



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

GUILHERME GUARAGNA FILHO

FUNÇÃO DAS CÉLULAS DE LEYDIG E DE SERTOLI EM
PACIENTES COM AMBIGUIDADE GENITAL, CARIÓTIPO 46,XY E
PRODUÇÃO NORMAL DE TESTOSTERONA

CAMPINAS
2017

GUILHERME GUARAGNA FILHO

FUNÇÃO DAS CÉLULAS DE LEYDIG E DE SERTOLI EM
PACIENTES COM AMBIGUIDADE GENITAL, CARIÓTIPO 46,XY E
PRODUÇÃO NORMAL DE TESTOSTERONA

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

ORIENTADOR: GIL GUERRA JUNIOR

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO GUILHERME GUARAGNA FILHO, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. GIL GUERRA JUNIOR.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 472098/2011-0; CAPES, BEX 3547-15-9

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7764-1426>

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

G931f Guaragna Filho, Guilherme, 1982-
Função das células de Leydig e de Sertoli em pacientes com ambiguidade genital, cariótipo 46,XY e produção normal de testosterona / Guilherme Guaragna Filho. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Gil Guerra Junior.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Genitália. 2. Transtornos do desenvolvimento sexual. 3. Células intersticiais do testículo. 4. Células de Sertoli. 5. Inibinas. I. Guerra Junior, Gil, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Leydig and Sertoli cells function in patients with genital ambiguity, 46,XY karyotype and normal testosterone production

Palavras-chave em inglês:

Genitalia

Disorders of sex development

Leydig cells

Sertoli cells

Inhibins

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Gil Guerra Junior [Orientador]

Lilia Freire Rodrigues de Souza Li

Juliana Gabriel Ribeiro de Andrade

Angela Maria Spinola e Castro

Adriana Aparecida Siviero Miachon

Data de defesa: 10-02-2017

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

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

GUILHERME GUARAGNA FILHO

Orientador (a) PROF(A) DR(A) GIL GUERRA JÚNIOR

MEMBROS:

- 1. PROF(A). DR(A). GIL GUERRA JÚNIOR**
- 2. PROF(A). DR(A). LÍLIA FREIRE RODRIGUES DE SOUZA LI**
- 3. PROF(A). DR(A). JULIANA GABRIEL RIBEIRO DE ANDRADE**
- 4. PROF(A).DR(A). ANGELA MARIA SPINOLA-CASTRO**
- 5. PROF(A).DR(A). ADRIANA APARECIDA SIVIERO-MIACHON**

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 10 de fevereiro de 2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Guilherme e Rosângela,
exemplos de amor e dedicação incondicionais

À minha esposa, Daniela,
pelo amor e por dividir os sonhos

Aos pacientes,
foco principal desse trabalho

AGRADECIMENTOS

Nenhum homem é uma ilha e dessa feita nenhuma jornada dessa magnitude se percorre sozinha.

O primeiro agradecimento, mais que especial, é ao meu orientador, o Professor Gil Guerra Junior, que ao conhecê-lo naquela manhã de terça-feira em meados de 2010 selou não só meu destino na endocrinologia pediátrica como na minha paixão pelo estudo dos Distúrbios da Diferenciação do Sexo. Seus ensinamentos, sua orientação, seu exemplo e sua amizade foram fundamentais na formação do profissional que sou hoje.

Minha gratidão especial também ao Professor Faisal Ahmed, meu orientador externo no período do meu doutorado sanduíche, e os membros do Staff do *Developmental Endocrinology Research Group* da *University of Glasgow* que tornaram essa experiência em algo espetacular.

Agradeço ao Antônio Calixto, que nessa caminhada foi um parceiro incansável e importantíssimo.

À Laurione Cândido de Oliveira e a equipe do Laboratório de Fisiologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP pelo apoio técnico fundamental para realização desse trabalho.

Agradeço a Professora Maricilda Palandi de Mello e toda a equipe do CBMEG (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética) da UNICAMP cujo trabalho de excelência foi peça chave para o desenvolvimento desse projeto.

Minha gratidão à Professora Andréa Trevas Maciel Guerra pelo apoio e pelos ensinamentos preciosos.

Agradeço à Professora Sofia Helena Valente de Lemos Marini pelos ricos ensinamentos.

Minha gratidão ao Dr. Ezequiel Gonçalves Moreira e ao Professor André Moreno Morcillo pelos vários conselhos e ensinamentos e pela ajuda na análise estatística.

Agradeço à minha querida esposa, Daniela, pelo amor, pelo apoio incondicional, pela paciência, por aguentar a saudade. Tudo isso foi vital para poder seguir até o fim nessa caminhada.

Agradeço aos meus pais, Rosângela e Guilherme, que me deram os valores fundamentais e o amor incondicional que foram fundamentais para forjar a pessoas que sou hoje. Agradeço também pelo apoio e por aguentarem a distância e a saudade.

Aos meus irmãos, André, Alessandra e Pedro, que são meus primeiros amigos, pelo amor e carinho.

Ao meu tio, Dr. João Carlos Guaragna, amigo e grande incentivador na minha vida médica

Um agradecimento carinhoso às minhas colegas de pós-graduação: Georgette Beatriz de Paula, Juliana Ribeiro de Andrade e Letícia Sewaybricker. Que dividiram momentos estressantes e alegres nesse percurso.

Agradeço ao Professor Sérgio Marba pelos seus preciosos ensinamentos na disciplina de Pedagogia Médica e Didática Especial em Saúde da Criança e do Adolescente.

Minha gratidão à equipe de enfermagem do ambulatório de Pediatria do Hospital de Clínicas da UNICAMP, em especial, à Suzana, Cris e Elaine que ajudaram na coleta das amostras de sangue dos pacientes.

Agradeço a assistente Social Lucélia pela ajuda em localizar alguns dos pacientes.

Agradeço à aluna de iniciação científica, Anna Beatriz Lima do Valle Astur, pela ajuda nesse projeto.

Por fim, agradeço ao CNPq e FAEPEX UNICAMP cujos financiamentos tornaram possível a realização desse projeto e à CAPES que viabilizou meu período de doutorado sanduíche no exterior.

RESUMO

Introdução: A diferenciação sexual masculina normal envolve um maior número de eventos geneticamente determinados que a feminina, sendo assim, os distúrbios da diferenciação do sexo (DS) com ambiguidade genital e cariótipo 46,XY apresentam uma maior complexidade para uma definição etiológica. Entre estas, as Insensibilidades Parciais aos Andrógenos (IPA) podem apresentar quadro clínico indistinguível, principalmente, em relação à Deficiência da 5 α -redutase (D5AR2). A dosagem do Hormônio Anti-Mülleriano (HAM) tem se mostrado de grande auxílio na avaliação desses pacientes. No entanto, outros marcadores de células de Leydig e de Sertoli não foram avaliados neste grupo de pacientes. **Objetivos:** Avaliar a função das células de Leydig e de Sertoli em pacientes com ambiguidade genital, cariótipo 46,XY e produção normal de testosterona. **Métodos:** Foram incluídos 35 pacientes, sendo 8 com IPA, 8 com D5AR2 e 19 idiopáticos (sem etiologia definida) do Ambulatório do Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo (GIEDDS) e do Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica, ambos do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Todos eles já haviam sido avaliados ao diagnóstico e apresentavam produção normal de testosterona. Os pacientes com IPA e D5AR2 tiveram diagnóstico molecular confirmado. Para o grupo controle foram incluídos 42 indivíduos do sexo masculino, entre pacientes do HC – UNICAMP, alunos da pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) – UNICAMP, além de familiares destes. Todos os pacientes foram submetidos a uma nova avaliação com dosagens de LH, FSH, HAM, Inibina B e INSL3 basais e testosterona e dihidrotestosterona (DHT) basal e após estímulo com gonadotrofina coriônica humana

quando necessário. **Resultados:** A idade na avaliação atual não foi estatisticamente diferente entre o grupo casos e controles ($p = 0,595$). O HAM mostrou-se inversamente proporcional à idade, com uma correlação moderada, tanto no grupo total de casos ($r = -0,68$; $p < 0,0001$) como no grupo controle ($r = -0,83$; $p < 0,0001$). As concentrações séricas de HAM foram significativamente menores no grupo total de casos quando comparado com o grupo controle ($p = 0,031$). As concentrações séricas da inibina B também foram significativamente menores no grupo total de casos em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$) e nos pacientes com D5AR2 quando comparados com IPA e idiopáticos, e nos idiopáticos quando comparados com o grupo controle. Por outro lado, os valores de INSL3 foram significativamente maiores no grupo total de casos em relação aos controles ($p = 0,003$). **Conclusões:** As concentrações séricas de HAM, inibina B e INSL3 de uma forma geral não foram diferentes entre os três subgrupos de DDS 46,XY com produção normal de testosterona, no entanto as de inibina B foram menores nos pacientes com D5AR2 e idiopáticos em relação ao grupo controle. Nosso estudo foi o primeiro a avaliar todos os principais hormônios testiculares apenas em indivíduos com DDS 46,XY com produção normal de testosterona. Também foi o primeiro a mostrar que pacientes com D5AR2 apresentam concentrações séricas de inibina B mais baixas. Dessa forma, dosagem de inibina B apresenta um potencial considerável para trazer informações relevantes na investigação dos DDS 46,XY com produção normal de testosterona.

Palavras-chave: genitália; transtornos do desenvolvimento sexual; células de Leydig; células de Sertoli; inibina B; hormônio anti-mülleriano

ABSTRACT

Introduction: Normal male sexual differentiation involves a greater number of genetically determined events compared to the female one, then the disorders of sex development (DSD) with genital ambiguity and 46,XY karyotype present a greater complexity for its etiological definition. Among these, the Partial Androgen Insensitivity (IPA) may present clinical manifestations indistinguishable, mainly, in relation to 5 α -reductase Deficiency (D5AR2). The dosage of the Anti-Mullerian Hormone (HAM) has been shown to be of great value in the evaluation of these patients. However, other Leydig and Sertoli cell markers were not evaluated in this group of patients. **Objectives:** To evaluate the function of Leydig and Sertoli cells in patients with genital ambiguity, 46,XY karyotype and normal testosterone secretion.

Methods: 35 patients were included, 8 with IPA, 8 with D5AR2 and 19 idiopathic from the Outpatient Clinic of the Interdisciplinary Group of Studies on Sex Determination and Differentiation (GIEDDS) and Pediatric Endocrinology Outpatient Clinic, both from Clinical Hospital (HC) at State University of Campinas (UNICAMP). All of them had already been evaluated at diagnosis and had normal testosterone secretion. Patients with IPA and D5AR2 had a confirmed molecular diagnosis. For the control group, 42 male individuals were included, among HC – UNICAMP patients, undergraduate students of the Faculty of Medical Sciences (FCM) – UNICAMP, and their families. All patients underwent a further evaluation of basal levels of LH, FSH, HAM, Inhibin B and INSL3, and testosterone and dihydrotestosterone basal and after human chorionic gonadotropin stimulation when necessary. **Results:** The age at the current evaluation was not statistically different between the cases and controls group ($p = 0.595$). HAM was inversely proportional to age, with a moderate correlation, both in the total group of cases ($r = -0.68$, $p <$

0.0001) and in the control group ($r = -0.83$; $p < 0.0001$). Serum HAM concentrations were significantly lower in the total group of cases when compared to the control group ($p = 0.031$). Serum inhibin B concentrations were also significantly lower in the total group of cases compared to the control group ($p < 0.001$) and in D5AR2 subgroup in relation to IPA and idiopathic subgroups, and in the idiopathic one when compared to the control group. On the other hand, the concentrations of INSL3 were significantly higher in the total group of cases when compared to controls ($p = 0.003$).

Conclusions: Serum concentrations of HAM, inhibin B and INSL3 were generally no different among the three subgroups of 46,XY DSD with normal testosterone production, but inhibin B levels were lower in patients with D5AR2 and idiopathic subgroups when compared to the controls. Our study was the first to evaluate the other major testicular hormones only in patients with 46,XY DSD with normal testosterone secretion. It was also the first to show that patients with D5AR2 have lower serum inhibin B levels. In this sense, inhibin B shows a considerable potential in order to bring important information in the investigation of the 46 XY DSD with normal production of testosterone.

Key words: genitalia; disorders of sex development; Leydig cells; Sertoli cells; inhibin B; anti-müllerian hormone

ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Concentrações de Inibina B nas primeiras 2 décadas de vida. [adaptado de Crofton e cols, 2002 (16)] 25
- Figura 2:** Concentrações de HAM nas primeiras 2 décadas de vida. [adaptado de Rey e cols, 2005 (19)] 26
- Figura 3: A.** Escala de Prader [adaptado de White e Speiser, 2000 (29) e Prader e cols, 1954 (27)] **B.** Escala de Quigley [adaptado de Quigley e cols, 1995 (8)]. 31
- Figura 4:** Escore de Masculinização Externa (EMS) [adaptado de Ahmed e cols, 2000 (30) e 2016 (31)]. 32

TABELAS

Tabela 1: Classificação dos DDS segundo o Consenso de Chicago [adaptado de Lee e cols, 2006 (25)].	29
Tabela 2: Dados gerais clínicos e laboratoriais dos 35 casos de DDS 46,XY com ambiguidade genital.	51
Tabela 3: Comparação das concentrações séricas de hormônio anti-mülleriano, inibina B e INSL3 entre os casos e os controles, entre os três hormônios e por idade.	54
Tabela 4: Comparação de hormônio anti-mülleriano, inibina B e INSL3 entre os subgrupos de casos, com os controles, entre os três hormônios e por idade.	55
Tabela 5: Comparação dos dados laboratoriais entre os três subgrupos de casos de acordo com a presença ou não de puberdade.	57

ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH - Anti-Mullerian Hormone gene

AMHR2 - Receptor tipo 2 do Hormônio Anti-Mulleriano

AR - Androgen Receptor gene

β hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana Beta

BMP4 - Bone Morphogenetic Protein 4 gene

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CBX2 - ChromoBoX homolog 2 gene

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CTNNB1 - CaTeNiN Beta 1

D5AR2 - Deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2

DACH1 - DACHund drosophila homolog of 1 gene

DACH2 - DACHund drosophila homolog of 2 gene

DDS - Distúrbios da Diferenciação do Sexo

DHH - Desert HedgeHog

DHT - dihidrotestosterona

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EMS - *External Masculinisation Score*

EMX2 - EMpty spiracles homeoboX 2

FAEPEX – Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão

FCM - Faculdade de Ciências Médicas

FGF10 - Fibroblast Growth Factor 10 gene

FOXL2 - FORkhead transcription fator 2 gene

FSH - Hormônio folículo estimulante

FST - FolliSTatin

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

GLI - GLI-kruppel family

HAM - Hormônio Anti-Mülleriano

HC - Hospital de Clínicas

hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana

HOXA9 - HOmeoboX A9

HOXA10 - HOmeoboX A10

HOXA11 - HOmeoboX A11

HOXA13 - HOmeoboX A13

HOXD4 - HOmeoboX D4

HOXD13 - HOmeoboX D13

INSL3 - *INSulin-Like 3*

ILA - Insensibilidade Leve aos Andrógenos

IMC - Índice de Massa Corporal

IPA - Insensibilidade Parcial aos Andrógenos

ITA - Insensibilidade Total aos Andrógenos

LH - Hormônio luteinizante

LHX1 - Lim HomeoboX gene 1

LIMED - Laboratório de Investigação em Metabolismo e Diabetes

LSC - Ligamento suspensório cranial

MURCS - *Mullerian duct aplasia + Unilateral Renal agenesis + Cervicothoracic Somite anomalies*

