



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

FLÁVIA MARCORIN DE OLIVEIRA

Avaliação citogenética, molecular e imunoistoquímica de uma amostra de indivíduos
com Distúrbio da Diferenciação do Sexo Ovário-Testicular 46,XX ou 46,XY

CAMPINAS
2022

FLÁVIA MARCORIN DE OLIVEIRA

Avaliação citogenética, molecular e imunoistoquímica de uma amostra de indivíduos com Distúrbio da Diferenciação do Sexo Ovário-Testicular 46,XX ou 46,XY

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, Área de Concentração de Genética Médica

ORIENTADORA: ANDRÉA TREVAS MACIEL GUERRA
COORIENTADOR: TÁRSIS ANTÔNIO PAIVA VIEIRA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA FLÁVIA MARCORIN DE OLIVEIRA, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. ANDRÉA TREVAS MACIEL GUERRA.

CAMPINAS

2022

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

OL4a Oliveira, Flávia Marcorin de, 1990-
Avaliação citogenética, molecular e imunoistoquímica de uma amostra de indivíduos com distúrbio da diferenciação do sexo ovário-testicular 46,XX ou 46,XY / Flávia Marcorin de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Andréa Trevas Maciel Guerra.
Coorientador: Társis Antônio Paiva Vieira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Transtornos ovotesticulares do desenvolvimento sexual. 2. Mosaicismo. 3. Quimerismo. 4. Hibridização *in Situ* fluorescente. 5. Análise em microsséries. 6. Imuno-histoquímica. I. Maciel-Guerra, Andréa Trevas, 1960-. II. Vieira, Társis Antônio Paiva, 1981-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Cytogenetic, molecular and immunohistochemical assessment of a sample of individuals with 46,XX or 46,XY ovotesticular disorder of sexual development

Palavras-chave em inglês:

Ovotesticular disorders of sex development

Mosaicism

Chimerism

In Situ hybridization, Fluorescence

Microarray analysis

Immunohistochemistry

Área de concentração: Genética Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Andréa Trevas Maciel Guerra [Orientador]

Camila Andréa de Oliveira

Juliana Gabriel Ribeiro de Andrade

Antonia Paula Marques de Faria

Guilherme Guaragna Filho

Data de defesa: 07-12-2022

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4315-7302>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0522806915531168>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

FLÁVIA MARCORIN DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: ANDRÉA TREVAS MACIEL GUERRA

COORIENTADOR: TÁRSIS ANTÔNIO PAIVA VIEIRA

MEMBROS TITULARES:

1. PROFA. DRA. ANDRÉA TREVAS MACIEL GUERRA

2. PROFA. DRA. ANTONIA PAULA MARQUES DE FARIA

3. PROFA. DRA. JULIANA GABRIEL RIBEIRO DE ANDRADE

4. PROFA. DRA. CAMILA ANDRÉA DE OLIVEIRA

5. PROF DR. GUILHERME GUARAGNA FILHO

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 07/12/2022

Aos meus pais, Jeanete e Douglas

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, aos meus irmãos e ao meu marido por todo apoio e incentivo desde a iniciação científica até o doutorado, por comemorarem minhas vitórias e serem meu alicerce.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra pela oportunidade em realizar esse trabalho, por todo conhecimento e todos os ensinamentos. Obrigada pela orientação e confiança, por todas as oportunidades para aprender cada vez mais, por ser uma excelente pesquisadora, profissional e docente.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Társis Antonio Paiva Vieira pela oportunidade, pela excelente co-orientação, por todo conhecimento compartilhado comigo, por ser um grande exemplo de pesquisador e docente.

Agradeço ao Prof. Dr. José Vassallo pela oportunidade e paciência em me ensinar análise de imunoistoquímica e ao Paulo Latuf Filho do Laboratório de Investigação em Patologia/FCM, pela contribuição, parceria e ajuda na realização das técnicas de imunoistoquímica e coloração de HE.

Agradeço a Nilma, Ana Paula, Samira e Gabriela por terem me recebido com tanto carinho no Laboratório de Citogenética, por compartilharem comigo suas experiências e conhecimento técnico e por todo apoio ao longo do doutorado.

Agradeço a Dra. Maricilda, Taís, Mara, Helena e Marcela por me receberem no CBMEG, por toda ajuda e conhecimento compartilhado.

Agradeço ao Dr. Gil Guerra Júnior, aos demais membros do GIEDDS e todos os profissionais que contribuíram com conhecimento técnico e teórico para realização desse trabalho e para minha formação.

Agradeço aos membros da banca de qualificação e defesa pelas contribuições na tese.

