histologia	útero	Idade das dosagens basais (anos) (avaliação inicial)	FSH na avaliação inicial	LH na avaliação inicial	Testosterona na avaliação inicial	Idade no teste com hCG	Testosterona pós hCG (ng/mL)
P14a	0,02	I	M	4	4,5	CI	TD	NP	STR	(+)	0,25	NL	NL	DIM		
P14b	0,02	I	M	4	5	SLE	TpréP	NP	STR	(+)	0,08	ELEV	ELEV	DIM		
P15	0,83	F	M	3	4,5	NP	TD	NP	TpréP	(-)	0,92	ELEV	NL	ND		
P16	0,5	M	M	4	6	SLE	NB	SLE	NB	(-)	0,5	NL	ELEV	DIM	1	1,8
P17	0,04	I	M	4	6	SLE	STR	SLE	TD	(-)	0,25	NL	ELEV	DIM		
P18	0,08	I	M	4	3	NP	NB	NP	NB	(-)	0,08	NL	NL	DIM		3,95
P19a	0,75	F	M	3	6	SLE	NB	SLE	NB	(-)	0,75	NL	NL	DIM		
P19b	0,2	I	M	4	6	SLE	NB	SLE	NB	(-)	0,16	NL	ELEV	DIM	0,41	0,34
P19c	0,15	I	M	3	5	CI	NB	CI	NB	(-)	0,16	NL	NL	DIM	0,66	2
P20	0,5	I	ND	3	2	SLE	NB	NP	NB	ND	0,58	ELEV	NL	DIM		
P21	1,25	F	F	4	4	NP	TD	CI	TD	(-)	1,25	ELEV	NL	DIM		0,23
P22	20	F	M	4	5,5	CI	NB	SLE	NB	(-)	21	ELEV	NL	NL		
P23	0,06	I	M	5	8	CI	TD	CI	TD	(-)	0,16	ELEV	NL	DIM	0,33	0,2
P24	17	F	F	5	8	CI	TD	CI	TD	(-)	17,08	ELEV	ELEV	DIM		
P25	0,5	I	F	5	7	NP	NB	NP	NB	(-)	0,08	ELEV	NL	DIM	0,16	0,01
P26	0,02	I	M	3	4,5	CI	TpréP	NP	TD	(-)	0,08	NL	ELEV	DIM	0,5	0,12
P27	0,02	I	M	4	6	SLE	NB	SLE	NB	(-)	0,08	NL	NL	ND		
P28	0,5	M	M	3	5	SLE	TpréP	NP	STR	(+)	0,58	NL	NL	DIM	0,58	0,84
P29	2,66	M	M	4	4	NP	STR	NP	TD	(-)	3	NL	NL	DIM		0,002
P30	12,08	M	M	4	7,5	SLE	NB	CI	TpréP	(+)	10	ELEV	NL	DIM		
P31	2,5	M	M	4	5	SLE	TD	NP	AUS	(+)	1,58	NL	NL	DIM		
P32	7,66	M	M	3	6	SLE	TD	SLE	TD	(-)	7,66	NL	NL	DIM	7,66	0,03

(-) = ausente; (+) = presente; AUS= ausente; CI= canal inguinal; D= direito(a); DIM= diminuído; ELEV= elevado; F= feminino; I= indeterminado; M= masculino; NB= não biopsiado; ND= não disponível; NL= normal; NP= não palpável; SLE= saliência lábio-escrotal; STR= streak; T= testículo; TD= testículo disgenético; TorT= torção de testículo; TpréP= testículo pré-puberal; TuT= tumor testicular