NR5A1 - Nuclear Receptor subfamily 5, group A, member 1

PAX2 - PAired boX gene 2

PAX8 - PAired boX gene 8

PBX1 - Pre-B-cell leucemia transcription fator 1

PCR - Polymerase chain reaction

POR - P450 Oxidi-Reductase

PTCH1 - PaTCHed, drosophila, homolog of 1

RA - Receptor de Andrógenos

ROR2 - Receptor tyrosine Orphan kinase-like Receptor 2

RSPO1 - R-SPondin Family member 1

RXFP2 - RelaXin Family Peptide receptor 2

SHH - Sonic HedgeHog

SOX9 - Sry boX 9

SRD5A2 - Steroid 5-Alpha-Reductase 2

SRY - Sex determining Region on Y

TGF - Transforming Growth Factor

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

WNT - WiNgless-Type mmtv integration site family

WNT4 - WiNgless-Type mmtv integration site family, member 4

WNT5A - WiNgless-Type mmtv integration site Family, member 5A

WNT7A - WiNgless-Type mmtv integration site family, member 7A

WT1 - Wilms Tumor 1

SUMÁRIO

1. Introdução	19
1.1. Diferenciação Sexual Normal	19
1.2. Hormônios Testiculares	23
1.2.1. Hormônios produzidos pelas células de Sertoli	24
1.2.2. Hormônios produzidos pelas células de Leydig	26
1.3. Distúrbios da Diferenciação do Sexo	27
1.3.1. Definição e Epidemiologia	27
1.3.2. Avaliação Diagnóstica e Manejo	33
1.4. Distúrbios da Diferenciação do Sexo 46,XY com produção normal de testosterona	35
2. Justificativa	39
3. Objetivos	41
3.1. Geral	41
3.2. Específicos	41
4. Casuística e Métodos	42
4.1. Casuística	42
4.2. Ética e Delineamento	43
4.3. Avaliação clínica	43
4.4. Avaliação citogenética	45
4.5. Avaliação hormonal	45
4.6. Avaliação molecular	47
4.7. Análise estatística	48
5. Resultados	50
6. Discussão	58
7. Conclusão	64
8. Referências	65
Apêndices	72
Anexos	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. DIFERENCIAÇÃO SEXUAL NORMAL

O desenvolvimento sexual durante a vida intrauterina é um processo complexo, especialmente no que se refere ao sexo masculino. Nas primeiras duas semanas de gestação, a constituição cromossômica é a única coisa que difere os embriões de ambos os sexos (1). Sendo assim, por volta da 3^a – 4^a semana de gestação é formada a crista urogenital a partir do mesoderma intermediário coberto pelo epitélio celômico de origem mesodérmica (1–3). Por volta da 5^a semana, a cristaurogenital se divide nas cristas urinária e adrenogenital (3). Nesta última, no final da 5^a semana gestacional, o primórdio adrenal é separado do primórdio gonadal, com este sendo colonizado pelas células germinativas primordiais (de origem extragonadal). Por conseguinte, forma-se a gônada primordial (3). Esta estrutura é bipotencial, sendo a precursora tanto dos testículos como dos ovários, e na sua formação estão envolvidos os genes *NR5A1* (*Nuclear Receptor subfamily 5, group A, member 1*), *WT1* (*Wilms Tumor 1*), *EMX2* (*EMpty spiracles homeoboX 2*), *CBX2* (*ChromoBoX homolog 2*) e *PBX1* (*Pre-B-cell leukemia transcription fator 1*) (2).

A genitália interna de um indivíduo é formada a partir de um dos dois pares de ductos unipotenciais: ductos de Wolff ou mesonéfricos, no sexo masculino; e ductos de Müller ou paramesonéfricos, no sexo feminino. Esses dois pares de ductos são formados em todos indivíduos, independente do sexo genético, e os genes *PAX2* (*PAired boX gene 2*), *EMX2* e *LHX1* (*Lim HomeoboX gene 1*), além do ácido retinóico, são importantes na gênese de ambos (4,5). Os ductos de Wolff se formam ao redor da 4^a semana gestacional, provenientes do mesoderma intermediário,

apresentando-se como túbulos longitudinais no mesonefro que desembocam na cloaca (1,3,4). Para sua formação, além dos genes acima citados, são necessárias as proteínas *PAX2* e *PAX8* (*PAired boX gene 8*) (3). Por volta da 6ª a 7ª semana, logo após a formação dos ductos mesonéfricos, surgem e crescem os ductos de Müller no sentido craniocaudal, como invaginações longitudinais do epitélio celômico adjacente aos mesonefros, percorrendo a superfície anterolateral de cada crista urogenital (1,3,5). Esses ductos se abrem para a cavidade abdominal na sua extremidade cranial e se fundem na extremidade caudal, formando o canal uterino, que se projeta na parede posterior do seio urogenital (3). Do ponto de vista molecular, além dos genes já citados, são necessários a expressão dos genes *DACH1* (*DACHund drosophila homolog of 1*), *DACH2* (*DACHund drosophila homolog of 2*) e *WNT4* (*WiNgless-Type mmtv integration site family, member 4*) (5).

No que se refere à genitália externa, na 3ª semana de gestação são formadas, a partir do mesênquima que circunda a membrana cloacal, as pregas cloacais (3). Estas se fundem na porção cranial para formar o tubérculo genital, que dará origem ao *falus* (3). Já na região ventral, por volta da 6ª semana, formam-se as pregas uretrais. Ao lado de cada uma dessas, surgem elevações que se tornam as saliências labioescrotais (3). Por outro lado, a cloaca dá origem, posteriormente, ao canal anorretal e, anteriormente, ao seio urogenital, entre a 4ª e 7ª semana, quando o septo urorretal cresce a partir da membrana cloacal (3). Para a formação da genitália externa e do seio urogenital é necessária a expressão de alguns genes, como *HOXD4* (*HOmeoboX D4*), *HOXA13* (*HOmeoboX A13*), *HOXD13* (*HOmeoboX D13*), *FGF10* (*Fibroblast Growth Factor 10*), *PTCH1* (*PaTCHed, drosophila, homolog of 1*), *ROR2* (*Receptor tyrosine Orphan kinase-like Receptor 2*) e da via de

sinalização *SHH* – *GLI* – *BMP4* (*Sonic HedgeHog* – *GLI-kruppel family* – *Bone Morphogenetic Protein 4*) (3).

Para a diferenciação gonadal, tanto de testículos como de ovários, é necessário um delicado equilíbrio no tempo e nível de expressão dos diversos genes envolvidos no processo (6). Por volta da 7ª semana, os embriões XY começam a expressar o gene *SRY* (*Sex determining Region on Y*), sendo o gatilho para uma cascata de interações gênicas que levam a diferenciação gonadal em testículos (6,7). Na rota de diferenciação testicular, o gene *SOX9* (*Sry bOX 9*) é o primeiro gene, entre vários, regulado pela expressão do *SRY*, sendo esta amplificada pelo *WT1* e pelo *NR5A1*. O *SOX9* é responsável pela formação das células de Sertoli e consequente expressão do gene *AMH* (*Anti-Mullerian Hormone*), gene do Hormônio Anti-Mulleriano (HAM) (7). Nesse contexto, o *WT1* é um ativador direto da transcrição do receptor tipo 2 do HAM (*AMHR2*) nos ductos de Müller (5). Dessa forma, entre a 8ª e 9ª semana de gestação, ocorre a regressão dos ductos de Müller, no sentido craniocaudal, por mecanismos de migração de células epiteliais, transformação de epitélio em mesênquima e apoptose (5,7). Essa regressão ocorre somente nessa janela específica de tempo, pois corresponde ao período em que os ductos de Müller ainda não estão expressando os marcadores epiteliais específicos (5). A ação do HAM, devido ao seu alto peso molecular, é parácrina, sendo cada testículo responsável pela regressão do ducto de Müller ipsilateral. A diferenciação das células de Leydig é comandada pelas células de Sertoli e por fatores parácrinos secretados pelas células peritubulares, como a proteína expressa pelo gene *DHH* (*Desert HedgeHog*) (7). Com esse processo, inicia-se, estimulado pela gonadotrofina coriônica humana (hCG) produzida no sinciotrofoblasto, a produção de testosterona em altas doses, que é responsável pela diferenciação dos ductos de Wolff entre a 9ª

e a 13^a semana de gestação, com cada testículo sendo também responsável pela ação hormonal sobre o ducto ipsilateral (4,7). Dessa maneira, formam-se o epidídimo, a partir da parte proximal do ducto, os ductos deferentes, a partir da parte distal, e a partir da terminação caudal dessa última, as vesículas seminais (4). Durante o processo de diferenciação, a testosterona é convertida, pela enzima 5 α -redutase tipo 2, em dihidrotestosterona (DHT), que possui maior afinidade pelo receptor de andrógenos (RA) (7). Esse hormônio é o principal responsável pela virilização da genitália externa masculina, formando o pênis, uretra peniana e fundindo as saliências labioescrotais em uma bolsa escrotal, entre 10^a e 14^a semanas de gestação (3,7,8). Além disso, a DHT é responsável pelo desenvolvimento da próstata e da uretra prostática, a partir do seio urogenital (8). Por volta das 14 – 16^a semanas, o pênis está formado e apresenta aproximadamente o mesmo tamanho de um clitóris (3,9). A partir de então, seu crescimento se dará pela manutenção da produção testicular de testosterona que, em um primeiro momento é estimulada pela hCG placentária, e, posteriormente (3^o trimestre), é estimulada pelo LH (hormônio luteinizante) hipofisário até o fim da gestação (9). O testículo encontra-se preso à parede abdominal posterior pelo ligamento suspensório cranial (LSC) e ao futuro anel interior do canal inguinal pelo *gubernaculum* e a descida até a bolsa escrotal ocorre em duas principais etapas: a fase transabdominal e a fase inguinoescrotal (10). Na primeira etapa, que ocorre entre a 10^a e 23^a semana, os andrógenos induzem a involução do LSC e o hormônio INSL3 (*INSulin-Like 3*) controla a diferenciação gubernacular, movendo o testículo até a região inguinal intrabdominal (10,11). A segunda fase ocorre entre a 28^a e a 34^a semana e basicamente cabe aos andrógenos a modulação do crescimento e diferenciação do gubernaculum levando os testículos à posição escrotal (9,10).

No que se refere à diferenciação sexual feminina, mulheres não expressam HAM durante o desenvolvimento fetal permitindo a diferenciação dos ductos de Müller (5). O gene *FOXL2* (*Forkhead transcription fator 2*) inibe, entre outras rotas envolvidas na diferenciação testicular, a expressão do *SOX9* (6). Com isso, na falta de HAM, testosterona e *INSL3*, ocorre a degeneração passiva dos ductos de Wolff e os ductos de Müller se diferenciam na genitália interna feminina, que consiste nas tubas uterinas, útero e porção superior da vagina (5). Esse processo depende da ação dos genes da família *HOX* (*HOXA 9*, *HOXA 10*, *HOXA 11* e *HOXA 13*) e da família *WNT* [*WNT7A*, *WNT4*, *WNT5A*, *CTNNB1* (*CaTeNiN Beta 1*)] (5). O *WNT4* e a *RSPO1* (*R-SPondin Family member 1*) estabilizam a beta-catenina responsável por promover a expressão dos genes envolvidos na diferenciação ovariana (6). Esses genes, entre eles o *FST* (*FolliSTatin*) e o *FOXL2*, aumentam sua expressão um pouco mais tarde na gestação, quando comparado aos genes da diferenciação testicular, e para manutenção ovariana faz-se necessário a presença de dois cromossomos X íntegros (6,9). Já a genitália externa feminina se forma, na ausência da ação androgênica, com o tubérculo genital dando origem ao clitóris, as pregas urogenitais e as saliências labioscrotais aos pequenos e grandes lábios, respectivamente, e o seio urogenital, à uretra feminina e à porção inferior da vagina (9).

1.2. HORMÔNIOS TESTICULARES

Os testículos são constituídos de numerosos lóbulos formados por tubos contorcidos (túbulos seminíferos), que representam 80 a 85% de sua massa, sustentados por tecido conjuntivo frouxo (12). Os túbulos seminíferos estruturam-se em células epiteliais que formam sua parede e esta é revestida pelas células

germinativas (espermatogônias) e pelas células de Sertoli (12). Por outro lado, imersas no tecido intersticial do testículo, encontram-se as células de Leydig (12).

1.2.1. Hormônios produzidos pelas Células de Sertoli

Inibina B: é um hormônio glicoproteico que consiste de uma subunidade alfa ligada a uma subunidade beta (B) por pontes dissulfeto. Os genes dessas subunidades estão localizados no cromossomo 2. Este hormônio é produzido pelas células de Sertoli em resposta a estimulação pelo FSH (hormônio folículo estimulante), com quem tem uma relação de retroalimentação negativa (13,14). Além dessa relação, foi demonstrado *in vitro* que a Inibina B, age como regulador autócrino e parácrino da proliferação, diferenciação e esteroidogênese das células de Sertoli e das células de Leydig (13). As concentrações séricas desse hormônio apresentam um padrão bifásico, com os maiores valores ocorrendo nos primeiros meses (principalmente entre 3 e 6 meses) e no início da puberdade, e o nadir entre 6 e 10 anos (15,16). No final da puberdade, os valores séricos chegam a um platô (16) (Figura 1). A contagem de esperma e o volume testicular são forte e positivamente correlacionados com as concentrações séricas de Inibina B (13).

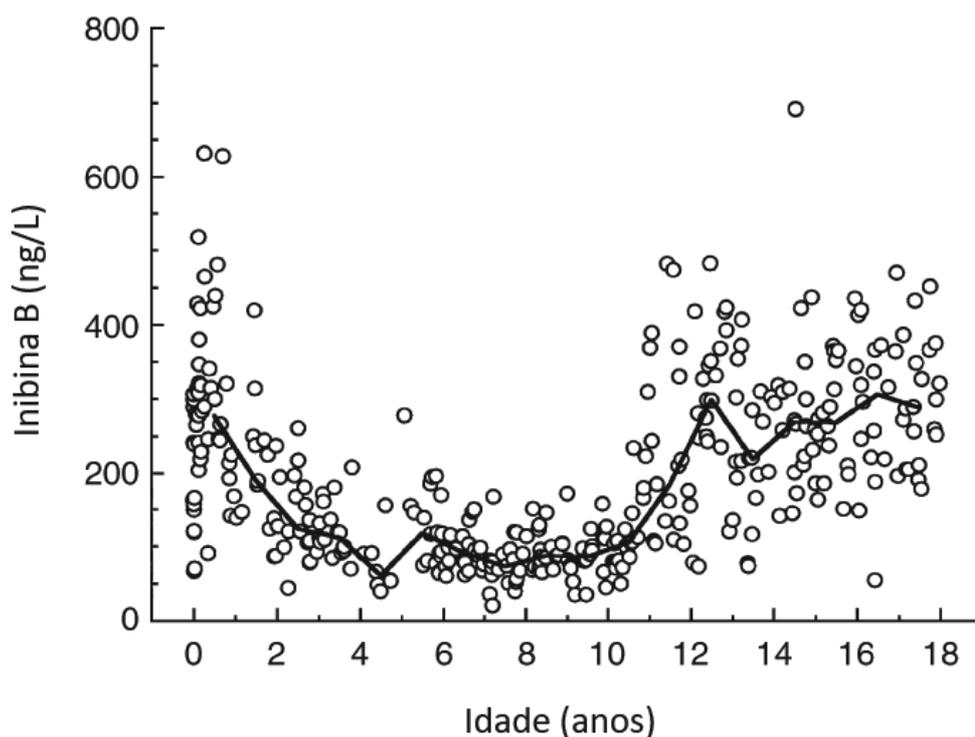


Figura 1: Concentrações de Inibina B nas primeiras 2 décadas de vida [adaptado de Crofton e cols, 2002 (16)].