Às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro no processo nº 2019/26382-3, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O distúrbio da diferenciação do sexo ovário-testicular (DDS OT) é uma condição rara caracterizada pela presença de tecido ovariano e testicular no mesmo indivíduo, em gônadas separadas ou na mesma gônada (ovotestis). O cariótipo pode ser 46,XX (o mais frequente), 46,XY, ou conter anomalias de cromossomos sexuais. A diferenciação testicular depende normalmente da expressão do gene *SRY*, presente em Yp, que ativa o gene *SOX9*; este, por sua vez, regula a cascata de genes envolvidos na diferenciação testicular. A diferenciação ovariana depende da ausência do gene *SRY* e da expressão de genes pró-ovarianos, como *FOXL2*, que inibem a expressão do *SOX9*. A etiologia do DDS-OT em indivíduos com cariótipo 46,XX ou 46,XY ainda é desconhecida na maioria dos casos. Poucos estudos buscaram detectar mosaicismos ou quimerismo oculto nas gônadas desses pacientes. É escasso o conhecimento sobre a expressão dos genes *SRY*, *SOX9* e *FOXL2* no tecido gonadal nesses casos. Ademais, a investigação de desequilíbrios genômicos usando a técnica de análise cromossômica por *microarray* (CMA) têm permitido a caracterização de genes associados a casos de DDS. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de outras linhagens celulares (mosaicismos ou quimerismo oculto) em tecido gonadal através da técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e reação em cadeia da polimerase (PCR), analisar a localização das proteínas *SRY*, *SOX9* e *FOXL2* através de imunoistoquímica e detectar a presença de deleções e duplicações através de CMA em pacientes com DDS-OT 46,XX ou 46,XY. Trata-se de um estudo retrospectivo em que oito pacientes com DDS OT e cariótipo normal (46,XX ou 46,XY) atendidos no GIEDDS nos últimos 27 anos preencheram os critérios de inclusão. Por se tratar de um estudo retrospectivo, a qualidade do tecido gonadal incluído em parafina impossibilitou a investigação de outras linhagens celulares (mosaicismos ou quimerismo oculto) nos pacientes estudados. Apenas a expressão de *FOXL2* ocorreu conforme esperado, ocorrendo marcações positivas apenas em folículos ovarianos. A expressão de *SOX9* e *SRY* foi observada em túbulos seminíferos e em folículos ovarianos em alguns casos, sendo necessária a validação por outra técnica para confirmação do resultado. A técnica de CMA possibilitou a detecção de deleção em 9p e duplicação em 18p em um paciente XY e duplicação em Xq27.1 em um paciente XX. Os resultados do estudo demonstram a importância do uso de CMA no diagnóstico etiológico em casos de DDS-OT e a necessidade de estabelecer protocolos de pesquisa para armazenamento de tecido gonadal a partir de biópsias de pacientes com DDS para estudos genéticos prospectivos.

Palavras-chave: DDS OT; mosaicismos ou quimerismo; Hibridação *in situ* fluorescente; PCR; CMA; imunoistoquímica.

ABSTRACT

Ovotesticular disorder of sexual development (OT-DSD) is a rare condition characterized by the presence of ovarian and testicular tissue in the same individual, in separate gonads or in the same gonad (ovotestis). The karyotype may be 46,XX (most common), 46,XY, or contain sex chromosome abnormalities. Testicular differentiation normally depends on the expression of the SRY gene, present in Yp, which activates the SOX9 gene, which is responsible for regulating the cascade of genes involved in testicular differentiation. Ovarian differentiation depends on the absence of the SRY gene and the expression of pro-ovarian genes, such as FOXL2, which inhibits SOX9 expression. The etiology of OT-DSD in individuals with 46,XX or 46,XY karyotype is still unknown in most cases. Few studies have detected the presence of mosaicism or occult chimerism in the gonads of patients with OT-DSD. There is also little knowledge about the expression of SRY, SOX9 and FOXL2 genes in the gonadal tissue in these cases. Furthermore, the investigation of genomic imbalances using the chromosomal analysis by microarray (CMA) technique has enabled the characterization of genes associated with DDS cases. Thus, the aim of this work was to investigate the presence of other cell lines (mosaicism or occult chimerism) in gonadal tissue through the technique of Fluorescent in situ Hybridization (FISH) and polymerase chain reaction (PCR), analyze the localization of SRY, SOX9 and FOXL2 proteins through immunohistochemistry and detect the presence of deletions and duplications through CMA in patients with DDS-OT 46,XX or 46,XY. This is a retrospective study with eight OT-DSD patients and normal karyotype (46,XX or 46,XY) attended at GIEDDS in the last 27 years. As this was a retrospective study, the quality of the gonad tissue embedded in paraffin made it impossible to investigate other cell lines (mosaicism or occult chimerism) in the patients studied. Only FOXL2 expression occurred as expected, with positive markings occurring only in ovarian follicles. The expression of SOX9 and SRY was observed in seminiferous tubules and in ovarian follicles in some cases, requiring validation by another technique to confirm the result. The CMA technique enabled the detection of 9p deletion and 18p duplication in an XY patient and Xq27.1 duplication in an XX patient. Our results demonstrate the importance of using CMA in the etiological diagnosis of DDS-OT cases and the need to establish research protocols for storage of gonadal tissue from biopsies of patients with DDS for prospective genetic studies.