**IX.2 APÊNDICE 2 - DADOS DOS 61 PACIENTES QUE COMPÕEM A AMOSTRA REFERENTES A ANTECEDENTES FAMILIARES E GESTACIONAIS.**

caso	Idade materna ao nascimento (anos)	Idade paterna ao nascimento (anos)	Consangui- nidade	recorrência familiar de ambiguidade genital	complicações gestacionais	Tempo de gestação	Peso ao nascer (g)	Comprimento ao nascer (cm)
M01	21	28	(-)	(-)	(+)	Termo	3220	48
M02	21	26	(-)	(-)	(+)	Termo	2430	45
M03	21	30	(-)	(-)	(-)	Termo	2560	48
M04	24	26	(-)	(-)	(-)	Termo	2800	
M05	23	23	(-)	(-)	(-)	Termo	2500	45
M06	27	23	ND	ND	(-)	Termo	3000	
M07	20	26	(-)	(-)	(-)	PréT	2000	42
M08	21	26	(-)	(+)	(-)	Termo	2900	45
M09	24	27	(-)	(-)	(-)	Termo	2420	49
M10	33	49	(-)	(-)	(-)	Termo	2300	
M11	25	30	(-)	(-)	(-)	Termo	2420	47
M12	28	40	(-)	(-)	(+)	Termo	2815	46
M13	25	27	(-)	(+)	(+)	PréT	1510	39
M14	21	24	(-)	(-)	(-)	Termo	2400	42
M15	29	36	(-)	(+)	(+)	Termo	2530	46
M16	ND	39	(-)	(-)	ND	ND		
M17	26	29	(-)	(-)	(-)	Termo	3500	48
M18	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
M19	21	31	(-)	(-)	(+)	Termo	3240	46
M20	30	28	(+)	(-)	(-)	Termo	2725	47
M21	23	28	(-)	(-)	(+)	PréT	645	28

caso	Idade materna ao nascimento (anos)	Idade paterna ao nascimento (anos)	Consangüinidade	recorrência familiar de ambigüidade genital	complicações gestacionais	Tempo de gestação	Peso ao nascer (g)	Comprimento ao nascer (cm)
M22	22	26	(-)	(-)	(+)	Termo	2385	44
M23	33	33	(-)	(-)	(-)	Termo	2630	
M24	26	30	(-)	(-)	(+)	Termo	2580	45
M25	27	33	(-)	(-)	(+)	Termo	3000	46
P01	38	38	(-)	(-)	(-)	Termo	3000	48
P02	46	52	(-)	(-)	(+)	Termo	3550	
P03	19	23	(-)	(-)	(-)	Termo	2950	49
P04	32	28	(-)	(-)	(-)	Termo	2850	46
P05	23	23	(-)	(+)	(+)	Termo	3000	48
P06	29	32	(-)	(-)	(+)	Termo	3500	48
P07	27	32	(-)	(-)	(+)	PréT	1650	41
P08	24	29	(-)	(-)	(-)	Termo	3600	52
P09	ND	42	(+)	(+)	(-)	Termo		
P10	19	16	(-)	(-)	(-)	Termo	3750	50
P11	27	41	(-)	(-)	(-)	Termo	3410	49
P12	28	34	(-)	(+)	(+)	Termo	3710	50
P13a	22	27	(-)	(+)	(+)	PósT	2800	48
P13b	36	31	(-)	(+)	(+)	PréT	2470	
P14a	33	36	(-)	(+)	(-)	Termo	3850	
P14b	36	39	(-)	(+)	(-)	Termo	3185	48
P15	28	32	(-)	(-)	(+)	PréT	2580	46
P16	25	28	(-)	(-)	(+)	Termo	2540	42
P17	19	36	(-)	(-)	(-)	Termo	2740	47
P18	26	28	(-)	(-)	(-)	Termo	3665	50
P19a	18	18	(-)	(+)	(+)	Termo	3180	47

caso	Idade materna ao nascimento (anos)	Idade paterna ao nascimento (anos)	Consangüinidade	recorrência familiar de ambigüidade genital	complicações gestacionais	Tempo de gestação	Peso ao nascer (g)	Comprimento ao nascer (cm)
P19b	25	26	(-)	(+)	(+)	Termo	3440	47
P19c	26	27	(-)	(+)	(-)	Termo	3230	45
P20	31	32	(-)	(-)	(-)	Termo	3100	48
P21	34	38	(-)	(-)	(+)	Termo	2800	49
P22	ND	ND	ND	(+)	ND	Termo		
P23	33	30	(-)	(+)	(-)	PréT	2700	
P24	31	32	(-)	(-)	(+)	Termo		
P25	19	28	(-)	(-)	(-)	PréT	2550	43
P26	28	33	(-)	(-)	(-)	Termo	3365	49
P27	14	24	(-)	(-)	(-)	Termo	3405	49
P28	35	39	(-)	(-)	(-)	Termo	3280	
P29	34	35	(-)	(-)	(+)	Termo	3660	
P30	38	33	(-)	(-)	(+)	PréT	1700	
P31	28	40	(-)	(-)	(-)	Termo	3755	50
P32	37	38	(-)	(-)	(+)	Termo	3400	50