Hormônio Anti-Mulleriano: é um hormônio glicoproteico homodimérico, membro da família TGF-beta (*Transforming Growth Factor*) (14,17). É codificado a partir do gene *AMH*, localizado em 19p13.3 e se liga ao Receptor AMH tipo II, cujo gene *AMHR2* se localiza em 12p13 (17). O HAM é regulado por três fatores: FSH, espermatócitos entrando na prófase da primeira divisão meiótica e testosterona, sendo este último o mais importante (14). Além do que foi descrito anteriormente, o HAM apresenta menores concentrações nos primeiros dias de vida, mas esses valores começam a se elevar na primeira semana seguindo a fase de proliferação das células de Sertoli, estimulado pelo aumento do FSH (17,18). As concentrações aumentam rapidamente até chegarem no pico aos 6 meses de idade. Na puberdade, com o aumento das concentrações de testosterona e ativação do RA nas células de Sertoli (que não

ocorre no período neonatal), os valores de HAM sérico começam a diminuir até os menores níveis (17–19) (Figura 2). Nos adultos, HAM parecer ter efeitos parácrinos, inibindo diferenciação e esteroidogênese nas células de Leydig e envolvimento na mobilidade espermática. Isto justificaria a maior concentração desse hormônio no lúmen dos túbulos seminíferos que na circulação (18).

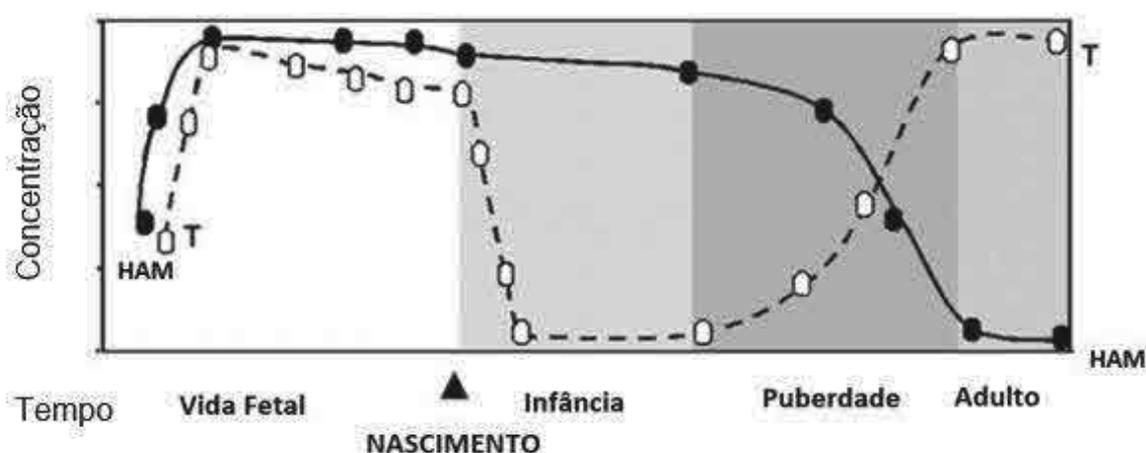


Figura 2: Concentrações de HAM nas primeiras 2 décadas de vida [adaptado de Rey e cols, 2005 (19)]. Legenda: HAM= Hormônio Anti-Mülleriano / T= Testosterona

1.2.2. Hormônios produzidos pelas Células de Leydig

Testosterona: é o principal andrógeno testicular circulante, sendo sintetizado através da estimulação do LH (12), que aumenta o transporte e mobilização do colesterol na via esteroidogênica, além de estimular a expressão gênica e atividade das enzimas dessa via (12). As etapas da esteroidogênese seguem o mesmo padrão que na síntese de andrógenos nas glândulas adrenais, a exceção da conversão da androstenediona em testosterona pela enzima 17β -hidroxisteróide desidrogenase.tipo 3 (12). A testosterona se liga ao RA para executar suas ações.

Dihidrotestosterona (DHT): é um andrógeno formado a partir da conversão da testosterona pela enzima 5 α -redutase tipo 2. (20,21). O hormônio DHT se liga ao RA e tem uma capacidade 10 vezes mais potente que a testosterona de induzir o sinal nesse receptor (21). Esse hormônio é necessário para o desenvolvimento da genitália externa nos fetos masculinos e pelo crescimento da pilificação corporal nos puberdade e vida adulta (20).

INSL3: é um hormônio peptídico heterodimérico, cujo gene possui apenas 2 éxons e está localizado em 16p14 (22). O receptor desse hormônio é transcrito do gene *RXFP2 (RelaXin Family Peptide receptor 2)* (22). O INSL3 está relacionado com a primeira fase de descida testicular no período intrauterino, principalmente entre a 12^a e a 14^a semana de gestação, quando seus valores máximos são encontrados no líquido amniótico (10,11,22). As concentrações desse hormônio vão diminuindo até os níveis mínimos no final da gestação, mantendo-se assim até a puberdade, quando volta a elevar-se a valores maiores no início da vida adulta (22). Aparentemente, o INSL3 tem um papel na manutenção da espermatogênese e sua expressão é independente do mecanismo de retroalimentação do eixo gonadal-hipofisário e apresentam uma mínima variação diurna (11,22). Devido a isso, sugere-se que o INSL3 seja um marcador de função de células de Leydig mais fidedigno que a testosterona (11).

1.3. DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO DO SEXO

1.3.1. Definição e Epidemiologia

As anomalias da determinação e diferenciação do sexo trazem consigo graves implicações médicas para o indivíduo e psicossociais tanto para ele quanto para sua família (9). Dessa maneira, um diagnóstico precoce e preciso se faz

necessário, principalmente nos casos em que esses distúrbios se manifestam clinicamente com um quadro de genitália ambígua (9).

Até o ano de 2006, esses estados patológicos que causam anormalidades da formação sexual (especialmente a ambiguidade genital) eram conhecidos, de forma geral, como intersexo, o que incluía suas variações, tais como pseudo-hermafroditismo masculino, disgenesia gonadal, hermafroditismo verdadeiro e pseudo-hermafroditismo feminino (23,24). Com o avanço das técnicas de análise molecular, foi possível elucidar melhor a etiologia dessas alterações e, inclusive, ampliar seu o espectro clínico (25). Sendo assim, em 2006, quando publicado o Consenso de Chicago (25), organizado pela *Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society* e a pela *European Society for Paediatric Endocrinology*, foi proposta a mudança da nomenclatura de intersexo para Distúrbios da Diferenciação do Sexo (DDS). Além disso, este foi definido como condições congênitas em que o desenvolvimento cromossômico, gonadal ou anatômico é atípico (25). Com isso, foram incluídos não só as etiologias que causam genitália ambígua, mas também algumas causas de atraso puberal e de infertilidade (25), sendo este consenso revisado em 2016 (26).

Analisando a etiologia dos DDS, o consenso propôs uma subclassificação etiológica levando em consideração o cariótipo dos pacientes. Dessa maneira, os indivíduos foram divididos em três grupos: DDS por alterações de cromossomos sexuais, DDS 46,XY e DDS 46,XX (Tabela 1) (25).

Tabela 1: Classificação dos DDS segundo o Consenso de Chicago [adaptado de Lee e cols, 2006 (25)].

Alteração de cromossomos sexuais	DDS 46,XY	DDS 46,XX
(A) 45,X - síndrome de Turner e variantes	(A) Distúrbios do desenvolvimento gonadal	(A) Distúrbios do desenvolvimento gonadal
(B) 47,XXY - síndrome de Klinefelter e variantes	1. Disgenesia gonadal completa	1. Disgenesia gonadal completa
(C) 45,X/46,XY - Disgenesia gonadal mista ou DDS Ovotesticular	2. Disgenesia gonadal parcial	2. DDS ovotesticular
(D) 46,XX/46,XY – DDS ovotesticular	3. Síndrome de regressão testicular	3. DDS testicular
.	4. DDS ovotesticular	(B) Excesso de andrógenos (ovariano)
	(B) Distúrbios na síntese ou ação dos andrógenos (testicular)	1. Fetal (ex. deficiência da 21-OHase, deficiência da 11-OHase...)
	1. Defeito na biossíntese dos andrógenos (ex.: deficiência da 17 β OH-esteróide desidrogenase 3, deficiência da 5 α -redutase 2, mutações na StaR...)	2. Fetoplacentária (deficiência da aromatase placentária, deficiência da POR...)
	2. Defeito na ação androgênica (ITA, IPA)	3. Materno (tumor, exógeno...)
	3. Defeito no receptor de LH (hipoplasia ou aplasia das células de Leydig)	(C) Outros: Extrofia da cloaca, atresia da vagina, MURCS, outras síndromes...
	4. Distúrbios do HAM ou do seu receptor (persistência dos ductos de Muller)	
	(C) Outros	

DDS = Distúrbio da Diferenciação do Sexo; HAM = hormônio anti-mulleriano; IPA = Insensibilidade Parcial aos Andrógenos;

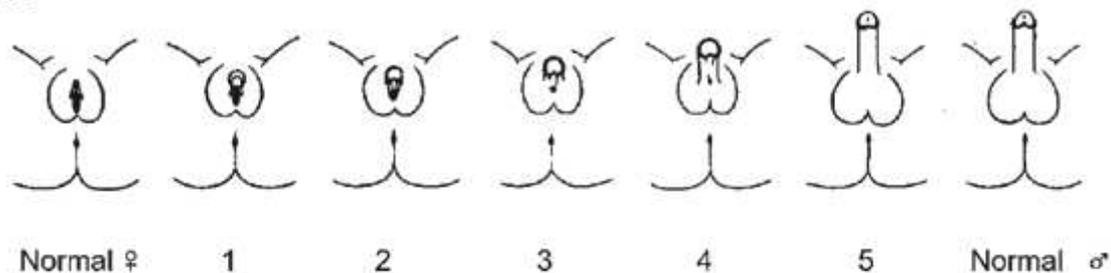
ITA = Insensibilidade Total aos Andrógenos; MURCS = *Mullerian duct aplasia + Unilateral Renal agenesis + Cervicothoracic Somite anomalies*;

OHase = hidroxilase; POR = P450 oxido-redutase

No que se refere à incidência desses distúrbios, não há dados claros, entretanto, estima-se uma taxa de ambiguidade genital na ordem de 1 para 4.500 a 5.500 nascimentos (26). Entre os subgrupos que compõem os DDS, há uma grande variação da incidência. A incidência entre os DDS por alteração de cromossomos sexuais pode variar de aproximadamente 1 para 500 a 1.000 nascimentos na Síndrome de Klinefelter e 1 para 2.000 na Síndrome de Turner até 1 para 100.000 no DDS ovotesticular (26). Já os DDS 46,XY têm uma estimativa de incidência por volta de 1 para 20.000 recém-nascidos (26). Por fim, os DDS 46,XX são estimados em 1 para 14.000 a 15.000 nascimentos (26).

No aspecto clínico dos DDS, em especial a ambiguidade genital, sempre teve a avaliação propedêutica como o primeiro grande desafio do seu manejo. Os primeiros esforços para normatizar essa abordagem começaram na década de 1950. Destaca-se, nesse sentido, a criação por Prader de uma escala para avaliação genital das meninas com Hiperplasia Adrenal Congênita (Figura 3A), assim como os trabalhos de Wilkins e cols (em 1955 e 1960) para classificação e manejo do que na época era definido como intersexo (23,24,27). Embora Wilkins e cols já tivessem conceituado em 1960, um relato mais completo do que deve ser considerado ambiguidade genital foi dado a partir das noções estabelecidas por Danish em 1982 (24,28). Em 1995, Quigley e cols (8), baseados na escala de Prader, elaboraram uma escala para classificação da genitália dos diversos graus de Insensibilidade Androgênica, porém não levava em consideração a localização gonadal (Figura 3B).

3A



3B

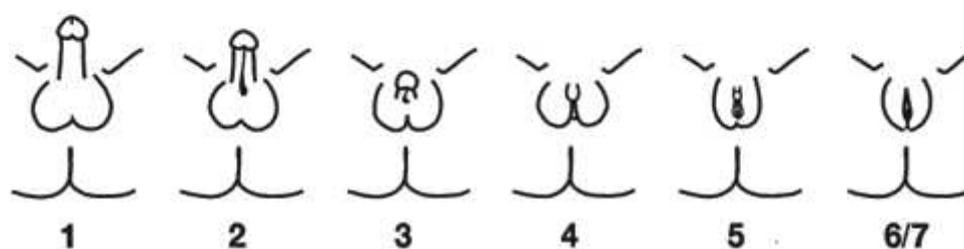


Figura 3: A. Escala de Prader para meninas com Hiperplasia Adrenal Congênita [adaptado de White e Speiser, 2000 (29) e Prader e cols, 1954 (27)]. **B.** Escala de Quigley pacientes com Síndrome de Insensibilidade aos Andrógenos [adaptado de Quigley e cols, 1995 (8)].

Somente em 2000, Ahmed e cols criaram a Escala de Masculinização Externa (EMS) (Figura 4) cujo foco, ao contrário de Prader, eram os meninos com DDS, mas que tornava a avaliação genital mais abrangente, objetiva e completa (30).

3	Sim	Não	Normal		
2			Distal		
1,5				Labioescrotal	Labioescrotal
1				Inguinal	Inguinal
0,5				Abdominal	Abdominal
0	Não	Sim		Ausente	Ausente
	Fusão Escrotal	Micropênis	Meato Uretral	Gônada Direita	Gônada Esquerda

Figura 4: Escore de Masculinização Externa (EMS) [adaptado de Ahmed e cols, 2000 (30) e 2016 (31)]. O valor para genitália masculina normal é 12.

Sendo assim, com o advento do Consenso de 2006 e reforçado pela sua revisão de 2016, a ambiguidade genital foi definida como a forma precoce de apresentação de DDS e que compreende os seguintes aspectos (25,26):

- Ambiguidade genital óbvia
- Genitália aparentemente feminina com aumento do clitóris, fusão labial posterior ou massa em região inguinal/labial
- Genitália aparentemente masculina com criptorquidia bilateral, hipospadias perineal isolada ou hipospadias leve com criptorquidia
- História familiar de DDS
- Discordância entre a aparência genital e o cariótipo pré-natal e/ou ultrassonografia gestacional.

Indo mais além, o consenso definiu as formas de apresentação clínica tardia dos DDS:

- Ambiguidade genital não reconhecida previamente
- Clitoromegalia progressiva
- Hérnia inguinal em mulher
- Puberdade atrasada ou incompleta
- Virilização puberal progressiva em mulher
- Amenorréia primária
- Desenvolvimento mamário em homem
- Hematúria cíclica ocasional ou franca em homem

Por fim, apenas na revisão do consenso em 2016 é que foi incorporado oficialmente o EMS para uso na prática clínica da avaliação de pacientes com DDS, embora já estivesse recomendado seu uso nos guias da Sociedade de Endocrinologia do Reino Unido para manejo dos DDS (25,26,31,32).

1.3.2. Avaliação Diagnóstica e Manejo

A avaliação de um paciente com suspeita de DDS começa com uma anamnese completa (envolvendo dados pré-natais, maternos e familiares) e um exame físico minucioso. Neste último deve-se atentar a antropometria, a presença de dismorfismos e, principalmente, a avaliação detalhada da genitália levando em consideração os seguintes itens: presença e localização de gônadas palpáveis, medida do tamanho e diâmetro do falo, localização da abertura uretral, presença de fusão e pigmentação das saliências labioescrotais (26,31). Usando o EMS na avaliação genital, valores menores que 11 devem ser investigados (31). Nos

pacientes adolescentes, a avaliação global do desenvolvimento puberal é obrigatória (26,31).

Uma vez cumprida essa etapa semiológica fundamental, faz-se necessário seguir a investigação com exames complementares. A primeira linha de exames, incluem a dosagem de 17-OH-progesterona e eletrólitos (principalmente nos recém-nascidos sem gônadas palpáveis, afim de descartar a Hiperplasia Adrenal Congênita, especialmente a forma perdedora de sal), andrógenos (principalmente Testosterona e DHT), HAM e gonadotrofinas (FSH e LH) (26,31). Tudo isso em conjunto com exames para definição dos sexo genético (por exemplo, Cariótipo) e Ultrassom Pélvico (26,31).