Keywords: OT-DSD; mosaicism or chimerism; Fluorescent in situ hybridization; PCR; CMA; immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática da determinação sexual mostrando a gônada bipotencial e posteriormente ovário ou testículo.....	20
Figura 2: Representação esquemática do estado sexualmente neutro.....	21
Figura 3: Esquema ilustrando de forma resumida o processo da diferenciação sexual normal.....	25
Figura 4: Esquema ilustrando a Classificação de Prader.....	28
Figura 5: Representação esquemática da PCR convencional e do <i>nested</i> PCR.....	54
Figura 6: Resultado de FISH em paciente controle.....	64
Figura 7: Imagem comparando a qualidade dos cortes histológicos entre os pacientes.....	65
Figura 8: Imagem do gel de agarose da PCR convencional (<i>XES</i>) dos pacientes A1, A2, B2, B5 e B6.....	70
Figura 9: Imagem do gel de agarose da PCR convencional (<i>TSPY</i> e <i>DYZ3</i>) dos pacientes A1, A2, B2, B5 e B6.....	70
Figura 10: Imagem do gel de agarose da PCR convencional (<i>XES</i> e <i>TSPY</i>) dos pacientes A1, B1, B2 e B3.....	71
Figura 11: Imagem do gel de agarose da PCR convencional (<i>DYZ3</i>) dos pacientes A1, B1, B2 e B3.....	71
Figura 12: Imagem do gel da agarose da PCR convencional (<i>XES</i> e <i>TSPY</i>) dos controles femininos e masculinos de DNA em tecido parafinado.....	72
Figura 13: Imagem do gel da agarose da PCR convencional (<i>DYZ3</i>) dos controles femininos e masculinos de DNA em tecido parafinado.....	72
Figura 14: Imagem do gel de agarose do <i>nested</i> -PCR (<i>TSPY</i> e <i>DYZ3</i>) dos pacientes A1, A2 e B2.....	75
Figura 15: Imagem do gel de agarose do <i>nested</i> -PCR (<i>SRY</i>) dos pacientes A1, A2, B2 e B5.....	76
Figura 16: Imagem do gel de agarose do <i>nested</i> -PCR (<i>TSPY</i> e <i>DYZ3</i>) dos pacientes B5 e B6.....	77
Figura 17: Imagem do gel de agarose do <i>nested</i> -PCR (<i>SRY</i>) do paciente B6.....	77
Figura 18: Imagem do gel de agarose do <i>nested</i> -PCR (<i>SRY</i> e <i>DYZ3</i>) dos pacientes A1, B1, B2, B3 e B4.....	78
Figura 19: Imagem do gel de agarose do <i>nested</i> -PCR (<i>TSPY</i>) dos pacientes A1, B1, B2, B3 e B4.....	79
Figura 20: Imagem do gel de agarose do <i>nested</i> -PCR (<i>SRY</i> , <i>TSPY</i> e <i>DYZ3</i>) dos controles femininos e masculinos de DNA em tecido parafinado.....	80
Figura 21: Log2Ratio da deleção em 9p24.3p23 do paciente A2.....	83

Figura 22: Log2Ratio da duplicação em 18p11.32p11.23 do paciente A2.....	84
Figura 23: Log2Ratio da deleção em 13q14.2 do paciente B2.....	86
Figura 24: Reação de imunoistoquímica nos controles positivos e negativos.....	91
Figura 25: Reação de imunoistoquímica teste em tecido ovariano e testicular.....	92
Figura 26: Reação de imunoistoquímica da gônada direita (1ª biópsia) do paciente A1, tecido ovariano.....	95
Figura 27: Reação de imunoistoquímica da gônada direita (1ª biópsia) do paciente A1, ênfase no tecido testicular.....	96
Figura 28: Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente A1.....	97
Figura 29: Reação de imunoistoquímica da gônada direita (1ª biópsia) do paciente A2.....	98
Figura 30: Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente A2.....	99
Figura 31: Reação de imunoistoquímica da gônada direita (1ª biópsia) do paciente B1, ênfase no tecido testicular.....	101
Figura 32: Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (1ª biópsia) do paciente B1, ênfase no tecido testicular.....	102
Figura 33: Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (2ª biópsia) do paciente B1.....	103
Figura 34: Reação de imunoistoquímica da gônada direita (1ª biópsia) do paciente B2.....	104
Figura 35: Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (1ª biópsia) do paciente B2.....	105
Figura 36: Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente B2, ênfase em tecido ovariano.....	106
Figura 37: Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente B2, ênfase no tecido testicular.....	107
Figura 38: Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (2ª biópsia) do paciente B2, ênfase no tecido ovariano.....	108
Figura 39: Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (2ª biópsia) do paciente B2, ênfase no tecido testicular.....	109
Figura 40: Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda do paciente B3, ênfase no tecido testicular.....	110
Figura 41: Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda do paciente B3, ênfase no tecido ovariano.....	111
Figura 42: Reação de imunoistoquímica da gônada direita (1ª biópsia) do paciente B4, ênfase no tecido testicular.....	112
Figura 43: Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (1ª biópsia) do paciente B4, ênfase no tecido ovariano.....	113

Figura 44: Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente B4, ênfase no tecido ovariano.....	114
Figura 45: Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente B4, ênfase no tecido testicular.....	115
Figura 46: Reação de imunoistoquímica da gônada direita do paciente B5, ênfase no tecido ovariano.....	116
Figura 47: Reação de imunoistoquímica da gônada direita do paciente B5, ênfase no tecido testicular.....	117
Figura 48: Reação de imunoistoquímica da gônada direita (1ª biópsia) do paciente B6.....	118
Figura 49: Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (1ª biópsia) do paciente B6, ênfase no tecido ovariano.....	119
Figura 50: Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (1ª biópsia) do paciente B6, ênfase no tecido testicular.....	120
Figura 51: Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente B6, ênfase no tecido ovariano.....	121
Figura 52: Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente B6, ênfase no tecido testicular.....	122
Figura 53: Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (2ª biópsia) do paciente B6, ênfase no tecido ovariano.....	123
Figura 54: Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (2ª biópsia) do paciente B6, ênfase no tecido testicular.....	124