(-) = ausente; (+) = presente; ND= não disponível; PréT= pré-termo; PósT= pós termo



caso	Gonadectomia	Idade na última avaliação hormonal (anos)	FSH na última avaliação hormonal	LH na última avaliação hormonal	Testosterona na última avaliação hormonal	Puberdade espontânea	Idade de início da puberdade espontânea (anos)	Progressão da puberdade espontânea	Ginecomastia
M21	D		ND	ND	ND	PréP			
M22	BL								
M23	(-)		ND	ND	ND	PréP			
M24	BL								
M25	BL								
P01	(-)	24,83	ELEV	ELEV	DIM	(+)	12	NL	(+)
P02	(-)	22,5	ELEV	ELEV	NL	(+)	15	NL	(-)
P03	ND à D; E (-)	17	NL	NL	DIM	(+)	13	INC	(+)
P04	E	17,83	ELEV	ELEV	DIM	(+)	11	NL	ND
P05	E	17,41	NL	NL	NL	(+)	11	NL	(-)
P06	(-)	19,5	NL	ELEV	NL	(+)	12	NL	(-)
P07	(-)	18,5	NL	NL	NL	(+)	10	NL	(+)
P08	BL								
P09	BL#		ND	ND	ND	(+)	11	INC	(-)
P10	E	17,33	ELEV	ELEV	NL	(+)	12	NL	(-)
P11	BL								
P12	D	12	ELEV	ELEV		(+)	12	INC	(-)
P13a	(-)	19,25	ELEV	ELEV	NL	(+)	9	NL	(-)
P13b	(-)	-	ND	ND	ND	ND			
P14a	E	17,08	ELEV	ELEV	DIM	(+)		NL	(-)
P14b	E	14,08	NL	NL	DIM	ND			
P15	(-)	17,66	ELEV	ELEV	NL	(+)		INC	(-)
P16	(-)	-	ND	ND	ND	ND			
P17	(-)	15,5	ELEV	ELEV	NL	(+)	12	NL	(+)

caso	Gonadectomia	Idade na última avaliação hormonal (anos)	FSH na última avaliação hormonal	LH na última avaliação hormonal	Testosterona na última avaliação hormonal	Puberdade espontânea	Idade de início da puberdade espontânea (anos)	Progressão da puberdade espontânea	Ginecomastia
P18	(-)	0,16	NL	NL	DIM	ND			
P19a	(-)	15,33	ELEV	ELEV	NL	(+)	11	NL	(-)
P19b	(-)	7,41	NL	NL	DIM	PréP			
P19c	(-)	6,25	NL	NL	DIM	PréP			
P20	ND		ND	ND	ND	ND			
P21	BL								
P22	(-)	23	ELEV	ELEV	NL	(+)		NL	(-)
P23	(-)	11,08	ELEV	ELEV	DIM	(-)		ND	(-)
P24	BL					(-)			
P25	ND	0,58	ELEV	NL	DIM	PréP			
P26	E	7	NL	NL	DIM	PréP			
P27	(-)		NL	NL	DIM	PréP			
P28	(-)		NL	NL		PréP			
P29	(-)		ND	ND	ND	PréP			
P30	(-)	13	ELEV	NL	NL	(+)	12	NL	(-)
P31	BL								
P32	(-)		ND	ND	ND	PréP			

(-) = ausente; (+) = presente; BL= bilateral; D= direito(a); DIM= diminuído; E= esquerdo(a); ELEV= elevado; INC= incompleta; ND= não disponível; NL= normal; PréP= pré-púbere

# gonadectomia realizada após a puberdade

**IX.4 APÊNDICE 4 - DADOS DOS 61 PACIENTES QUE COMPÕEM A AMOSTRA REFERENTES A CRESCIMENTO, ATRASO DE DESENVOLVIMENTO MOTOR E(OU) DIFICULDADE ESCOLAR E ANOMALIAS ASSOCIADAS.**