As dosagens hormonais de andrógenos, gonadotrofinas e HAM são importantes para avaliação da presença e funcionamento gonadal, principalmente no que se refere ao tecido testicular (26). No entanto, no que se refere aos dois primeiros, há uma janela de oportunidade específica para sua dosagem basal, que seria o período da minipuberdade (nos primeiros 30 a 100 dias de vida no caso dos meninos) e a partir da puberdade (26,33). Fora desta janela, as concentrações basais das gonadotrofinas são indetectáveis e apenas as dosagens de andrógenos são possíveis através do teste de estímulo com β hCG (31). Já o HAM, tem a vantagem de apresentar concentrações basais altas até a puberdade, facilitando sua dosagem na infância (34).

Uma vez definido o sexo de criação (no caso principalmente dos recém-nascidos), deve-se realizar a correção cirúrgica da genitália conforme a decisão. Esta, em geral, pode ser dividida em 4 componentes básicos: a) cirurgia do tubérculo genital (clitoroplastia, correção de hipospádia), b) manejo das estruturas Mullerianas

(remoção delas, dilatação vaginal), c) cirurgia das gônadas (remoção, biópsia) e d) readaptação do períneo (perineoplastia) (26).

Reposição hormonal também faz parte da terapêutica de alguns casos de DDS. Nos pacientes com Hiperplasia Adrenal Congênita, reposição de glicocorticóides e, nos perdedores de sal, de mineralocorticóides, se faz indispensável. No que se refere aos pacientes com funcionamento gonadal inadequado ou gonadectomizados, a reposição de esteróides sexuais se faz necessária na puberdade e na vida adulta (26). A indução da puberdade nas meninas deve ser realizada entre os 10 e 12 anos e há uma tendência ao uso de estradiol, com o uso, após 1 a 3 do início da indução, de progestágenos para facilitar a menstruação nas pacientes que possuem útero (26). Já nos meninos, o ideal da indução puberal é entre 11 e 13 anos e preconiza-se o uso de testosterona injetável (26).

1.4. DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO DO SEXO 46,XY COM PRODUÇÃO NORMAL DE TESTOSTERONA

Quando se foca especificamente naqueles diagnósticos dos DDS 46,XY, os quais a produção testicular de testosterona está dentro do normal, encontra-se três diagnósticos etiológicos. Dessas etiologias, conforme a classificação estabelecida pelo Consenso de 2006, duas estão inseridas na subdivisão dos Distúrbios da Síntese ou Ação Androgênica: a Síndrome da Insensibilidade aos Andrógenos, que é um distúrbio da ação dos andrógenos, e a Deficiência da 5 α -redutase tipo 2 (D5AR2), que é um distúrbio da síntese androgênica (25). O terceiro diagnóstico etiológico refere-se aos DDS 46,XY com produção normal de testosterona que não

são classificados nestes dois subgrupos e que são chamados por alguns autores de idiopáticos.

Síndrome da Insensibilidade aos Andrógenos: é uma disfunção do RA, cujo gene (*AR = Androgen Receptor*) é de cópia única e está localizado em Xq11-12 e apresenta 8 éxons (8,35). Essa alteração funcional do RA acarreta uma síndrome de resistência hormonal. O espectro fenotípico desta condição é variável e depende do quanto resta de função residual desse receptor. Sendo assim é classificada como: Completa (ITA), quando não há função do receptor e apresenta-se com fenótipo feminino (normalmente com amenorréia primária na adolescência ou com gônadas palpáveis em paciente com genitália externa feminina ou com discordância entre o sexo genético pré-natal e o fenotípico pós-natal); Parcial (IPA), cuja apresentação clínica pode variar de uma genitália externa quase feminina até uma genitália masculina quase normal; ou Leve (ILA), normalmente com genitália masculina normal e presença de ginecomastia na puberdade e/ou infertilidade na vida adulta (35). Pilificação pubiana escassa assim como ginecomastia são achados comuns aos variados graus de insensibilidade (36). A genitália interna varia de ausente na ITA a masculina na IPA e ILA (36). É uma doença de herança recessiva ligada ao X sendo frequente a presença de casos familiares pelo lado materno (36). Indivíduos com esse distúrbio normalmente apresentam concentrações na faixa de normal para alta de testosterona e aumentadas de LH, tanto no período neonatal conhecido como minipuberdade quanto na puberdade propriamente dita (36).

Deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2 (D5AR2): é uma doença de herança autossômica recessiva que altera a conversão da testosterona em DHT, seu

metabólito mais ativo, essencial para desenvolvimento da genitália masculina durante a embriogênese, principalmente no que se refere à genitália externa e a próstata (37–39). O gene da enzima 5 α -redutase tipo 2 é o *SRD5A2*, que se localiza em 2p23 e apresenta 5 éxons (37). Esse distúrbio apresenta um espectro clínico amplo de ambiguidade genital, a depender da quantidade residual de atividade enzimática, abrangendo desde uma genitália quase feminina com clitoromegalia até uma genitália masculina apresentando micropênis isolado ou associado com diferentes graus de hipospádia (37,38). Na puberdade, esses pacientes apresentam virilização espontânea já que a testosterona é o hormônio essencial nessa fase e, diferentemente da Insensibilidade aos Andrógenos, raramente apresentam ginecomastia na adolescência (20,37,38). Normalmente, pacientes com esse diagnóstico apresentam pouca pilificação facial e corporal na vida adulta, mas normal na genitália, e não há relatos de calvície de padrão masculino (20). O diagnóstico pode ser feito com a apresentação clínica acima descrita associada a uma relação entre testosterona e DHT maior que 30. No entanto, valores menores nessa relação não excluem o diagnóstico, com a análise molecular do *SRD5A2* sendo necessária principalmente nos recém-nascidos com ambiguidade genital, cariótipo 46,XY e produção normal de testosterona (20). Este diagnóstico é fundamental, pois a opção de criação pelo sexo masculino nestes casos está indicada devido a grande frequência de mudança de sexo de feminino para masculino na puberdade nos pacientes criados no sexo feminino (26). A prevalência na população geral ainda é desconhecida (20), no entanto, em algumas localidades, como República Dominicana, Líbano e Papua Nova Guiné apresentam prevalência alta, principalmente devido a casamentos consanguíneos (20).

DDS 46,XY idiopáticos: apesar do avanço nas pesquisas na área, ainda 25% dos DDS 46,XY são considerados idiopáticos. Isso se deve, provavelmente, ao desconhecimento ainda de alguns genes relacionados à complexa cascata de diferenciação sexual masculina ou a efeitos ambientais na diferenciação sexual. Nos últimos anos, trabalhos têm demonstrado uma possível associação de alguns desses casos com restrição do crescimento intrauterino (40–43). Clinicamente, os casos idiopáticos geralmente se apresentam com ambiguidade genital, com variados graus de hipospádia, podendo estar associado ou não com criptorquidia (9).

2. JUSTIFICATIVA

A diferenciação sexual masculina normal envolve um maior número de eventos geneticamente determinados que a feminina, sendo assim, as ambiguidades genitais com cariótipo 46,XY apresentam uma maior complexidade para uma definição etiológica.

Entre as principais etiologias de ambiguidade genital com cariótipo 46,XY, as IPA podem apresentar quadro clínico indistinguível das demais causas, em especial da D5AR2. Isso ocorre, principalmente, na falta de casos semelhantes na família ou histórico de consanguinidade entre os pais, quando não se pode avaliar o padrão de herança, e, antes da puberdade, na ausência de ginecomastia (presente nas IPA) ou de virilização (presente na D5AR2).

A virilização durante a puberdade e a frequente mudança da identificação psicossocial dos pacientes com D5AR2, não gonadectomizados antes da puberdade, diferentemente dos casos com IPA, reforçam a importância do diagnóstico precoce para escolha do sexo de criação.

O diagnóstico da D5AR2, assim como das IPA, somente é confirmado com a identificação da alteração molecular no gene específico, que é um recurso dispendioso e restrito a poucos centros. As alterações hormonais encontradas, que servem como triagem, são o aumento da relação entre testosterona e DHT basal ou pós-estímulo com β hCG, que nem sempre é observado; a dosagem urinária diminuída de metabólitos 5α -reduzidos; e a quantificação da atividade da 5α -redutase em cultura de fibroblastos de pele da região genital, que apesar de mais específicas, e de alto custo são de difícil realização.

A avaliação do HAM tem se mostrado de grande auxílio na avaliação de pacientes com ambiguidade genital, sendo encontrados valores elevados nos casos de insensibilidade androgênica, em especial, nas formas completas e em pacientes recém-nascidos ou na puberdade (44–46). Já em pacientes com D5AR2, foram relatados apenas dois estudos anteriores do nosso grupo nos quais pacientes com esta doença apresentaram valores de HAM abaixo da média, podendo indicar que a testosterona não necessita ser metabolizada em DHT para modular a secreção de HAM pelas células de Sertoli (47,48).

Dessa forma, o HAM surge como uma ferramenta diagnóstica bastante interessante, já que sua dosagem basal é possível nos primeiros anos de vida, quando a apresentação clínica é bastante semelhante entre os diagnósticos acima citados. No entanto, outros marcadores de células de Leydig e de Sertoli não foram avaliados neste grupo de pacientes com ambiguidade genital, cariótipo 46,XY e produção normal de testosterona para auxiliar no diagnóstico precoce diferencial etiológico.

Portanto, a realização de um estudo que avalie e compare todos os demais marcadores de células de Leydig e de Sertoli no âmbito dos DDS 46 XY com produção normal de testosterona seria interessante. Isso porque pode trazer informações úteis para auxiliar no diagnóstico diferencial ou mesmo para ajudar a otimizar o uso de recursos de biologia molecular.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar a função das células de Leydig e de Sertoli em pacientes com ambiguidade genital, cariótipo 46,XY e produção normal de testosterona.

3.2. ESPECÍFICOS

1. Comparar os indivíduos com IPA, D5AR2 e idiopáticos entre si em relação à:
 - a) Apresentação clínica
 - b) Concentração sérica de testosterona, DHT, T/DHT e INSL3 (função de células de Leydig)
 - c) Concentração sérica de HAM e inibina B (função de células de Sertoli)
 - d) Concentrações séricas de gonadotrofinas (LH e FSH)

2. Comparar os indivíduos com IPA, D5AR2 e idiopáticos entre si e estes com indivíduos controles normais quanto às concentrações séricas de:
 - a) HAM
 - b) Inibina B
 - c) INSL3
 - d) Avaliar a interferência da idade ou da puberdade nas concentrações séricas hormonais entre os indivíduos com IPA, D5AR2 e idiopáticos entre si e com os controles.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. CASUÍSTICA

Os casos foram recrutados a partir de um grupo de mais de 400 casos com ambiguidade genital acompanhados há mais de 20 anos no Ambulatório do Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo (GIEDDS) e do Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica, ambos do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (49). Os pacientes incluídos nesse grupo deveriam apresentar gônadas palpáveis (em região escrotal e/ou inguinal, bilateralmente) e ter um dos diagnósticos a seguir: IPA, D5AR2 e idiopático. Todos eles já haviam sido avaliados ao diagnóstico e apresentavam produção normal de testosterona. Não foram incluídos os pacientes que apresentaram mutação no gene *NR5A1*.

Para o grupo controle foram recrutados indivíduos do sexo masculino, com idades entre 3 meses e 40 anos completos, entre pacientes do HC – UNICAMP, alunos da pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) – UNICAMP, além de familiares destes, que respeitassem os seguintes critérios:

Critério de Inclusão

Indivíduos do sexo masculino sem fatores ou doenças que acarretassem alteração na função testicular.

Critérios de Exclusão

- Peso de nascimento menor 2500g
- História prévia de ambiguidade genital
- História prévia de hipospádia ou varicocele ou criptorquidia uni ou bilateral

- Ter apresentado processos infecciosos de qualquer ordem nos testículos
- Ter tido lesão traumática moderada a grave nos testículos
- Ter história de neoplasia testicular
- Ter história de doença adrenal
- Estar usando medicações que alterem a função testicular ou o eixo gonadal

As informações referentes aos critérios de inclusão e exclusão do grupo controle foram obtidas por meio de inquérito na hora do recrutamento e caso o indivíduo apresentasse dúvida quanto a informação ou não a soubesse, ele não era incluído.

4.2. ÉTICA E DELINEAMENTO

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP. O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido dos pacientes e/ou dos responsáveis legais (nos menores de 18 anos) tanto para o grupo de casos quanto dos controles de acordo com as normas do CEP (Parecer CEP 434/2006) (Apêndice).

Delineamento: Estudo transversal com componente histórico (coorte).

4.3. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os dados do grupo de casos foram coletados de duas formas:

- a) No momento do recrutamento para o estudo, por meio de uma consulta clínica e incluiu:
 - Idade (em meses)

- Peso (em quilogramas) [transformado em escore z segundo NCHS 2000 (50)]
- Estatura (em centímetros) [transformado em escore z segundo NCHS 2000 (50)]
- Índice de Massa Corporal (IMC) (em kg/m²) [transformado em escore z segundo NCHS 2000 (50)]

Os escores z de todas estas medidas foram calculados utilizando o programa SISCREs (Morcillo AM, Lemos-Marini SHV. SISCREs – Sistema de análise do crescimento. Versão Windows, 2002.)

- Puberdade (classificados pré-púbere ou púbere)
- b) Pesquisa do histórico médico do paciente no arquivo do Departamento de Genética da FCM – UNICAMP e avaliação do prontuário médico do paciente no HC - UNICAMP, tendo sido incluído:
- Idade ao diagnóstico (em meses)
 - Peso de nascimento (em gramas)
 - Comprimento ao nascimento (em centímetros)
 - Idade gestacional (em semanas e dias)
 - História familiar de ambiguidade genital (sim ou não)
 - Consanguinidade entre os pais (sim ou não)
 - Localização da abertura uretral ao diagnóstico (normal, distal, medial ou proximal)
 - Grau de fusão das saliências labioescrotais ao diagnóstico (sim ou não)
 - Localização das gônadas ao diagnóstico (escrotal ou inguinal)

- Presença ou não de micropênis ao diagnóstico de acordo com Gabrich e cols (51)
- Classificação da genitália externa de acordo com o EMS (30)

4.4. AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA

Os cariótipos foram realizados no Laboratório de Citogenética da FCM da UNICAMP com contagem mínima de 32 metáfases. Somente foram incluídos nesse estudo pacientes com cariótipo homogêneo 46,XY.

4.5. AVALIAÇÃO HORMONAL

Todos os pacientes pré-puberes foram submetidos a uma nova avaliação com teste de estímulo com β hCG (1.500 UI/dia por 3 dias consecutivos, IM) e dosagens basais de LH, FSH, testosterona, DHT, HAM, Inibina B e INSL3 e dosagem 24 horas após a última aplicação do β hCG de testosterona e DHT. A coleta das amostras de sangue foi feita por punção em veia periférica no período da manhã. Uma vez coletado o sangue, a amostra de soro foi extraída através da centrifugação a 2000 x g por 10 minutos, sendo o soro estocado a -20°C até a análise. Todas as dosagens hormonais de gonadotrofinas e de andrógenos foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do HC - UNICAMP. Foram considerados pacientes com produção normal de testosterona, aqueles que apresentaram um aumento da testosterona total após o estímulo de 1,5 ng/mL em relação ao valor basal. As dosagens de DHT, HAM e Inibina B foram realizadas no Laboratório de Investigação em Metabolismo e Diabetes (LIMED) - UNICAMP. Nos pacientes púberes e adultos, foram realizadas apenas dosagens basais. Todos os ensaios foram realizados conforme as instruções dos fabricantes.