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação dos distúrbios da diferenciação gonadal de acordo com o cariótipo e fenótipo genital observado.....	30
Quadro 2: Descrição clínica de oito pacientes e um controle.....	45
Quadro 3: Sequência de <i>primers</i> usados na PCR convencional.....	51
Quadro 4: Sequência de primers usados no <i>nested</i> PCR.....	53
Quadro 5: Titulação dos anticorpos e padrão de positividade.....	62
Quadro 6: Tamanho das alterações em pacientes com DDS-OT descritas na literatura.....	87-88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração do DNA extraído de tecido gonadal incluído em parafina de pacientes com DDS-OT e controles.....	67
Tabela 2: PCR com os <i>primers</i> externos para XES, TSPY e DYZ3 no DNA extraído de tecido gonadal incluído em parafina dos pacientes com DDS-OT e controles.....	69
Tabela 3: <i>Nested</i> PCR com os primers internos para <i>SRY</i> , <i>TSPY</i> e <i>DYZ3</i> no DNA extraído de tecido gonadal incluído em parafina dos pacientes com DDS-OT e controles.....	74
Tabela 4: Resultados de imunoistoquímica com os anticorpos anti-FOXL2, SOX9 e SRY da amostra de pacientes com DDS ovário-testicular.....	93-94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
aDG	<i>Affymetrix Database of Genomic Variants</i>
AE	Tampão de eluição
AL	Tampão de lise de tecido para isolar ácidos nucleicos
AMH	<i>anti-müllerian hormone</i>
ATL	Tampão de lise de tecido para purificação de ácidos nucleicos
AW1	Tampão de lavagem 1
AW2	Tampão de lavagem 2
BPES	Síndrome de Blefarofimose, Ptose e Epicanto Inverso
BSA	Albumina bovina
CBX2/M33	<i>chromobox homolog 2</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDR1	<i>Cerebellar Degeneration Related Protein 1</i>
CDR1-AS	CDR1 antisense RNA
ChAS	<i>Chromosome Analysis Suite</i>
CMA	Análise cromossômica por <i>microarray</i>
CNVs	Variações no número de cópias
CYP11A1	<i>cytochrome p450 family 11 subfamily a member 1</i>
CYP17A1	<i>cytochrome p450 family 17 subfamily a member 1</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDG	Distúrbios da diferenciação gonadal
DDS	Distúrbio da diferenciação do sexo
DDS-OT	Distúrbio da diferenciação do sexo ovarioteístico
DGV	<i>Database of Genomic Variants</i>
DHT	diidrotestosterona
dH ₂ O	água destilada
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DMRT1	<i>doublesex and mab-3 related transcription factor 1</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMX2	<i>empty spiracles homeobox 2</i>

<i>FAM149B1P1</i>	<i>family with sequence similarity 149 member B1 pseudogene 1</i>
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
<i>FOXL2</i>	<i>forkhead box L2</i>
<i>GATA4</i>	<i>GATA Binding Protein 4</i>
GIEDDS	Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo
HAM	Hormônio antimülleriano
HC	Hospital de Clínicas
HCl	Ácido clorídrico
MAPD	Median Absolute Pairwise Difference
<i>miR-1469</i>	<i>MicroRNA 1469</i>
<i>MIR320D2</i>	<i>MicroRNA 320d-2</i>
<i>LDOC1</i>	<i>LDOC1 regulator of NFkB signaling</i>
LH	Hormônio luteinizante
<i>LHX9</i>	<i>LIM homeobox 9</i>
LOH	Regiões de perda de heterozigose
<i>MAGEC1</i>	<i>MAGE Family Member C1</i>
<i>MAGEC2</i>	<i>MAGE Family Member C2</i>
<i>MAGEC3</i>	<i>MAGE Family Member C3</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaSCN	tiocianato de sódio
NGS	<i>next generation sequencing</i>
<i>NR0B1</i>	<i>nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1</i>
<i>NR2F2</i>	<i>NFE2-related factor 2</i>
<i>NR2F2-AS1</i>	<i>NR2F2 antisense RNA 1</i>
<i>NR5A1</i>	<i>nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1</i>
OMIM	<i>Online mendelian inheritance in man</i>
pb	<i>Pares de base</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>PGAM1P12</i>	<i>phosphoglycerate mutase 1 pseudogene 12</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	<i>RNA sequencing</i>
<i>RPL31P5</i>	<i>ribosomal protein L31 pseudogene 5</i>
<i>RPS17P17</i>	<i>ribosomal protein S17 pseudogene 17</i>

<i>RSPO1</i>	<i>R-spondin1</i>
<i>SF1</i>	<i>steroidogenic factor 1</i>
<i>SNP</i>	Single nucleotide polymorphism
<i>SNPQC</i>	<i>Single Nucleotide Polymorphism Quality Control</i>
<i>SNV</i>	<i>single nucleotide variants</i>
<i>SPANXA1</i>	<i>sperm protein associated with the nucleus, X-Linked, family member A1</i>
<i>SPANXB1</i>	<i>SPANX family member B1</i>
<i>SPANXB2</i>	<i>SPANX family member B2</i>
<i>SPANXC</i>	<i>SPANX Family Member C</i>
<i>SPANXD</i>	<i>SPANX Family Member D</i>
<i>SPATA8</i>	<i>spermatogenesis associated 8</i>
<i>SPATA8-AS</i>	<i>SPATA8 antisense RNA 1</i>
<i>SOX3</i>	<i>SRY-related HMG-box 3</i>
<i>SOX5</i>	<i>SRY-related HMG-box 5</i>
<i>SOX9</i>	<i>sex determining region Y - box 9</i>
<i>SOX10</i>	<i>SRY-related HMG-box 10</i>
<i>SSC</i>	saline-sodium citrate
<i>SRY</i>	<i>sex determining region on the Y chromosome</i>
<i>STAR</i>	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
<i>TA</i>	Temperatura ambiente
<i>Taq</i>	Taq DNA polymerase
<i>TESCO</i>	<i>Testis-specific Enhancer of Sox9 core</i>
<i>TSPY</i>	<i>testis specific protein Y-linked 1</i>
<i>Waviness</i>	Waviness Standard Deviation
<i>WNT4</i>	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 4</i>
<i>WT1</i>	<i>Wilms tumor 1</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Diferenciação sexual normal.....	19
1.2. Distúrbios da diferenciação do sexo (DDS).....	25
1.3. Distúrbios da diferenciação gonadal.....	29
1.3.1. Quadro clínico.....	30
1.3.2. Etiologia.....	31
1.3.2.1. Alterações cromossômicas.....	31
1.3.2.2. Alterações no gene <i>SRY</i>	32
1.3.2.3. Alterações em <i>NR5A1</i>	32
1.3.2.4. Alterações no gene <i>SOX9</i>	33
1.3.2.5. Alterações no gene <i>WT1</i>	33
1.3.2.6. Alterações em <i>WNT4</i>	34
1.3.2.7. Alterações em <i>FOXL2</i>	34
1.4. Distúrbios da diferenciação do sexo ovário-testicular.....	34
1.4.1. A aplicação da hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) e da imunoistoquímica ao estudo de indivíduos DDS-OT.....	37
1.4.2. Análise Cromossômica por <i>Microarray</i> (CMA) em indivíduos com DDS-OT.....	39
1.5. Justificativa.....	40
2. OBJETIVO.....	42
3. MÉTODOS.....	43
3.1. Casuística.....	43
3.2. Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente (FISH).....	46
3.3. Extração de DNA em tecido parafinado.....	50
3.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	51
3.3.2. Análise cromossômica por <i>microarray</i> (CMA).....	54
3.3.3. Análise e interpretação dos resultados de CMA.....	58
3.4. Coloração de HE.....	61
3.5. Imunoistoquímica.....	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64