Caso	escore z da última altura	escore z da altura final	Baixa estatura	Atraso motor e(ou) dificuldade escolar	Dismorfismos	Cardiopatia congênita	Anomalias renais ou de vias urinárias	Hipoacusia	Disfunção de tireóide	Outras anomalias
M01	-4,53	-4,53	(+)	leve	(+)	ND	(+)	ND	(-)	(-)
M02	-2,69	-2,69	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
M03	-2,28	-2,28	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
M04	-2,66	-2,66	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
M05	-2,83	-2,83	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
M06	-1,21		(-)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M07	-3,61		(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
M08	-2,52		(+)	(-)	(+)	ND	(-)	ND	ND	(-)
M09	-2,25		(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
M10	-1,77		(-)	leve	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
M11	-1,16		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
M12	-1,74		(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
M13	-2,31		(+)	ND	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
M14	-1,43		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
M15	-1,56		(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
M16	-3,62	-3,62	(+)	ND	(+)	ND	ND	ND	(-)	(-)
M17	-3,3	-3,3	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
M18	-2,75	-2,75	(+)	(-)	ND	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
M19	-0,74		(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
M20	-0,88		(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
M21	-2,48		(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)

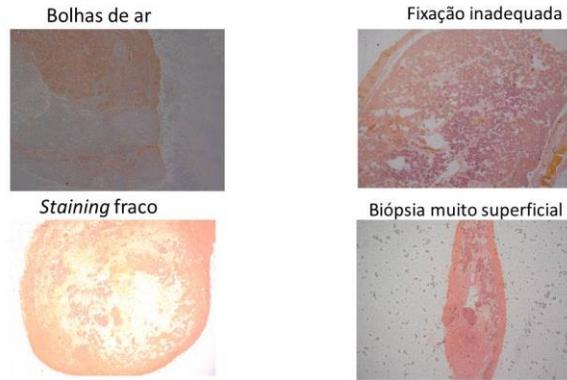
Caso	escore z da última altura	escore z da altura final	Baixa estatura	Atraso motor e(ou) dificuldade escolar	Dismorfismos	Cardiopatia congênita	Anomalias renais ou de vias urinárias	Hipoacusia	Disfunção de tireóide	Outras anomalias
M22	-4,32		(+)	ND	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND
M23	-0,39		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	(-)
M24	-1,94		(-)	(-)	(-)	(-)	ND	ND	(-)	(-)
M25	-2,04		ND	ND	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND
P01	-1,58	-1,58	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	(-)	(+)
P02	-1,58	-1,58	(-)	leve	(+)	ND	(-)	(+)	(-)	(-)
P03	-0,22	-0,3	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	ND	(+)
P04	-0,76	-0,76	(-)	moderado	(+)	ND	(+)	ND	(-)	(+)
P05	-0,21	-0,21	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	(-)	(-)
P06	-0,89	-0,89	(-)	leve	(-)	ND	(-)	ND	(-)	(+)
P07	-0,78	-0,78	(-)	(-)	(-)	ND	(+)	ND	(-)	(-)
P08	1,84	1,84	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
P09	-0,49	-0,49	(-)	(-)	ND	ND	(-)	ND	ND	(-)
P10	0,62	0,62	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	ND	(-)
P11	1,52	1,52	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	(-)	(+)
P12	-1,51	-1,51	(-)	(-)	(-)	ND	(+)	ND	(-)	(-)
P13a	-0,19	-0,19	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	(+)	(+)
P13b	0,64		(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	ND	(-)
P14a	-0,08	-0,08	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	(-)	(-)
P14b	-1,61		(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	(-)	(-)
P15	-2,1	-2,1	(+)	(-)	(+)	ND	(-)	ND	(-)	(-)
P16	-5,3		(+)	grave	(-)	(+)	(-)	ND	ND	(+)
P17	-1,11		(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	ND	(-)	(-)
P18	0,51		(-)	(-)	(+)	ND	(+)	ND	ND	(-)

Caso	escore z da última altura	escore z da altura final	Baixa estatura	Atraso motor e(ou) dificuldade escolar	Dismorfismos	Cardiopatia congênita	Anomalias renais ou de vias urinárias	Hipoacusia	Disfunção de tireóide	Outras anomalias
P19a	0,23		(-)	(-)	(-)	ND	(-)	(-)	(-)	(+)
P19b	-1,01		(-)	(-)	(-)	ND	(-)	(-)	(+)	(+)
P19c	-0,74		(-)	(-)	(-)	ND	(-)	(-)	(-)	(+)
P20	-4		(+)	ND	(-)	ND	ND	ND	ND	ND
P21	1,2		(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	(-)	(+)
P22	-0,15	-0,15	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	ND	ND
P23	0,34		(-)	(-)	(+)	ND	(-)	ND	(-)	(+)
P24	0,95	0,95	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	ND	(-)
P25	0,3		(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	ND	(-)
P26	-0,38		(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
P27	0,66		(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	(-)	(-)
P28	0,44		(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	(-)	(-)
P29	0,55		(-)	ND	(+)	ND	ND	ND	ND	ND
P30	0,71		(-)	(-)	(+)	ND	ND	ND	(-)	(-)
P31			(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	ND	(-)
P32	-1,14		(-)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	ND	(-)