LH: Eletroquimioluminescência (Roche Elecsys 2010), limite de detecção de 0,1 a 200 UI/L. Os valores normais basais para o sexo masculino no Laboratório de Fisiologia do HC – UNICAMP são pré-púberes de menor que 0,2 UI/L e púberes de 0,3 a 8,6 UI/L.

FSH: Eletroquimioluminescência (Roche Elecsys 2010), limite de detecção de 0,1 a 200 UI/L. Os valores normais basais para o sexo masculino no Laboratório de Fisiologia do HC - UNICAMP são pré-púberes de 0,2 a 3,8 UI/L e púberes de 1,5 a 12,4 UI/L.

Testosterona: Eletroquimioluminescência (Roche Elecsys 2010), limite de detecção de 0,02 a 15 ng/mL. Os valores normais basais para o sexo masculino no Laboratório de Fisiologia do HC - UNICAMP são pré-púberes de 0,02 a 0,7 ng/mL e púberes de 2,2 a 15 ng/mL, e pós-estímulo maior que 1,5 ng/mL.

DHT: enzimaímunoenensaio (ELISA DIAsource). O limite de detecção de 6,0 pg/mL. Os valores normais basais para o sexo masculino são de 250 a 990 pg/mL segundo o fabricante.

HAM: enzimaímunoenensaio (AMH Gen II ELISA da Beckman-Coulter). O limite de sensibilidade deste ensaio não é especificado na bula do kit (7,14 pMol/L = 1 ng/mL). Valores de normalidade não são fornecidos pelo fabricante.

Inibina B: enzimaímunoenensaio (Inhibin B ELISA RUO da AnshLabs). O limite de sensibilidade deste ensaio é de 1,6 pg/ml. Valores de normalidade não são fornecidos pelo fabricante.

INSL3: enzimaímunoenensaio (ELISA Insulin Like Protein 3 da Cloud-Clone Corp). O limite de sensibilidade deste ensaio é de 0,058 ng/ml. Valores de normalidade não são fornecidos pelo fabricante.

4.6. AVALIAÇÃO MOLECULAR

Todos os casos foram submetidos à análise dos genes *SRD5A2* e *AR*. Aqueles indivíduos nos quais não foram identificadas mutações em nenhum desses dois genes foram então submetidos à análise do gene *NR5A1*. Os pacientes que apresentaram mutação nesse gene não foram incluídos nesse estudo.

As avaliações moleculares dos genes *SRD5A2*, *AR* e *NR5A1* seguiram o seguinte método de estudo:

Extração do DNA genômico de leucócitos provenientes de 10 a 15 mL de sangue periférico coletado com EDTA 10%, seguiu o método descrito por De Araújo e cols. (52)

- Avaliação molecular do gene *SRD5A2*: o gene *SRD5A2* é composto por 5 éxons que são amplificados pela PCR e sequenciados pelo método de terminação de síntese de cadeia usando didesoxinucleotídeos, conhecido por método de Sanger. Os 5 éxons aqui denominados 1, 2, 3, 4 e 5 possuem, respectivamente, 369, 243, 203, 238 e 171 pares de base (pb). Para cada éxon foi utilizado um par de “*primers*” (sense e anti-sense), desenhados para incluir cerca de 200 pb flanqueando cada éxon, tomando por base as seqüências descritas por Katz e cols. (53).

- Avaliação molecular do gene do receptor de andrógenos (*AR*): o método consistiu de amplificações dos 8 exons do gene do RA pela técnica de PCR utilizando-se os *primers* descritos em Lubahn e cols. (54), com algumas modificações.

- Avaliação molecular do gene *NR5A1*: a amplificação dos 7 éxons e das regiões não traduzidas 5' e 3' flanqueando o gene foi feita por PCR usando *primers* específicos projetados com base na seqüência normal do gene conforme descrito

por Fabbri e cols. (55), a partir de amostras de DNA genômico dos pacientes selecionados para estudo, seguida do seqüenciamento dos fragmentos.

- Os produtos de PCR contendo os éxons de cada gene foram purificados utilizando o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega)*. Após a purificação as amostras foram quantificadas no equipamento *Nanodrop 8000 - Multi-Sample Micro-Volume UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific, USA) para posterior seqüenciamento. Para as reações de seqüenciamento foi utilizado o kit *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1 Ready Reaction* (ABI PRISM/ Life Technologies, USA) e as leituras das seqüências foram feitas nos seqüenciadores ABI PRISM® 3100 ou 3500xL Genetic Analyzer (ABI PRISM/Life Technologies, USA).

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas análises estatísticas descritivas dos dados, com cálculo de freqüências (em número absoluto e percentagem), com apresentação de alguns resultados em forma de tabelas.

Para verificar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk, como grande parte dos dados não apresentaram distribuição normal foi optada pela análise por testes não paramétricos. Para a comparação das variáveis entre dois grupos (casos *versus* controles e pré-púbere *versus* púbere) foi utilizado o teste para amostras independentes de Mann-Whitney. Para as comparações entre grupos de acordo com os diagnósticos (IPA, D5AR2 e idiopático) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas com o ajuste de Bonferroni, para localizar as diferenças entres os grupos, quando necessário. O

coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para verificar a correlação entre as variáveis.

Os dados foram analisados utilizando o software SPSS, versão 16. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$)

5. RESULTADOS

Foram incluídos 35 pacientes, sendo 8 com IPA (5 pré-púberes e 3 púberes), 8 com D5AR2 (3 pré-púberes e 5 púberes) e 19 idiopáticos (13 pré-púberes e 6 púberes). Também foram incluídos 42 indivíduos controles com idade 123 ± 126 meses (média \pm desvio-padrão) (mediana = 138 meses, mínimo = 3 meses e máximo = 408 meses). A idade (meses) na avaliação atual não foi estatisticamente diferente entre o grupo casos e controles (teste de Mann-Whitney; $p = 0,595$).

Foi observada diferença estatisticamente significativa (teste de Kruskal-Wallis) apenas no peso atual (z score) ($p = 0,003$) e na estatura (z score) ($p = 0,024$), em ambos, sendo menor no grupo idiopático em relação ao grupo IPA, e no comprimento ao nascimento (g) ($p = 0,030$) sendo também menor no grupo idiopático mas em relação ao grupo com D5AR2. Não foi observada diferença estatística (teste de Kruskal-Wallis) entre os três subgrupos de diagnóstico etiológico em relação à idade (meses) na avaliação atual ($p = 0,509$), peso (kg) ($p = 0,260$), estatura (cm) ($p = 0,257$), IMC (Kg/m^2) ($p = 0,084$), IMC (z score) ($p = 0,375$), EMS inicial ($p = 0,057$), peso de nascimento (g) ($p = 0,142$), FSH (UI/L) ($p = 0,320$), LH (UI/L) ($p = 0,169$), testosterona (ng/mL) ($p = 0,122$), DHT (pg/mL) ($p = 0,485$), relação entre testosterona e DHT ($p = 0,989$). Os dados clínicos do grupo casos estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2: Dados gerais clínicos e laboratoriais dos 35 casos de DDS 46,XY com ambiguidade genital.

	IPA (n= 8)			D5AR2 (n= 8)			Idiopático (n = 19)		
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo
Idade (meses)	92	46	430	196	5	469	98	9	217
Peso (Kg)	29	16	91	54	9	90	27	7	65
Estatura (cm)	130	102	169	168	68	180	129	68	169
IMC (Kg/m²)	16,6	15,3	32,0	19,6	18,0	27,6	16,3	12,3	24,5
Peso (z escore)	1,5	-0,02	2,4	1,0	-1,5	1,5	-0,2	-3,1	1,4
Estatura (z escore)	0,4	-0,9	2,6	0,6	-1,3	1,0	-0,9	-3,1	0,9
IMC (z escore)	0,4	-1,2	3,0	1,0	-0,9	1,5	0,3	-3,6	1,3
EMS	6	5	9	4	2	9	6	5	9
Peso nascimento (g)	2910	1510	3950	2900	1500	3500	2290	700	3600
Comprimento nascimento (cm)	46	42	52	49	43	53	44	31	49
FSH (UI/L)	1,48	0,67	6,44	7,60	0,25	35,07	0,96	0,42	16,28
LH (UI/L)	0,15	0,10	14,71	6,22	0,10	16,93	0,14	0,10	6,17
Testosterona (ng/mL)	2,09	1,51	8,72	5,08	1,83	10,97	3,18	1,53	7,79
DHT (pg/mL)	103,10	52,70	674,40	362,65	37,60	1652,20	148,10	25,90	1454,80
T/DHT	21,0	7,5	30,0	14,7	6,6	54,0	19,8	2,5	59,1

IPA = Insensibilidade Parcial aos Andrógenos; D5AR2 = Deficiência de 5 α -redutase tipo 2; IMC = Índice de Massa Corporal;

EMS = *External Masculinisation Score*; T = testosterona; DHT = Dihidrotestosterona

O HAM foi avaliado em todos os indivíduos incluídos nesse estudo (casos e controles). As concentrações séricas de HAM foram significativamente menores no grupo total de casos quando comparado com o grupo controle ($p = 0,031$) (Tabela 3). No entanto, quando comparados os subgrupos de casos separadamente com o grupo controle e entre si, não foram encontradas diferenças significativas para as concentrações séricas do HAM. Esta mostrou-se inversamente proporcional à idade, com uma correlação moderada, tanto no grupo total de casos ($r = -0,68$; $p < 0,0001$) como no grupo controle ($r = -0,83$; $p < 0,0001$). Quando analisados os subgrupos de casos separadamente, essa correlação com a idade mostrou-se forte nos casos de D5AR2 ($r = -0,95$; $p < 0,0001$), moderada nos idiopáticos ($r = -0,71$; $p = 0,001$) e não apresentou correlação significativa nos casos de IPA ($r = -0,33$; $p = 0,420$). Além disso, HAM e Inibina B apresentaram correlação positiva entre si somente no subgrupo dos idiopáticos ($r = 0,56$; $p = 0,039$), o que refletiu conseqüentemente em uma correlação positiva entre esses dois hormônios no grupo de casos ($r = 0,55$; $p = 0,002$), porém os subgrupos D5AR2 ($r = 0,061$; $p = 0,148$) e IPA ($r = 0,19$; $p = 0,651$) não mostraram essa correlação.

Não foi possível avaliar a inibina B em um paciente com D5AR2 (idade de 27 anos e 10 meses) e em cinco pacientes do subgrupo idiopático (idades de 1 ano e 5 meses; 6 anos e 6 meses; 7 anos e 3 meses; 8 anos e 2 meses e 8 anos e 4 meses). Todos os pacientes com IPA e os indivíduos do grupo controle tiveram a inibina B avaliada. Quando realizada a comparação entre os grupos, a inibina B mostrou-se significativamente menor no grupo total de casos em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$) (Tabela 3). Além disso, quando os casos foram divididos conforme o diagnóstico e os subgrupos comparados entre si e com o grupo controle, foram encontrados valores significativamente menores no subgrupo com D5AR2

quando comparados com IPA e idiopáticos, e nos idiopáticos quando estes foram comparados, individualmente, com o grupo controle. Estes achados foram confirmados pelo teste de comparações múltiplas ajustado de Bonferroni (Tabela 4). Nas demais comparações não foram encontradas diferenças significativas. A inibina B não apresentou correlação com a idade, nem nos casos, nem nos controles. Conforme descrito acima, apresentou correlação positiva com o HAM apenas nos casos idiopáticos

Não foi possível avaliar o INSL3 em um paciente com D5AR2 (idade de 18 anos), em dois pacientes do subgrupo idiopático (idades de 8 anos e 4 meses e 18 anos e 1 mês) e 11 controles (idades de 10 meses; 11 meses; 1 ano e 7 meses; 2 anos e 1 mês; 2 anos e 10 meses; 8 anos e 3 meses e 14 anos e 1 mês, 14 anos e 10 meses; 28 anos, 29 anos e 34 anos). Todos os pacientes com IPA tiveram o INSL3 avaliado. Quando foram feitos os cruzamentos entre os subgrupos entre si e com o grupo controle, foram encontrados valores maiores no subgrupo D5AR2 e também no subgrupo IPA quando estes foram comparados, cada um, com os controles. No entanto, essas diferenças não se confirmaram quando foi realizado o teste de Bonferroni (Tabela 4). Assim como a Inibina B, o INSL3 não apresentou correlação significativa com a idade em nenhum dos grupos analisados. Este hormônio também não apresentou correlação nem com a Inibina B, nem com o HAM. Na comparação entre os grupos, os valores de INSL3 foram significativamente maiores no grupo total de casos quando comparado com os controles ($p = 0,003$) (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação das concentrações séricas de hormônio anti-mülleriano, inibina B e INSL3 entre os casos e os controles, entre os três hormônios e por idade.

Casos							
	N	Média	Desvio-Padrão	Mediana	Intervalo Interquartil	Mínimo	Máximo
Idade (meses)	35	143,60	116,89	100,00	135,00	9,00	469,00
HAM (pMol/L)	35	176,98	109,83	243,51*	228,52	8,96	295,85
Inibina B (pg/mL)	29	98,49	88,85	65,14**	106,86	14,18	381,37
INSL3 (ng/mL)	32	0,46	0,56	0,35 ***	0,03	0,33	3,51
Controles							
	N	Média	DP	Mediana	IIQ	Min	Max
Idade (meses)	42	137,67	125,86	123,00	162,25	3,00	408,00
HAM (pMol/L)	42	215,21	154,16	292,90*	314,07	20,06	420,55
Inibina B (pg/mL)	42	213,59	176,97	151,59**	149,86	57,11	926,84
INSL3 (ng/mL)	31	0,30	0,23	0,21***	0,26	0,10	1,04

HAM = Hormônio Anti-Mülleriano; INSL3 = *INSulin-Like 3*;

*Diferença significativa (valores menores) em relação ao grupo controle (Mann-Whitney; $p < 0,001$);

**Diferença significativa (valores menores) em relação ao grupo controle (Mann-Whitney; $p = 0,003$);

*** Diferença significativa (valores maiores) em relação ao grupo controle (Mann-Whitney; $p = 0,031$)

Tabela 4: Comparação de hormônio anti-mülleriano, inibina B e INSL3 entre os subgrupos de casos, com os controles, entre os três hormônios e por idade.

Insensibilidade Parcial aos Andrógenos							
	N	Média	Desvio-Padrão	Mediana	Intervalo Interquartil	Mínimo	Máximo
Idade (meses)	8	159,88	155,29	92,00	267,75	46,00	430,00
HAM (pMol/L)	8	225,76	76,08	261,50	112,37	84,93	295,85
Inibina B (pg/mL)	8	131,70	87,54	93,49	156,59	34,75	269,55
INSL3 (ng/mL)	8	0,37	0,02	0,36	0,04	0,34	0,41
Deficiência 5 α -redutase tipo 2							
	N	Média	Desvio-Padrão	Mediana	Intervalo Interquartil	Mínimo	Máximo
Idade (meses)	8	210,13	151,12	196,50	259,50	37,00	469,00
HAM (pMol/L)	8	126,87	127,42	42,05	243,15	26,60	293,20
Inibina B (pg/mL)	7	103,78	127,85	50,70*	101,41	19,70	381,37
INSL3 (ng/mL)	7	0,37	0,03	0,35	0,05	0,35	0,42
Idiopático							
	N	Média	Desvio-Padrão	Mediana	Intervalo Interquartil	Mínimo	Máximo
Idade (meses)	19	108,74	64,67	98,00	113,00	9,00	217,00
HAM (pMol/L)	19	177,55	109,75	247,04	210,84	8,96	284,64
Inibina B (pg/mL)	14	76,86	64,30	59,52**	81,89	14,18	237,53
INSL3 (ng/mL)	17	0,54	0,77	0,35	0,02	0,33	3,51
Grupo Controle							
	N	Média	Desvio-Padrão	Mediana	Intervalo Interquartil	Mínimo	Máximo
Idade (meses)	42	137,67	125,86	123,00	162,25	3,00	408,00
HAM (pMol/L)	42	215,21	154,16	292,90	314,04	20,06	420,55
Inibina B (pg/mL)	42	213,59	176,97	151,59	149,86	57,11	926,84
INSL3	31	0,30	0,23	0,21	0,26	0,10	1,04

HAM = Hormônio Anti-Mülleriano; INSL3 = *INSulin-Like 3*; *Diferente do grupo controle (Post hoc ajustado de Bonferroni; p=0,045);

**Diferente do grupo controle (Post hoc ajustado de Bonferroni; p=0,001)

A Tabela 5 apresenta as concentrações séricas hormonais separadas por subgrupo diagnóstico e pela presença ou não de puberdade. Nos pacientes sem puberdade, nenhum hormônio apresentou diferença estatística (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) na comparação entre os três subgrupos de diagnóstico etiológico. No entanto, nos pacientes púberes, tanto a inibina B (teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,040$) como o HAM (teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,036$) apresentaram concentrações séricas significativamente maiores nos pacientes com IPA em relação aos D5AR52 e idiopáticos. Quando avaliada a influência da puberdade dentro do mesmo grupo etiológico, observou-se: nos pacientes com IPA valores significativamente maiores de LH e inibina B nos púberes; nos pacientes com D5AR2 valores significativamente maiores de LH, FSH e DHT nos púberes e menores da relação entre testosterona e DHT e HAM; o mesmo ocorrendo nos idiopáticos.