4.1. Busca de mosaicismo ou quimerismo oculto.....	64
4.1.1. Técnica de FISH.....	64
4.1.2. Pesquisa de sequências de Y em pacientes 46,XX por PCR.....	66
4.2. Busca de desequilíbrios genômicos por meio de CMA.....	83
4.3. Imunoistoquímica.....	88
4.3.1. Avaliação inicial com coloração de hematoxilina-eosina (HE).....	88
4.3.2. Reações de imunoistoquímica.....	90
4.4. Considerações finais.....	126
5. CONCLUSÕES.....	130
6. REFERÊNCIAS.....	131
7. ANEXOS.....	145
7.1. Anexo 1: Alterações realizadas nos variados protocolos de FISH utilizados neste trabalho.....	145
7.2. Anexo 2: Parecer consubstanciado do CEP (65249316.0.0000.5404)	147
7.3. Anexo 3: Parecer consubstanciado do CEP (65478617.2.0000.5404)	151

1. INTRODUÇÃO

A diferenciação sexual envolve uma rede de interação e expressão de vários genes, o que a torna um processo complexo e sujeito a erros, os quais são conhecidos como distúrbios da diferenciação do sexo (DDS). Dentre os DDS, o distúrbio da diferenciação ovário-testicular (DDS-OT) é caracterizado pela presença de tecido ovariano e testicular em um mesmo indivíduo, podendo estar presente em gônadas separadas ou na mesma gônada (ovotestis). É uma afecção muito rara que pode se associar a anomalias de cromossomos sexuais ou, mais frequentemente, estar presente em indivíduos com cariótipo normal, 46,XX ou 46,XY; nestes, a etiologia é desconhecida na maioria dos casos.

Grande parte dos indivíduos com DDS-OT 46,XX não apresenta o gene *SRY* (*sex-determining region Y*) nem mutações nos genes pró-testiculares atualmente conhecidos, enquanto que os casos de DDS-OT 46,XY não se associam a mutações no gene *SRY*. Por outro lado, alguns poucos casos foram relatados em que a técnica de FISH identificou a presença de mosaicismo ou quimerismo oculto em tecido gonadal de pacientes com DDS-OT e cariótipo normal. Ademais, são poucos os estudos que analisam o padrão das proteínas *SRY*, *SOX9* e *FOXL2* em tecido gonadal de pacientes com essa condição.

Assim, são necessários novos estudos buscando aprofundar o conhecimento a respeito do DDS-OT em indivíduos com cariótipo normal a fim de aprimorar o prognóstico individual e o aconselhamento genético.

1.1. Diferenciação sexual normal

Nos seres humanos e na maioria dos demais mamíferos, a determinação e diferenciação do sexo estão relacionadas à presença ou ausência do cromossomo Y. O desenvolvimento do sexo é dividido em duas etapas: a determinação sexual, que envolve um processo complexo que induz as gônadas bipotenciais (indiferenciadas)

a se tornarem testículo ou ovário (figura 1); e a diferenciação sexual, que ocorre posteriormente por meio da presença ou ausência de secreção de hormônios gonadais, determinando o desenvolvimento dos genitais internos e externos (1, 2, 3, 4, 5).