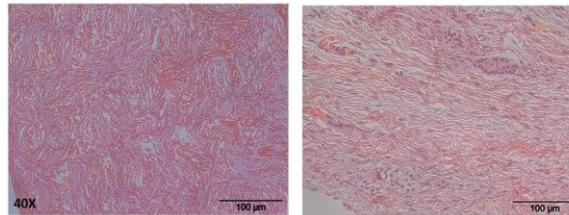
(-) = ausente; (+) = presente; ND= não disponível

**IX.5 APÊNDICE 5: ASPECTO HISTOLÓGICO DE STREAKS E TESTÍCULOS DISGENÉTICOS DE PACIENTES COM DG MISTA E PARCIAL DESTA AMOSTRA**

**Dificuldades técnicas na avaliação histológica**

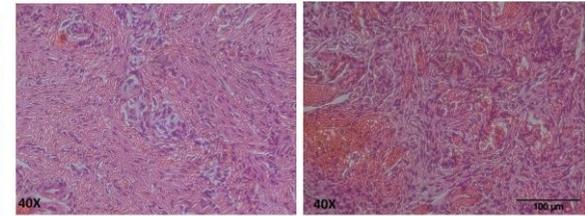


Tecido gonadal (parênquima) com fibrose e hialinização – tecido celular tipo “estroma ovariano”



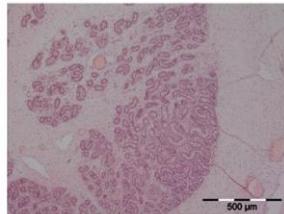
Disgenesia Gonadal Parcial (DGP) LBC - B03221\_96\_L  
Disgenesia Gonadal Mista (DGM) NFL - B07392\_02\_1

Tecido gonadal indiferenciado (UGT)

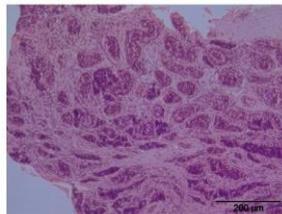


Disgenesia Gonadal Parcial (DGP) LMFM - B02066\_99\_2  
Disgenesia Gonadal Mista (DGM) NBD - B04615\_01

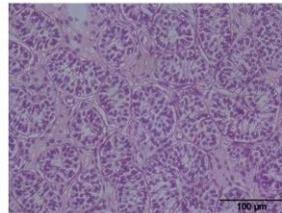
Disgenesia Testicular evidente, com fibrose e hialinização e túbulos com SCOS



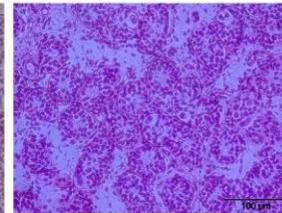
Disgenesia Gonadal Parcial (DGP) JHFS - B06678\_97\_R\_10X



Disgenesia Gonadal Mista (DGM) DCP - B12290\_96\_D\_20X



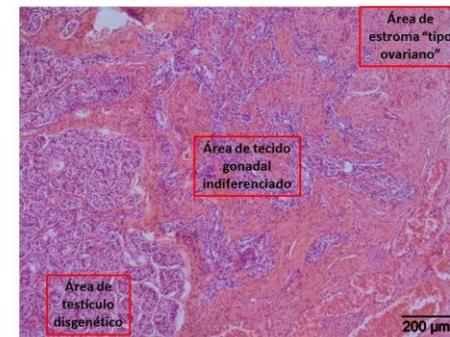
(DGP) IAS - B08044\_97\_1\_40X



(DGM) DCP - B12290\_96\_E\_40X

Disgenesia Testicular leve – diminuição do diâmetro tubular, do número de células germinativas, fibrose leve.