Tabela 5: Comparação dos dados laboratoriais entre os três subgrupos de casos de acordo com a presença ou não de puberdade.

	Insensibilidade Parcial aos Andrógenos			Deficiência de 5 α -redutase tipo 2			Idiopático		
	Puberdade								
	Sim (n=3)	Não (n=5)	p	Sim (n=5)	Não (n=3)	p	Sim (n=6)	Não (n=13)	p
LH (UI/L)	7,65 \pm 3,76	0,10 \pm 0,02	0,036*	11,03 \pm 2,07	0,10 \pm 0,30	0,036*	4,52 \pm 0,61	0,10 \pm 0,39	0,001*
FSH (UI/L)	1,91 \pm 1,57	1,16 \pm 0,22	0,143	14,05 \pm 5,18	0,91 \pm 0,39	0,036*	9,19 \pm 2,48	0,88 \pm 0,60	0,001*
Testosterona (ng/mL)	7,95 \pm 2,10	1,82 \pm 0,26	0,143	5,32 \pm 1,20	2,03 \pm 2,71	0,393	3,57 \pm 0,80	2,06 \pm 0,47	0,127
DHT (pg/mL)	571,90 \pm 185,36	86,80 \pm 33,89	0,393	496,60 \pm 246,36	60,30 \pm 65,68	0,036*	566,75 \pm 167,49	113,80 \pm 18,81	0,001*
T/DHT	15,25 \pm 4,89	24,71 \pm 4,14	0,571	8,78 \pm 2,06	41,02 \pm 6,83	0,036*	6,95 \pm 1,96	23,45 \pm 4,40	0,001*
HAM (pMol/L)	169,65 \pm 61,28	279,49 \pm 21,68	0,786	31,92 \pm 3,40	274,82 \pm 6,41	0,036*	42,30 \pm 10,83	253,43 \pm 18,86	0,001*
Inibina B (pg/mL)	219,51 \pm 18,80	81,30 \pm 11,73	0,036*	42,32 \pm 25,93	57,11 \pm 109,58	0,400	50,34 \pm 25,87	61,53 \pm 24,45	0,662
INSL3 (ng/mL)	0,36 \pm 0,02	0,35 \pm 0,01	1,000	0,36 \pm 0,01	0,35 \pm 0,02	1,000	0,34 \pm 0,01	0,35 \pm 0,26	0,234

T = Testosterona; DHT = Dihidrotestosterona; HAM = Hormônio Anti-Mülleriano; INSL3 = *INSulin-Like 3*;

* = Diferença estatística entre puberdade ou não no mesmo diagnóstico pelo Teste de Mann-Whitney (Mediana \pm Erro Padrão da média)

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico etiológico das ambiguidades genitais continua sendo um desafio, apesar da evolução no conhecimento dos processos da diferenciação sexual e nos métodos de avaliação molecular das últimas décadas. Isso fica mais evidente principalmente nos DDS 46,XY, dos quais vários casos ainda não têm etiologia definida (56). Outra dificuldade reside na necessidade de recursos para realização de biologia molecular dos genes envolvidos na diferenciação sexual, o que restringe seu acesso a poucos centros. Dessa forma, a busca por ferramentas diagnósticas que sejam de fácil e universal reprodutibilidade, acrescida à capacidade de trazer maior informação, se torna uma necessidade.

O presente estudo confirmou esta dificuldade, pois do ponto de vista clínico, a gravidade da ambiguidade genital externa, aqui avaliada pelo EMS, não foi diferente nos três subgrupos de DDS 46,XY com produção normal de testosterona. A única diferença observada no presente estudo do ponto de vista clínico foi o menor comprimento ao nascimento e o menor z score de estatura nos idiopáticos. Estes achados em parte já estão descritos na literatura, pois cerca de 10 a 25% dos casos de DDS 46,XY sem etiologia definida estão relacionados a retardo de crescimento intrauterino (40–43). O presente estudo também confirmou que as avaliações tradicionais gonadotrofinas (LH e FSH) e andrógenos (testosterona, dihidrotestosterona e a relação testosterona e dihidrotestosterona) não são suficientes para diferenciar os três subgrupos de DDS 46,XY com produção normal de testosterona, confirmando a necessidade da procura de metodologias mais sensíveis para estas dosagens como por espectrometria de massa (57,58) ou de outros marcadores hormonais. Chan e cols (21) mostraram que nem sempre, mesmo com

métodos mais sensíveis, a avaliação dos andrógenos pode ser eficaz para diferenciar este grupo de DDS 46,XY (21).

Portanto, a justificativa para o presente estudo foi avaliar se outros marcadores hormonais, tanto de células de Leydig (INSL3) como de Sertoli (HAM e inibina B) poderiam ser úteis na diferenciação e orientação da pesquisa molecular destes três subgrupos de DDS 46,XY com produção normal de testosterona.

No presente estudo, as concentrações séricas de HAM foram menores no grupo total de DDS 46,XY em comparação aos controles. Este dado é semelhante aos de Hafez e cols, que em 2014, avaliaram HAM e inibina B em pacientes com DDS 46,XY em relação a um grupo saudável de mesma idade e observaram valores menores de HAM e inibina B no grupo com DDS 46,XY, porém, este grupo incluía também pacientes com disgenesia gonadal parcial XY e DDS ovotesticular XY que sabidamente apresentam alteração na função das células de Sertoli (59). O presente estudo também confirmou que as concentrações séricas do HAM diminuem com a idade, principalmente na puberdade e no adulto, como já mostrado em outros estudos (17,18). Isso se deve possivelmente à redução fisiológica das concentrações de HAM ocorrerem a partir da puberdade devido ao incremento na sensibilidade das células de Sertoli pela ação do RA, que acaba por regular negativamente a produção desse hormônio (17,18). Por outro lado, as concentrações séricas de HAM não foram úteis para diferenciar os três subgrupos de DDS 46,XY como sugerido por outros autores (44,45,47) e pela revisão atual do Consenso de DDS (26), exceto na puberdade, onde os pacientes com IPA apresentaram concentrações séricas de HAM significativamente maiores que os com D5AR2 e idiopáticos. Sendo assim, esses resultados levantam a discussão sobre a real necessidade da dosagem do HAM nos DDS 46 XY com produção normal de

testosterona no que se concerne a relevância de informação que este hormônio pode trazer ao diagnóstico, indicando a necessidade de mais estudos nesta área.

A inibina B, que não é mencionada como uma das ferramentas diagnósticas na investigação dos DDS na revisão do Consenso de 2016 (26), também foi avaliada no presente estudo, pois é citada como útil na investigação de DDS, em especial, aqueles com cariótipo 46,XY (13–16,56). Isso está especialmente evidente nos casos de criptorquidismo, manifestação clínica frequente em pacientes com DDS 46,XY com produção normal de testosterona, assim como na avaliação de fertilidade, que é um dos pilares do manejo dos DDS (60–70). Nos estudos relacionados com criptorquidia, foi demonstrado uma relação da inibina B com o volume testicular (61,62,66) e estudos dinamarqueses sugerem que este hormônio é um marcador de recuperação testicular após o tratamento da criptorquidia (60,63,64). No que se refere à avaliação da inibina B em pacientes com fertilidade, esses estudos mostram uma boa e direta relação desse hormônio com parâmetros espermáticos, sugerindo ser um bom marcador da espermatogênese (67–70). Também, já foi demonstrado que suas concentrações séricas são muito baixas em pacientes com Disgenesia Gonadal XY (71), sendo que em alguns casos esta desordem pode apresentar-se com concentrações séricas normais de testosterona, como descrito por Fabbri e cols (55), o que seria um fator confundidor na abordagem inicial frente a uma ambiguidade genital em paciente com cariótipo 46,XY. Nestes casos, a inibina B não só estaria ajudando no diagnóstico diferencial, como também no prognóstico de viabilidade gonadal. Do ponto de vista fisiológico, a Inibina B torna-se muito interessante para a investigação dos DDS 46,XY por apresentar-se em concentrações mensuráveis durante boa parte da vida (15,16,72). Mais ainda, estudos mostraram que a inibina B já é dosável ao nascimento, inclusive em

amostras de sangue de cordão e que seu aumento mais rápido ocorre na primeira semana de vida ao contrário dos hormônios classicamente usados na investigação das ambiguidades genitais (testosterona e HAM) (72–75).

Tendo em vista todos estes dados, o presente estudo também teve por objetivo avaliar a inibina B neste grupo de pacientes com DDS 46,XY e produção normal de testosterona e no grupo controle. O presente estudo, também mostrou (assim como com o HAM) que a inibina B foi menor no grupo casos que nos controles, porém não houve alteração com a idade e também (assim como o HAM) foi maior nos pacientes púberes com IPA que nos com D5AR2 e nos idiopáticos, dados semelhantes aos de Bouvattier e cols (46). De uma forma geral, os pacientes com D5AR2 e os idiopáticos apresentaram concentrações mais baixas de inibina B que os controles. Os pacientes com D5AR2 parecem apresentar uma falha no amadurecimento das células de Sertoli (76,77) e a DHT parecer ter alguma influência no crescimento e diferenciação dos espermatócitos (76), o que poderia justificar os valores mais baixos de inibina B nesse grupo. No que se refere a esse mesmo achado nos idiopáticos, fica difícil estabelecer uma relação causal, já que nem a etiologia desses casos está estabelecida, embora as diferenças encontradas no z score da estatura e no comprimento ao nascer sugiram uma relação com retardo do crescimento intrauterino. Por outro lado, essas concentrações de inibina B estão em acordo com o que foi mostrado por Blanc e cols (56).

Em relação às concentrações séricas de INSL3, o presente estudo observou valores maiores no grupo casos que nos controles, sugerindo que essas etiologias de DDS 46,XY não só tem a produção normal de testosterona, mas sim a função das células de Leydig totalmente preservada. Além disso, como alguns pacientes apresentam certo grau de criptorquidia ao nascimento, não seria a produção de

INSL3 que justificaria essa apresentação clínica nesses casos. Quando analisados os grupos separadamente, tanto os pacientes com D5AR2 quanto os com IPA apresentaram valores maiores quando comparados individualmente com os controles. Talvez essa diferença não tenha se confirmado, como ocorreu quando os casos foram analisados conjuntamente, devido ao número pequeno de indivíduos em ambos os subgrupos de DDS. No entanto, essa tendência pode estar relacionada com dois aspectos funcionais do INSL3: primeiro, este hormônio pode apresentar concentrações elevadas como um efeito protetor contra a apoptose de células germinativas (11,22), mecanismo que pode estar exacerbado principalmente em pacientes com D5AR2 e IPA que têm a fertilidade sabidamente alterada (11); em segundo lugar, esse suposto aumento das concentrações de INSL3 também pode estar relacionado com sua função de induzir a esteroidogênese em um contexto tanto de insuficiência androgênica relativa (IPA) quanto de parcial (D5AR2) (76,78–80). Além desses, outro componente que pode explicar essa tendência do INSL3 é a hiperplasia de células de Leydig já descrita em pacientes com D5AR2 e IPA na puberdade secundária ao hiperestímulo de LH por *feedback* negativo diminuído na D5AR2 pela diminuição da DHT e na IPA pela falta de ação da testosterona (77).

Por fim, nosso estudo foi o primeiro a avaliar os demais principais hormônios testiculares apenas em indivíduos com DDS 46,XY com produção normal de testosterona e com estudo molecular dos genes *AR* e *SRD5A2*. Também foi o primeiro a mostrar que pacientes com D5AR2 apresentam concentrações séricas de inibina B mais baixas. Em relação a este achado, a criptorquidia poderia justificar o HAM menor no grupo total de casos em comparação aos controles, no entanto isso não parece se aplicar às concentrações baixas de Inibina B nos pacientes com

D5AR2 e nos idiopáticos, já que essa apresentação clínica também esteve presente em pacientes com IPA. Dentre as limitações do estudo, o número de casos pode ter afetado a significância estatística de alguns achados. Além disso, a falta de informação quanto o estado histológico testicular dos pacientes analisados limita as conclusões mais apuradas principalmente no que se refere às diferenças nas concentrações dos hormônios produzidos pelas células de Sertoli (Inibina B e HAM).

7. CONCLUSÃO

As concentrações séricas de HAM e inibina B foram menores nos casos que nos controles e de INSL3 foram maiores nos casos que nos controles. As concentrações séricas de HAM, inibina B e INSL3 de uma forma geral não foram diferentes entre os três subgrupos de DDS 46,XY com produção normal de testosterona, no entanto as de inibina B foram menores nos pacientes com D5AR2 e idiopáticos em relação ao grupo controle.

Os pacientes com DDS 46,XY idiopáticos apresentaram escore z de estatura e comprimento ao nascer menores em relação aos pacientes com IPA e D5AR2. As concentrações séricas de LH, FSH, testosterona, DHT, relação entre testosterona e DHT, HAM, inibina B e INSL3 não foram diferentes entre os três subgrupos de DDS 46,XY avaliados.

As concentrações séricas de HAM foram inversamente proporcionais à idade, sendo este achado não observado para inibina B e INSL3. Os pacientes com IPA apresentaram concentrações séricas de HAM e inibina B mais elevadas na puberdade que os pacientes com D5AR2 e idiopáticos.

Por fim, a dosagem de inibina B apresenta um potencial considerável para trazer informações relevantes na investigação dos DDS 46,XY com produção normal de testosterona. Para isso, mais estudos nesse sentido se fazem necessários.