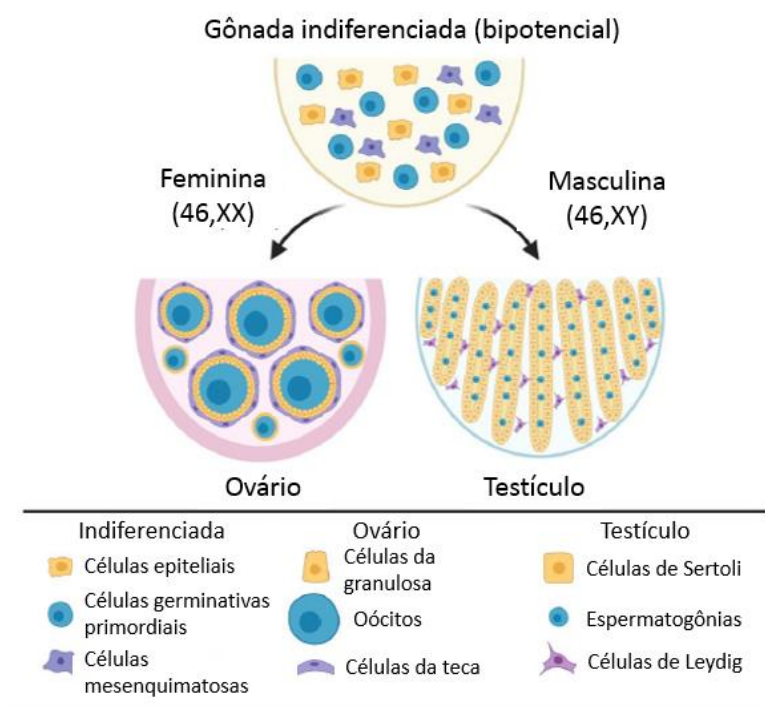


Figura 1. Representação esquemática da determinação sexual mostrando a gônada bipotencial e posteriormente ovário ou testículo. As gônadas bipotenciais são idênticas em ambos os sexos (XX e XY), compostas por células epiteliais de suporte, células mesenquimatosas e células germinativas primordiais. Nas gônadas XY as células de suporte se diferenciam em células de Sertoli, que irão envolver as células germinativas (espermatogônias) para formar os cordões testiculares, e as células mesenquimatosas se diferenciam em células de Leydig. Nas gônadas XX as células epiteliais se diferenciam em células pré-granulosas que irão envolver os oócitos para formação dos folículos primordiais, enquanto as células mesenquimatosas dão origem às células da teca [Fonte: Adaptado de Estermann & Smith, 2020 (5)].

O sexo genético é determinado na concepção pelos cromossomos sexuais, XX ou XY. Até cerca de seis a sete semanas após a fertilização, os embriões humanos encontram-se num estágio indiferenciado, contendo primórdios gonadais e genitais idênticos nos dois sexos, e não há diferenças macroscópicas nem microscópicas entre eles. Nesse período embrionário há um par de gônadas bipotenciais, dois pares de primórdios dos condutos genitais internos, masculinos (dutos de Wolff) e femininos

(dutos de Müller), e primórdios dos genitais externos (tubérculo genital, pregas genitais, saliências labioescrotaís e seio urogenital) (figura 2).

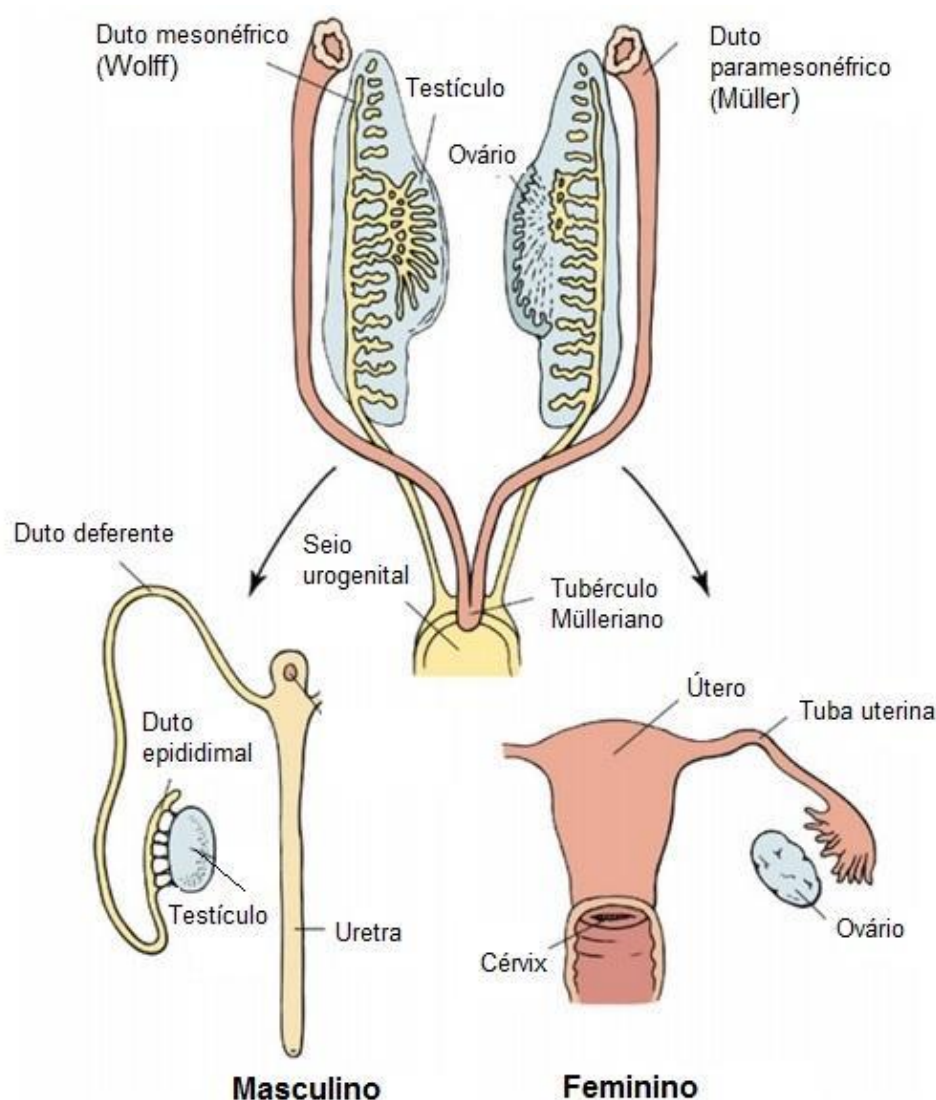


Figura 2. Representação esquemática do estado sexualmente neutro. Sistema sexual indiferenciado entre a sexta e a sétima semanas de gestação. O duto mesonéfrico irá se diferenciar em epidídimo, duto deferente e vesículas seminais e o duto paramesonéfrico em trompas, útero e parte superior da vagina. [Fonte: Modificado de Biason-Lauber, 2010 (2)].