Nesta imagem, um “continuum” entre uma área disgenética e uma área mais bem formada.



(DGP) VGBC - B08598\_10\_2\_10X

## X. ANEXOS

### X.1 ANEXO 1: FICHA DE COLETA DE DADOS

FICHA DE COLETA DE DADOS – PESQUISA DG PARCIAL XY vs DGM No

HC - _____	DGM - _____
Nome - _____	
DN - ____/____/____	Natural de : _____
Sexo inicial - ( ) M ( ) F ( ) Indet	Sexo final - ( ) M ( ) F
Data da primeira consulta - ____/____/____	Idade - _____
Encaminhado por - _____	

#### DADOS CLÍNICOS:

Pré-natal desde o \_\_\_\_\_ mês  
 Intercorrências gestacionais: \_\_\_\_\_  
 IG ao nascimento: \_\_\_\_\_  
 Nasceu de parto: \_\_\_\_\_  
 Intercorrências neonatais: \_\_\_\_\_  
 Peso ao nascimento: \_\_\_\_\_ g  
 Comp. ao nascimento: \_\_\_\_\_ cm

#### HISTÓRIA FAMILIAR:

- Naturalidade dos pais:  
 Pai: \_\_\_\_\_  
 Mãe: \_\_\_\_\_  
 Pais consanguíneos: ( ) S ( ) N  
 Grau de consanguinidade \_\_\_\_\_  
 - Idade dos pais ao nascimento:  
 Pai: \_\_\_\_\_  
 Mãe: \_\_\_\_\_  
 - Altura dos pais:  
 Pai: \_\_\_\_\_ cm  
 Mãe: \_\_\_\_\_ cm

#### Alvo genético:

- História familiar de:  
 Ambigüidade gonital ( ) S ( ) N  
 Amonoréia primária ( ) S ( ) N  
 Infertilidade ( ) S ( ) N  
 Quadro semelhante ( ) S ( ) N  
 Outros: \_\_\_\_\_

#### EXAME FÍSICO INICIAL:

Idade cronológica: \_\_\_\_\_  
 Idade óssea: ( \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ )  
 Altura: \_\_\_\_\_ cm Escoro z: \_\_\_\_\_  
 Peso: \_\_\_\_\_ kg Escoro z: \_\_\_\_\_  
 - Malformações associadas: \_\_\_\_\_

- História patológica:

Cirurgias: \_\_\_\_\_

Resultado de biópsia gonadal: \_\_\_\_\_

- Gonitíla Prador \_\_\_\_\_ :  
 Falus : \_\_\_\_\_ cm ( ) chordeo  
 Abertura uretral:  
 Saliências Labioescrotais:Fusão ( ) S ( ) N  
 Enrugamento ( ) S ( ) N Pigm : \_\_\_\_\_

Intróito vaginal: ( ) presente ( ) ausente

Gônadas palpáveis: ( ) N

( ) S:

direita:

esquerda:

Hérnia inguinal: ( ) S ( ) N

Pêlos pubianos Tanner: \_\_\_\_\_

Mamas: \_\_\_\_\_

Acro ( ) S ( ) N

#### EXAMES COMPLEMENTARES:

- Dosagens basais ( \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ):

FSH:

LH:

Testo T:

Testo L:

DHT:

17 OHP:

Andro:

DHEA:

S-DHEA:

T4 livre:

TSH:

PPRL:

- Pós-HCG ( \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ):

HCG:

Testo T:

Testo L:

DHT:

- Ultrassom ( \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, local: \_\_\_\_\_ ):

- Outros: \_\_\_\_\_



## X.2 ANEXO 2: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 18/01/11  
(Grupo II)

**PARECER CEP:** N° 1194/2010 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).  
**CAAE:** 0928.0.146.000-10

### I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** “AVALIAÇÃO CLÍNICA E CITOGENÉTICA MOLECULAR DAS DISGENESIAS GONADAIS PARCIAIS NY”.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Andréa Trevas Maciel Guerra

**INSTITUIÇÃO:** Hospital das Clínicas/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 06/12/2010

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 18/01/12 (O formulário encontra-se no *site* acima).

### II - OBJETIVOS

Investigar a presença de criptomosaicismo com linhagem 45,X em pacientes com disgenesia testicular e cariótipo 46,XY e analisar o quadro clínico e laboratorial de pacientes com ambigüidade genital associada a disgenesia testicular 46,XY, com ou sem linhagem 45,X em mosaico.