8. REFERÊNCIAS

1. Biason-Lauber A. Control of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010;24(2):163–86.
2. Ahmed SF, Bashamboo A, Lucas-Herald A, McElreavey K. Understanding the genetic aetiology in patients with XY DSD. *Br Med Bull.* 106:67–89.
3. Grinspon RP, Rey RA. When Hormone Defects Cannot Explain It: Malformative Disorders of Sex Development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2014;102(4):359–73.
4. Hannema SA, Hughes IA. Regulation of Wolffian Duct Development. *Horm Res.* 2007;67:142–51.
5. Mullen RD, Behringer RR. Molecular genetics of Müllerian duct formation, regression and differentiation. *Sex Dev.* 2014;8(5):281–96.
6. Grinspon RP, Rey RA. Disorders of Sex Development with Testicular Differentiation in SRY-Negative 46,XX Individuals: Clinical and Genetic Aspects. *Sex Dev.* 2016;10(1):1–11.
7. Rey RA, Grinspon RP. Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(2):221–38.
8. Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev.* 1995;16(3):271–321.
9. Guerra-Junior G, Maciel-Guerra A. Menino ou Menina? Distúrbios da Diferenciação do Sexo. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Rubio; 2010.
10. Ferlin A, Arredi B, Zuccarello D, Garolla A, Selice R, Foresta C. Paracrine and endocrine roles of insulin-like factor 3. *J Endocrinol Invest.* 2006;29(7):657–64.
11. Ivell R, Wade JD, Anand-Ivell R. INSL3 as a biomarker of Leydig cell functionality. *Biol Reprod.* 2013;88(6):147.
12. Molina PE. Fisiologia Endócrina. 2ª Edição. São Paulo: McGraw-Hill; 2007.
13. Suresh P, Rajan T, Tsutsumi R. New targets for old hormones: inhibins clinical role revisited. *Endocr J.* 2011;58(4):223–35.
14. Iliadou P, Tsametis C, Kaprara A, Papadimas I, Goulis D. The Sertoli cell: Novel clinical potentiality. *Hormones (Athens).* 2015;14(4):504–14.
15. Andersson A, Toppari J, Haavisto A, Petersen J, Simell O, Skakkebaek N. Longitudinal Reproductive Hormone Profiles in Infants: Peak of Inhibin B Levels in Infant Boys Exceeds Levels in Adult Men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(2):675–81.

16. Crofton P, Evans A, Groome NP, Taylor M, Holland C, Kelnar C. Inhibin B in boys from birth to adulthood: relationship with age, pubertal stage, FSH and testosterone. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;56(2):215–21.
17. Johansen ML, Hagen CP, Johansen TH, Main KM, Picard J-Y, Jørgensen A, et al. Anti-müllerian hormone and its clinical use in pediatrics with special emphasis on disorders of sex development. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:198698.
18. Matuszczak E, Hermanowicz A, Komarowska M, Wojciech D. Serum AMH in Physiology and Pathology of Male Gonads. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:128907.
19. Rey RA. Anti-Müllerian hormone in disorders of sex determination and differentiation. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005;49(1):26–36.
20. Cheon C. Practical approach to steroid 5 α -reductase type 2 deficiency. *Eur J Pediatr*. 2011;170(1):1–8.
21. Chan A, But B, Lee C, Lam Y, Ng K, Tung J, et al. Diagnosis of 5 α -reductase 2 deficiency: is measurement of dihydrotestosterone essential? *Clin Chem*. 2013;59(5):798–806.
22. Ivell R, Anand-Ivell R. Biology of insulin-like factor 3 in human reproduction. *Hum Reprod Update*. 2009;15(4):463–76.
23. Wilkins L, Grumbach MM, Van Wyk JJ, Shepard TH, Papadatos C. Hermaphroditism: classification, diagnosis, selection of sex and treatment. *Pediatrics*. 1955;16(3):287–302.
24. Wilkins L. Abnormalities of sex differentiation. Classification, diagnosis, selection of gender of rearing and treatment. *Pediatrics*. 1960;26:846–57.
25. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA, in collaboration with the participants in the International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. Consensus Statement on Management of Intersex Disorders. *Pediatrics*. 2006;118(2):e488–500.
26. Lee PA, Nordenström A, Houk CP, Ahmed SF, Auchus R, Baratz A, et al. Global Disorders of Sex Development Update since 2006: Perceptions, Approach and Care. *Horm Res Paediatr*. 2016;85(3):158–80.
27. 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.
28. Danish RK. Intersex problems in the neonate. *Indian J Pediatr*. 1982;49(399):555–75.
29. White P, Speiser P. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev*. 21(3):245–91.

30. Ahmed SF, Khwaja O, Hughes IA. The role of a clinical score in the assessment of ambiguous genitalia. *BJU Int*. 2000;85(1):120–4.
31. Ahmed SF, Achermann JC, Arlt W, Balen AH, Conway G, Edwards ZL, et al. Society for Endocrinology UK guidance on the initial evaluation of an infant or an adolescent with a suspected disorder of sex development (Revised 2015). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016;84(5):771–88.
32. Ahmed SF, Achermann JC, Arlt W, Balen AH, Conway G, Edwards ZL, et al. UK guidance on the initial evaluation of an infant or an adolescent with a suspected disorder of sex development. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;75(1):12–26.
33. Rey RA. Mini-puberty and true puberty: differences in testicular function. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2014;75(2):58–63.
34. Josso N, Rey RA, Picard J-Y. Anti-Müllerian Hormone: A Valuable Addition to the Toolbox of the Pediatric Endocrinologist. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:674105.
35. Mongan NP, Tadokoro-Cuccaro R, Bunch T, Hughes IA. Androgen insensitivity syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29(4):569–80.
36. Jääskeläinen J. Molecular biology of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;352(1-2):4–12.
37. Maimoun L, Philibert P, Cammas B, Audran F, Bouchard P, Fenichel P, et al. Phenotypical, biological, and molecular heterogeneity of 5 α -reductase deficiency: an extensive international experience of 55 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(2):296–307.
38. Costa EM, Domenice S, Sircili MH, Inacio M, Mendonça BB. DSD due to 5 α -reductase 2 deficiency - from diagnosis to long term outcome. *Semin Reprod Med*. 2012;30(5):427–31.
39. Shabir I, Khurana M, Joseph A, Eunice M, Mehta M, Ammini A. Phenotype, genotype and gender identity in a large cohort of patients from India with 5 α -reductase 2 deficiency. *Andrology*. 2015;3(6):1132–9.
40. Mendonça BB, Billerbeck A, de Zegher F. Nongenetic male pseudohermaphroditism and reduced prenatal growth. *N Engl J Med*. 2001;345(15):1135.
41. Morel Y, Rey RA, Teinturier C, Nicolino M, Michel-Calemard L, Mowszowicz I, et al. Aetiological diagnosis of male sex ambiguity: a collaborative study. *Eur J Pediatr*. 2002;161(1):49–59.
42. Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassalli J, Efstratiadis A, Accili D, et al. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature*. 2003;426(6964):291–5.

43. de Andrade Machado Neto F, Moreno Morcillo A, Trevas Maciel-Guerra A, Guerra-Junior G. Idiopathic male pseudohermaphroditism is associated with prenatal growth retardation. *Eur J Pediatr*. 2005;164(5):287–91.
44. Rey RA, Mebarki F, Forest MG, Mowszowicz I, Cate RL, Morel Y, et al. Anti-müllerian hormone in children with androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(4):960–4.
45. 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.
46. Bouvattier C, Mignot B, Lefèvre H, Morel Y, Bougnères P. Impaired Sexual Activity in Male Adults with Partial Androgen Insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(9):3310–5.
47. Stuchi-Perez EG, Lukas-Croisier C, De Castro M, Baptista MTM, Ribeiro Scolfaro M, Marques-de-Faria AP, et al. Evaluation of the tubular and interstitial functions of the testis in 46,XY patients with ambiguous genitalia. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2000;13(6):605–12.
48. Stuchi-Perez EG, Hackel C, Oliveira LEC, Ferraz LF, Oliveira LC, Nunes-Silva D, et al. Diagnosis of 5alpha-reductase type 2 deficiency: contribution of anti-Müllerian hormone evaluation. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2005;18(12):1383–9.
49. De Paula G, Barros B, Carpini S, Tincani B, Mazzola T, Sanches Guaragna M, et al. 408 Cases of Genital Ambiguity Followed by Single Multidisciplinary Team during 23 Years: Etiologic Diagnosis and Sex of Rearing. *Int J Endocrinol*. 2016;2016:4963574.
50. Kuczmarski R, Ogden C, Grummer-Strawn L, Flegal K, Guo S, Wei R, et al. CDC growth charts: United States. *Adv Data*. 2000;314:1–27.
51. Gabrich P, Vasconcelos J, Damião R, Silva E. Penile anthropometry in Brazilian children and adolescents. *J Pediatr (Rio J)*. 83(5):441–6.
52. de-Araujo M, Sanches M, Suzuki L, Guerra-Junior G, Farah S, de-Mello M. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(1):1–13.
53. Katz M, Cai L, Zhu Y-S, Herrera C, DeFillo-Ricart M, Shackleton C, et al. The biochemical and phenotypic characterization of females homozygous for 5 alpha-reductase-2 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(11):3160–7.
54. Lubahn D, Brown T, Simental J, Higgs H, Migeon C, Wilson E, et al. Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(23):9534–8.

55. Fabbri H, de Andrade J, Soardi F, de Calais F, Petroli R, Maciel-Guerra A, 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;15:7.
56. Blanc T, Avedi A, El-Ghoneimi A, Abdoul H, Aigrain Y, Paris F, et al. Testicular function and physical outcome in young adult males diagnosed with idiopathic 46 XY disorders of sex development during childhood. 2011;165(6):907–15.
57. Kulle A, Riepe F, Melchior D, Hiort O, Holterhus P. A novel ultrahigh pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of androstenedione, testosterone, and dihydrotestosterone in pediatric blood samples: age- and sex-specific reference data. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2399–409.
58. Krone N, Hughes B, Lavery G, Stewart P, Arlt W, Shackleton C. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121(3-5):496–504.
59. Hafez M, Dayem S El, Mougy F El, Atef A, Kandil M, Galal A, et al. The role of anti-Müllerian and inhibin B hormones in the evaluation of 46,XY disorders of sex development. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2014;27(9-10):891–9.
60. Christiansen P, Andersson A, Skakkebaek N, Juul A. Serum inhibin B, FSH, LH and testosterone levels before and after human chorionic gonadotropin stimulation in prepubertal boys with cryptorchidism. *Eur J Endocrinol.* 2002;147(1):95–101.
61. Gaudino R, Cavarzere P, Camilot M, Teofoli F, Zampieri N, Tatò L. Prepubertal serum inhibin B in cryptorchid infants and in monorchid boys with compensatory testicular hypertrophy. *Fertil Steril.* 2008;90(6):2217–21.
62. Kollin C, Stukenborg J, Nurmio M, Sundqvist E, Gustafsson T, Söder O, et al. Boys with undescended testes: endocrine, volumetric and morphometric studies on testicular function before and after orchidopexy at nine months or three years of age. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(12):4588–95.
63. Thorup J, Clasen-Linde E, Thorup SC, Cortes D. Pre- and postoperative status of gonadotropins (FSH and LH) and inhibin-B in relation to testicular histopathology at orchiopexy in infant boys with unilateral undescended testes. *J Pediatr Urol.* 2015;11(1):25.e1–5.
64. Thorup J, Kvist K, Clasen-Linde E, Hutson JM, Cortes D. Serum inhibin B values in boys with unilateral vanished testis or unilateral cryptorchidism. *J Urol.* 2015;193(5):1632–6.
65. Cortes D, Clasen-Linde E, Hutson JM, Li R, Thorup J. The Sertoli cell hormones inhibin-B and anti Müllerian hormone have different patterns of secretion in prepubertal cryptorchid boys. *J Pediatr Surg.* 2016;51(3):475–80.

66. von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer G, Gassner P, Schepers A, et al. Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(7):2496–501.
67. Brugo-Olmedo S, De Vincentiis S, Calamera J, Urrutia F, Nodar F, Acosta A. Serum inhibin B may be a reliable marker of the presence of testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 2001;76(6):1124–9.
68. Kumanov P, Nandipati K, Tomova A, Agarwal A. Inhibin B is a better marker of spermatogenesis than other hormones in the evaluation of male factor infertility. *Fertil Steril.* 2006;86(2):332–8.
69. Jørgensen N, Liu F, Andersson A, Vierula M, Irvine D, Auger J, et al. Serum inhibin-b in fertile men is strongly correlated with low but not high sperm counts: a coordinated study of 1,797 European and US men. *Fertil Steril.* 2010;94(6):2128–34.
70. Barbotin A, Ballot C, Sigala J, Ramdane N, Duhamel A, Marcelli F, et al. The serum inhibin B concentration and reference ranges in normozoospermia. *Eur J Endocrinol.* 2015;172(6):669–76.
71. Juniarto A, van der Zwan Y, Santosa A, Ariani M, Eggers S, Hersmus R, et al. Hormonal evaluation in relation to phenotype and genotype in 286 patients with a disorder of sex development from Indonesia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2016;85(2):247–57.
72. Byrd W, Bennett M, Carr B, Dong Y, Wians F, Rainey W. Regulation of biologically active dimeric inhibin A and B from infancy to adulthood in the male. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(8):2849–54.
73. Wallace E, Riley S, Crossley J, Ritoe S, Horne A, Shade M, et al. Dimeric inhibins in amniotic fluid, maternal serum, and fetal serum in human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(1):218–22.
74. De Schepper J. Serum inhibin B in normal term-born male and female neonates during the first week of life. *Eur J Pediatr.* 2000;159(6):465–9.
75. Bergadá I, Milani C, Bedecarrás P, Andreone L, Ropelato M, Gottlieb S, et al. Time course of the serum gonadotropin surge, inhibins, and anti-Müllerian hormone in normal newborn males during the first month of life. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(10):4092–8.
76. Kang H-J, Imperato-McGinley J, Zhu Y-S, Rosenwaks Z. The effect of 5 α -reductase-2 deficiency on human fertility. *Fertil Steril.* 2014;101(2):310–6.
77. Vija L, Ferlicot S, Paun D, Bry-Gaillard H, Berdan G, Abd-Alsamad I, et al. Testicular histological and immunohistochemical aspects in a post-pubertal patient with 5 alpha-reductase type 2 deficiency: case report and review of the

literature in a perspective of evaluation of potential fertility of these patients. *BMC Endocr Disord.* 2014;14:43.

78. Hiort O, Holterhus P. Androgen insensitivity and male infertility. *Int J Androl.* 2003;26(1):16–20.
79. Marumudi E, Ammini A. Fertility in patients with 5-alpha-reductase-2 deficiency. *Fertil Steril.* 2011;95(7):e45.
80. Wang R, Yeh S, Tzeng C, Chang C. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev.* 2009;30(2):119–32.

APÊNDICES

Apêndice 1: Dados clínicos e laboratoriais dos 35 casos.