As gônadas bipotenciais surgem na quinta semana de gestação a partir de um espessamento na porção medial do mesonefro. A proliferação do mesênquima revestido por epitélio celômico dá origem às cristas gonadais, para onde migram, na sexta semana, as células germinativas primordiais que se originam do endoderma do

saco vitelino, próximo ao alantoide (3, 6, 7, 8). O desenvolvimento e a manutenção das gônadas indiferenciadas dependem da expressão de genes específicos divididos em dois grupos: genes *homeobox*, incluindo *LHX9* (*LIM homeobox 9*), *EMX2* (*empty spiracles 2*) e *CBX2/M33* (*chromobox 2*), e genes que codificam fatores de transcrição: *WT1* (*Wilms tumor 1*) e *NR5A1* (*Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1*) (9, 10, 11, 12, 13, 14).

A formação dos testículos depende da expressão do gene *SRY*, localizado em Yp11. A descoberta desse gene foi um marco na compreensão desse processo bastante complexo. Experimentos comprovaram que na ausência de expressão do *SRY* em camundongos XY o fenótipo era feminino, e quando esse gene era introduzido em camundongos XX ocorria diferenciação testicular (15, 16, 17, 18).

Nas gônadas XY a expressão do *SRY* ocorre na sétima semana de gestação, nas células pré-Sertoli. *WT1* interage com *NR5A1* para regular a expressão de *SRY* (19, 20). Este, juntamente com *NR5A1*, atua na região promotora de *SOX9* [*SRY-related high-mobility group (HMG) box 9*], ocasionando sua expressão (21, 22). Para que ocorra expressão de *SOX9* especificamente nos testículos há um elemento regulador de 3,2 kb conhecido como TES, localizado a 13 kb *upstream* do sítio de início da transcrição. Dentro dessa região promotora há uma região central chamada TESCO (*Testis-specific Enhancer of Sox9 core*), que é altamente conservada em camundongos e humanos. Durante a expressão positiva de *SOX9* vários genes atuam diretamente via região promotora TESCO. Estudos sugerem que SF1 (*steroidogenic factor 1*), que é codificado pelo gene *NR5A1*, atua ativando a expressão de *SOX9* via TESCO nas gônadas (23, 24, 25).

A expressão de *SOX9* promove a diferenciação das células de Sertoli, e estas são responsáveis por promover a proliferação e maturação das células germinativas; além disso, *SOX9* tem papel importante em inibir a expressão do gene *FOXL2*, que é necessário no início da diferenciação ovariana (26, 27). *SOX9* continua sendo expresso nas células de Sertoli ao longo da vida, mesmo após a suspensão da expressão de *SRY*, como demonstrado em um estudo em camundongos que evidenciou a atuação de SF1 na região promotora de *SOX9* para manter sua expressão (28). Durante a diferenciação testicular as células de Sertoli se agrupam ao redor das células germinativas e geram os cordões testiculares, que dão origem

aos túbulos seminíferos, enquanto no compartimento intersticial as células mesenquimatosas dão origem às células de Leydig, responsáveis pela esteroidogênese (3, 8).

Uma vez diferenciado o testículo, este é responsável pela regressão dos primórdios dos condutos genitais internos femininos e pela diferenciação dos condutos genitais internos e dos genitais externos masculinos. A partir da sétima semana as células de Sertoli secretam o hormônio anti-mülleriano (HAM), que induz por via parácrina a regressão dos dutos de Müller, de modo que cada testículo é responsável pela regressão do duto ipsilateral.

Entre a oitava e a nona semanas as células de Leydig passam a secretar testosterona por meio do estímulo da gonadotrofina coriônica humana (hCG); a testosterona vai promover a diferenciação dos dutos de Wolff nos condutos genitais internos, ou seja, epidídimos, canais deferentes, vesículas seminais e dutos ejaculatórios. A diferenciação dos dutos de Wolff depende de alta concentração local de testosterona, o que faz com que cada testículo também seja responsável pela diferenciação do duto de Wolff ipsilateral (3, 8). Alguns fatores de transcrição, como *NR5A1*, *SOX9*, *GATA4* (*GATA Binding Protein 4*) e *WT1*, estão sendo relatados como reguladores da transcrição de HAM (12, 29).

A testosterona é convertida pela enzima 5-alfa--redutase tipo 2 nos tecidos-alvo em diidrotestosterona (DHT). A DHT é um andrógeno mais potente que a testosterona e é o hormônio responsável pela masculinização dos primórdios dos genitais externos entre a nona e a décima-segunda semanas de gestação. O estímulo da DHT faz com que o tubérculo genital e as pregas genitais originem o corpo do pênis, as saliências labioescrotais se fundam na linha média formando a bolsa escrotal e o seio urogenital dê origem à uretra (8).

A migração dos testículos para a bolsa escrotal ocorre no último trimestre de gestação, entre a vigésima-oitava e a trigésima-segunda semana. Embora o hCG seja responsável pelo estímulo das células de Leydig durante o período crítico da diferenciação sexual masculina, a partir da segunda metade da gestação o hormônio luteinizante (LH) do próprio feto deverá manter esse estímulo para promover a descida testicular e também o crescimento peniano (8).