### III - SUMÁRIO

Serão levantados todos os casos de disgenesia testicular atendidos no GIEDDS, desde sua criação em 1989 até 2013. Os casos em que o mosaicismo não foi detectado serão submetidos a um aprofundamento da análise citogenética através do FISH. Os pacientes serão então separados em dois grupos (com e sem linhagem 45,X) e serão comparados em relação a histologia das gônadas, anatomia genital interna e externa, presença de distúrbios e doenças associadas, crescimento, puberdade e prognóstico quanto a fertilidade.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de um estudo de citogenética, onde o projeto é bem redigido. Uma parte dos casos estudados serão de banco de dados e nesse caso o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pode ser dispensado. O mesmo não ocorre nos casos que serão convidados a participar e aprofundar as análises laboratoriais, bem como o grupo controle. TCLE adequado.

### 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 complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

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

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



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

#### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de janeiro de 2011.

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

### X.3 ANEXO 3: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - PACIENTES

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

#### **I.1.1.1 DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA**

Título da pesquisa: *AVALIAÇÃO CLÍNICA E CITOGENÉTICA MOLECULAR DAS  
DISGENESIAS GONADAIS PARCIAIS XY*

Responsáveis: Juliana Gabriel Ribeiro de Andrade (Doutoranda) e Profa.  
Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra (orientadora).

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_  
 Registro Hospitalar: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_  
 Fone: ( ) \_\_\_\_\_  
 Acompanhante: \_\_\_\_\_  
 Grau de parentesco: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_  
 RG: \_\_\_\_\_ Contato: \_\_\_\_\_

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO TRABALHO:** Estamos fazendo um estudo sobre pacientes que nasceram com genitais ambíguos e o diagnóstico final foi a Disgenesia Gonadal. Alguns destes pacientes apresentam uma alteração no exame do cariótipo (alteração nos cromossomos sexuais, ou no material genético) enquanto que outros permanecem sem uma causa definida para justificar o problema. Este estudo tem por objetivo comparar estes dois grupos de pacientes (que tem a mesma doença, porém uns tem uma causa definida enquanto outros não) principalmente em relação ao seu quadro clínico, ou seja, sua saúde de forma geral: a presença de outras doenças, o crescimento, a puberdade, o resultado dos exames de imagem e de hormônios.

No entanto, para que seja possível ter certeza de que aqueles pacientes que tiveram o exame de cariótipo inicialmente normal realmente não apresentam nenhuma alteração nos seus cromossomos (material genético), é necessário um estudo mais aprofundado deste cariótipo. Para isso, será realizada uma nova coleta de sangue para exame, semelhante à coleta que foi feita para realização do primeiro cariótipo.

**PROCEDIMENTO:** Será realizada coleta de sangue para o estudo de FISH, que é o aprofundamento do cariótipo.

**RISCOS E DESCONFORTOS:** Mínimos, relacionados à coleta de sangue.

**VANTAGENS:** Obtenção de conhecimento sobre a presença ou não de problemas nos cromossomos que podem ter sido a causa da disgenesia gonadal e ambigüidade genital. Caso esses problemas sejam detectados, o seguimento clínico do paciente poderá ser aprimorado.

**SIGILO:** As informações sobre o resultado dos exames serão fornecidas apenas durante a consulta médica; se utilizadas em congressos ou publicações médicas, serão excluídos os nomes dos pacientes.

**FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:** Garantimos aos pacientes e suas famílias resposta a qualquer pergunta e esclarecimento de qualquer dúvida sobre os assuntos relacionados à pesquisa, sendo fornecidas, ainda, informações atualizadas durante o estudo. Maiores esclarecimentos podem ser fornecidos por:

Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra – tel: (19) 3788-8909

Dra. Juliana Gabriel Ribeiro de Andrade (responsável pelo contato com os pacientes) – tel: (19) 3788- 8909

Comitê de Ética em Pesquisa – Unicamp – (19) 3788-8936

**RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:** A participação neste estudo é livre, podendo o paciente recusá-la a qualquer momento, sem que haja comprometimento do atendimento médico que recebe ou receberá.

Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Ambulatório: \_\_\_\_\_

Assinatura do Paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do Acompanhante: \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável pela transmissão das informações

\_\_\_\_\_