Caso	Diagnóstico	Idade	Puberdade	EMS	FSH (UI/L)	LH (UI/L)	Testosterona (ng/mL)	DHT (pg/mL)	HAM (pMol/L)	Inibina B (pg/mL)	INSL3 (ng/mL)
1	IPA	5a9m	Não	5,0	1,99	,20	2,95	119,40	243,51	53,10	0,350
2	IPA	4a	Não	6,0	,94	,10	2,11	74,50	279,49	94,30	0,350
3	IPA	31a7m	Sim	6,0	1,91	7,65	7,95	674,40	84,93	219,51	0,395
4	IPA	4a9m	Não	9,0	1,16	,10	1,58	52,70	169,39	34,75	0,405
5	IPA	3a10m	Não	5,0	,67	,10	1,82	244,00	282,03	92,67	0,350
6	IPA	35a10m	Sim	6,0	6,44	14,71	8,72	571,90	169,64	208,42	0,335
7	IPA	10a3m	Não0	8,5	1,37	,10	1,51	86,80	281,24	81,30	0,375
8	IPA	11a3m	Sim	5,0	1,59	1,69	2,07	74,20	295,84	269,55	0,360
9	D5AR2	39a1m	Sim	5,0	14,61	7,88	4,84	432,50	26,59	19,700	0,370
10	D5AR2	25a2m	Sim	4,0	11,24	11,73	10,97	1652,20	31,05	50,70	0,350
11	D5AR2	27a10m	Sim	9,0	35,07	16,93	5,71	742,10	31,91	-	0,350
12	D5AR2	3a1m	Não	3,0	,91	,10	10,05	245,00	274,81	57,11	0,420
13	D5AR2	14a9m	Sim	2,0	14,05	11,03	5,32	292,80	46,30	33,95	0,400
14	D5AR2	7a2m	Não	6,0	,25	,10	2,03	37,60	273,24	48,30	0,350
15	D5AR2	5m	Não	5,5	1,60	1,01	1,83	60,30	293,20	381,37	0,350
16	D5AR2	18a	Sim	2,0	3,96	4,55	4,36	496,60	37,80	135,36	-
17	Idiopático	18a 1m	Sim	6,0	2,01	4,36	3,57	1454,80	73,79	153,64	-
18	Idiopático	2a8m	Não	6,0	,76	,10	1,54	55,50	226,83	28,40	0,340
19	Idiopático	4a11m	Não	5,0	,96	,10	1,53	25,90	260,89	69,17	0,340
20	Idiopático	16a3m	Sim	6,0	16,28	4,69	3,57	612,20	22,95	18,91	0,340
21	Idiopático	8a2m	Não	5,0	,76	,10	1,58	45,00	221,01	-	0,360
22	Idiopático	9m	Não	9,0	,88	,14	4,81	86,30	264,89	91,85	0,360

Caso	Diagnóstico	Idade	Puberdade	EMS	FSH (UI/L)	LH (UI/L)	Testosterona (ng/mL)	DHT (pg/mL)	HAM (pMol/L)	Inibina B (pg/mL)	INSL3 (ng/mL)
23	Idiopático	11a8m	Não	6,0	8,52	2,63	3,97	188,80	22,45	39,52	0,370
24	Idiopático	16a2m	Sim	5,0	5,58	4,18	4,91	521,30	54,05	65,14	0,345
25	Idiopático	2a1m	Não	6,0	,42	,10	4,54	129,10	279,67	53,90	0,340
26	Idiopático	14a4m	Sim	5,0	4,95	1,88	2,17	268,80	70,15	148,65	0,330
27	Idiopático	15a8m	Sim	9,0	12,81	6,17	7,79	476,40	30,55	35,54	0,380
28	Idiopático	11a11m	Não	8,5	1,96	1,18	4,20	179,10	268,10	237,53	0,345
29	Idiopático	6a10m	Não	6,0	,88	,10	1,64	82,80	249,43	23,65	0,350
30	Idiopático	6a6m	Não	6,0	,88	,10	1,66	76,50	252,57	-	0,360
31	Idiopático	8a4m	Não	6,0	1,02	,10	2,08	113,80	247,04	-	-
32	Idiopático	12a1m	Sim	7,0	15,44	5,62	3,18	619,50	8,96	14,18	0,340
33	Idiopático	7a9m	Não	5,5	,46	,10	6,68	148,10	284,63	95,92	0,345
34	Idiopático	1a5m	Não	9,0	,93	4,74	1,59	271,30	281,88	-	0,350
35	Idiopático	7a3m	Não	6,0	,63	,10	2,06	133,20	253,43	-	0,355

Apêndice 2: Dados clínicos e laboratoriais dos 42 controles.

Caso	Idade	HAM (pmol/L)	Inibina B (pg/mL)	INSL3 (ng/mL)
1	7a4m	346,36	73,21	0,420
2	16a	38,05	211,83	0,830
3	18a9m	27,56	57,11	0,130
4	15a3m	80,18	136,19	0,800
5	1a	371,24	109,00	0,130
6	1a6m	363,81	100,82	1,040
7	6a11m	311,76	61,93	0,420
8	14a1m	122,02	170,38	-
9	2a2m	363,06	369,64	0,250
10	2a10m	410,47	168,70	-
11	10m	420,54	132,88	-
12	3m	395,41	371,44	0,130
13	3a8m	332,47	129,57	0,190
14	2a	297,91	70,78	0,370
15	2a1m	358,00	926,84	-
16	10a8m	74,54	132,05	0,410
17	26a10m	45,44	205,02	0,560
18	2a3m	372,31	191,45	0,210
19	10a1m	347,46	57,11	0,390
20	1a7m	352,28	100,00	-
21	8a3m	287,88	71,59	-
22	13a	50,48	134,53	0,280
23	14a	80,57	163,67	0,170
24	6a	308,98	77,25	0,130
25	8m	355,53	352,57	0,100
26	1a8m	369,17	229,79	0,100
27	14a10m	66,93	170,38	-
28	13a11m	60,08	421,43	0,130

Caso	Idade	HAM (pmol/L)	Inibina B (pg/mL)	INSL3 (ng/mL)
29	10a5m	369,38	247,01	0,200
30	20a2m	98,28	122,97	0,305
31	28a	20,06	139,51	-
32	34a	41,87	94,30	0,190
33	14a6m	35,48	96,74	0,180
34	5m	394,23	706,41	0,130
35	31a	35,02	260,86	0,280
36	13a	24,70	190,60	0,160
37	1a6m	308,02	116,39	0,350
38	14a6m	32,91	117,21	0,230
39	32a	118,81	483,42	0,170
40	29a	90,60	383,18	-
41	11m	414,04	372,34	-
42	34a	44,91	242,69	-

ANEXOS

Anexo1: Parecer do CEP – FCM - UNICAMP

 <p>PRP pró-reitoria de pesquisa unicamp</p>	<p>Universidade Estadual de Campinas Pró-Reitoria de Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa</p>	 <p>UNICAMP</p>		
<p>CEP: 26/08/14 (PARECER CEP: N° 434/2006)</p>				
<h2>PARECER</h2>				
<p>I – IDENTIFICAÇÃO:</p>				
<p>PROJETO: “AVALIAÇÃO INTERDISCIPLINAR DOS DISTÚRBIOS DA DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO SEXO”.</p>				
<p>PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gil Guerra Junior</p>				
<p>II – PARECER DO CEP.</p>				
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) aprovou a inclusão do Grupo Controle e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no subprojeto “IMPORTÂNCIA DA DOSAGEM DO HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE PACIENTES COM AMBIGUIDADE GENITAL, CARIÓTIPO 46,XY E PRODUÇÃO NORMAL DE TESTOSTERONA”, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.</p>				
<p>III – DATA DA REUNIÃO.</p>				
<p>Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/UNICAMP, em 26 de agosto de 2014.</p>				
<p> Dra. Mônica Jacques de Moraes VICE-COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNICAMP</p>				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td data-bbox="403 1821 906 1883"> <p>RUA: 1688/15 Vinte de Camargo, 128 13083-887 Campinas – SP http://www.prp.unicamp.br/index.php/comite-de-etica-em-pesquisa</p> </td> <td data-bbox="1050 1821 1299 1883" style="text-align: right;"> <p>Fone/Fax (019) 3521-6936 Fone/Fax (019) 3521-7187 cep@fcm.unicamp.br</p> </td> </tr> </table>			<p>RUA: 1688/15 Vinte de Camargo, 128 13083-887 Campinas – SP http://www.prp.unicamp.br/index.php/comite-de-etica-em-pesquisa</p>	<p>Fone/Fax (019) 3521-6936 Fone/Fax (019) 3521-7187 cep@fcm.unicamp.br</p>
<p>RUA: 1688/15 Vinte de Camargo, 128 13083-887 Campinas – SP http://www.prp.unicamp.br/index.php/comite-de-etica-em-pesquisa</p>	<p>Fone/Fax (019) 3521-6936 Fone/Fax (019) 3521-7187 cep@fcm.unicamp.br</p>			

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes ou responsáveis

Projeto: Importância da dosagem do hormônio anti-mülleriano no diagnóstico diferencial de pacientes com ambiguidade genital, cariótipo 46,XY e produção normal de testosterona (Adendo ao projeto: Avaliação interdisciplinar dos distúrbios da determinação e diferenciação do sexo - CEP 434/2006).

Pesquisadores responsáveis: Prof. Dr. Gil Guerra-Júnior e Guilherme Guaragna-Filho

Endereço: Departamento de Pediatria – FCM – UNICAMP – Cidade Universitária

Campinas – SP – CEP 13081-970 Fone/Fax: (19)-3521-7322 *e-mail*:

gilguer@fcm.unicamp.br

Paciente ou Responsável:

Nome (paciente):

Registro do Hospital:

Nome (responsável):

Endereço:

Bairro:

Cidade:

UF:

CEP:

Fone:

1. Desenho do estudo e objetivo: essas informações serão fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa ao estudo hormonal para melhor esclarecimento da doença deficiência de 5 α redutase 2 ou insensibilidade parcial aos andrógenos de seu filho(a).
2. Para a realização do trabalho será aplicada 1 injeção de gonadotrofina coriônica (sem qualquer risco ou efeito colateral, exceto pouca ou ausente dor no local de aplicação) no músculo por 3 dias seguidos e colhidos cerca de 5 ml de sangue do antebraço no dia anterior à 1ª injeção e 24 h após a 3ª injeção (total de 10 ml de sangue).
3. O risco da coleta se resume à possibilidade de hematoma (“roxo”) ou dor no local da coleta, como em qualquer outra coleta de sangue já realizada por seu filho (a). Estas serão as únicas coletas extras de material, as demais coletas serão para o acompanhamento rotineiro da doença, que continuará independente de sua decisão de participar ou não deste trabalho.
4. Só poderemos concluir o resultado da pesquisa quando o estudo estiver terminado e pudermos comparar os resultados de todos os pacientes que se submeteram ao exame; antes disso não teremos como esclarecer qualquer resultado.
5. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

O principal investigador da pesquisa é o Dr. Gil Guerra-Júnior que pode ser encontrado no Ambulatório de pediatria do HC-UNICAMP, Telefone (19)3521-7353. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone (19)3521-8936.

6. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

7. Ao voluntário é concedido o direito de confidencialidade; as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos mesmos.

8. Ao voluntário é concedido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

9. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

10. O pesquisador e o executante assumem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o projeto em questão.

Eu conversei com o Dr. Gil Guerra-Júnior sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o estudo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do participante: _____

Data: _____

Eu, Gil Guerra-Júnior, expliquei

à _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo.

Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante.

Assinatura do pesquisador: _____

Data: _____

Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Grupo Controle

Projeto: Importância da dosagem do hormônio anti-mülleriano no diagnóstico diferencial de pacientes com ambiguidade genital, cariótipo 46,XY e produção normal de testosterona (Adendo ao projeto: Avaliação interdisciplinar dos distúrbios da determinação e diferenciação do sexo - CEP 434/2006).

Pesquisadores responsáveis: Prof. Dr. Gil Guerra-Júnior e Guilherme Guaragna-Filho

Endereço: Departamento de Pediatria – FCM – UNICAMP – Cidade Universitária

Campinas – SP – CEP 13081-970 Fone/Fax: (19)-3521-7322

e-mail: gilguer@fcm.unicamp.br

Paciente:

Nome (paciente):

Registro do Hospital:

Endereço:

Bairro:

Cidade:

UF:

CEP:

Fone:

1. Viemos através deste termo convidá-lo a participar deste estudo sobre o hormônio anti-mülleriano na condição de pessoa saudável que nos fornecerá um referencial de normalidade para analisarmos os resultados dos exames dos pacientes inclusos nesse estudo.
2. Desenho do estudo e objetivo: essas informações serão fornecidas para sua participação como membro do grupo controle (ou seja, pessoa que NÃO apresenta alterações relacionadas com o estudo) nesta pesquisa, que visa ao estudo dos hormônios para melhor esclarecimento de doenças que se apresentam clinicamente com ambiguidade genital (quando não se pode identificar o sexo ao nascimento). O objetivo do grupo controle é ser uma referência de normalidade quando compararmos os resultados das dosagens dos hormônios no sangue com aquelas dos pacientes com as doenças que causam ambiguidade genital.
3. Para a realização do trabalho apenas serão colhidos cerca de 4 ml de sangue do seu antebraço, que serão usados para dosagens hormonais.
4. O risco da coleta se resume à possibilidade de hematoma (“roxo”) ou dor no local da coleta, como em qualquer outra coleta de sangue já realizada por você. Esta será a única coleta de material.
5. Só poderemos concluir o resultado da pesquisa quando o estudo estiver terminado e pudermos comparar os resultados de todos os pacientes que se submeteram ao exame; antes disso não teremos como esclarecer qualquer resultado.
6. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

O principal investigador da pesquisa é o Dr. Gil Guerra-Júnior que pode ser encontrado no Ambulatório de Pediatria do HC-UNICAMP, telefone (19)3521-7353. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone (19)3521-8936.

7. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

8. Ao voluntário é concedido o direito de confidencialidade; as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos mesmos.

9. Ao voluntário é concedido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

10. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

11. O pesquisador e o executante assumem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o projeto em questão.

Eu conversei com o Dr. Gil Guerra-Júnior/Guilherme Guaragna Filho sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o estudo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do participante: _____

Data: _____

Eu, Gil Guerra-Junior/Guilherme Guaragna Filho, expliquei

à _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo.

Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante.

Assinatura do pesquisador: _____

Data: _____

Anexo 4: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Grupo Controle (menores de idade)

Projeto: Importância da dosagem do hormônio anti-mülleriano no diagnóstico diferencial de pacientes com ambiguidade genital, cariótipo 46,XY e produção normal de testosterona (Adendo ao projeto: Avaliação interdisciplinar dos distúrbios da determinação e diferenciação do sexo - CEP 434/2006).

Pesquisadores responsáveis: Prof. Dr. Gil Guerra-Júnior e Guilherme Guaragna-Filho

Endereço: Departamento de Pediatria – FCM – UNICAMP – Cidade Universitária

Campinas – SP – CEP 13081-970 Fone/Fax: (19)3521-7322 e-mail: gilguer@fcm.unicamp.br

Paciente ou Responsável:

Nome (paciente):

Registro do Hospital:

Nome (responsável):

Endereço:

Bairro:

Cidade:

UF:

CEP:

Fone:

1. Viemos através deste termo convidar seu filho(a) a participar deste estudo sobre o hormônio anti-mulleriano na condição de pessoa saudável que nos fornecerá um referencial de normalidade para analisarmos os resultados dos exames dos pacientes inclusos nesse estudo.

2. Desenho do estudo e objetivo: essas informações serão fornecidas para a participação voluntária do menor _____ como membro do grupo controle (ou seja, pessoa que NÃO apresenta alterações relacionadas com o estudo) nesta pesquisa, que visa ao estudo dos hormônios para melhor esclarecimento de doenças que se apresentam clinicamente com ambiguidade genital (quando não se pode identificar o sexo ao nascimento). O objetivo do grupo controle é ser uma referência de normalidade quando compararmos os resultados das dosagens dos hormônios no sangue com aquelas dos pacientes com as doenças que causam ambiguidade genital.

3. Para a realização do trabalho apenas serão colhidos cerca de 4 ml de sangue do antebraço do seu filho(a), que serão usados para realização das dosagens hormonais.

4. O risco da coleta se resume à possibilidade de hematoma (“roxo”) ou dor no local da coleta, como em qualquer outra coleta de sangue já realizada por seu filho(a). Esta será a única coleta de material.

5. Só poderemos concluir o resultado da pesquisa quando o estudo estiver terminado e pudermos comparar os resultados de todos os pacientes que se submeteram ao exame; antes disso não teremos como esclarecer qualquer resultado.

6. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

O principal investigador da pesquisa é o Dr. Gil Guerra-Júnior que pode ser encontrado no Ambulatório de Pediatria do HC-UNICAMP, Telefone (19)3521-7353. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone (19)3521-8936.

7. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

8. Ao voluntário é concedido o direito de confidencialidade; as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos mesmos.

9. Ao voluntário é concedido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

10. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

11. O pesquisador e o executante assumem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre a decisão de autorizar a participação do meu filho(a) no estudo que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o projeto em questão.

Eu conversei com o Dr. Gil Guerra-Júnior/Guilherme Guaragna Filho sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação de meu filho(a) é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o estudo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do responsável: _____ Data: _____

Assinatura do participante: _____ Data: _____

Eu, Gil Guerra-Junior/Guilherme Guaragna Filho, expliquei à _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante.

Assinatura do pesquisador: _____ Data: _____