A diferenciação ovariana se inicia algumas semanas após a testicular, por volta da décima semana. Até recentemente acreditava-se que ocorria passivamente, em decorrência da ausência do *SRY*, porém tem sido demonstrado que também envolve a interação de determinados genes. É o caso de *RSPO1* (*R-spondin1*), *WNT4* (*Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 4*) e β -catenina, componentes da via que promove a diferenciação ovariana e inibem a formação dos testículos (30). Outro componente importante é o fator de transcrição *FOXL2*, considerado um marcador da diferenciação ovariana. Esse gene é expresso não só no estágio inicial do desenvolvimento dos ovários, mas também nas células foliculares no período pós-natal e na vida adulta, e acredita-se que tenha um papel no desenvolvimento e manutenção dos folículos durante o período fértil (7, 31).

Na ausência de secreção de HAM, os dutos de Müller se diferenciam nos genitais internos femininos (útero, trompas e porção superior da vagina). A diferenciação dos dutos de Wolff, por sua vez, não ocorre na ausência de secreção local de testosterona. Finalmente, como não há estímulo pela DHT, o tubérculo genital, as pregas genitais e as saliências labioescrotais dão origem, respectivamente, ao clitóris, aos pequenos lábios e aos grandes lábios, enquanto o seio urogenital divide-se longitudinalmente para originar a uretra feminina e a porção inferior da vagina (2, 8, 32). Um resumo do processo da diferenciação sexual normal pode ser observado na figura 3.

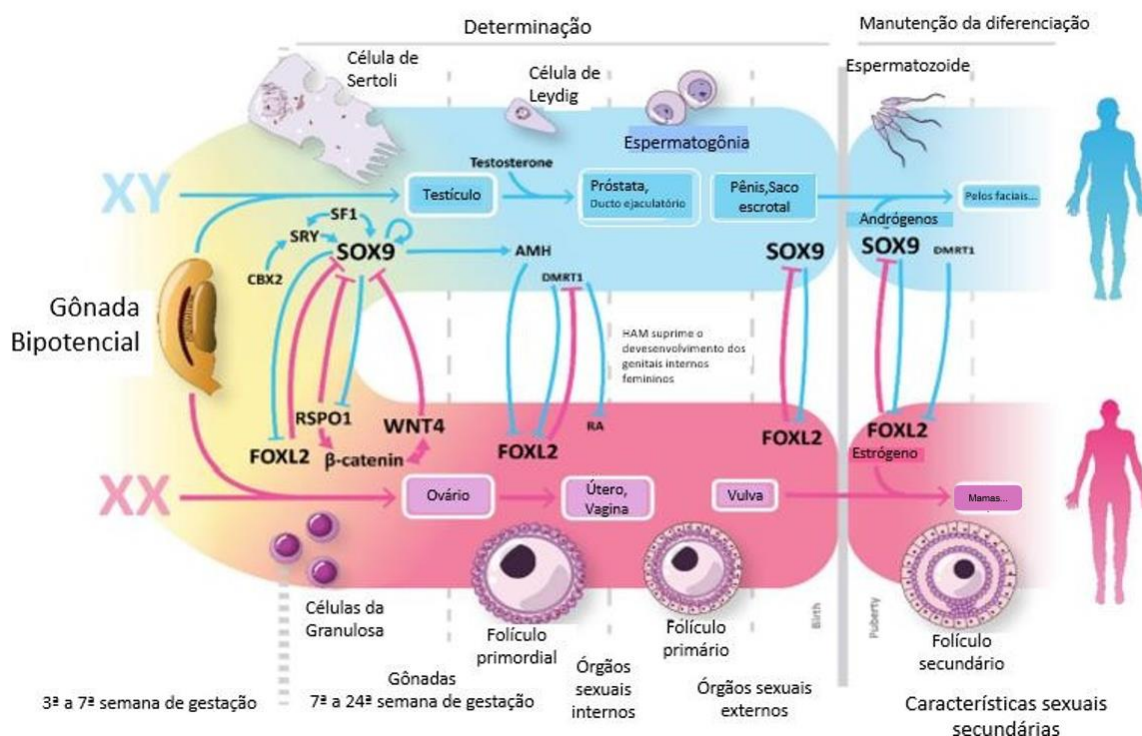


Figura 3. Esquema ilustrando de forma resumida o processo da diferenciação sexual normal. Determinação e diferenciação sexual normal em humanos. Nas gônadas XY, *SRY* promove a expressão de *SOX9*, com diferenciação das células de Sertoli e inibição de genes pró-ovarianos. As células de Sertoli secretam HAM e as células de Leydig testosterona, promovendo, respectivamente, a regressão dos ductos de Müller e a diferenciação dos ductos de Wolff. A testosterona é convertida em DHT, que masculiniza os genitais externos. Nas gônadas XX, a expressão de *FOXL2*, *RSPO1*, *WNT4* e *β-catenina* promovem a diferenciação ovariana e inibem a diferenciação testicular. Na ausência de HAM e de testosterona, ocorre a diferenciação de genitais internos e externos femininos. [Fonte: adaptado: Gutiérrez & Biason-Lauber, 2019 (14)].

1.2. Distúrbios da diferenciação do sexo (DDS)

Como foi visto, a diferenciação sexual é um processo complexo que envolve a expressão de vários genes, alguns dos quais já identificados. Variantes patogênicas em genes envolvidos na cascata da diferenciação testicular ou na diferenciação e manutenção ovarianas, em genes envolvidos na esteroidogênese ou ainda naqueles que codificam receptores hormonais podem resultar em diversas anomalias gonadais e(ou) genitais, incluindo ambiguidade genital, distúrbios puberais e(ou) infertilidade.

Até o ano de 2005, indivíduos com anomalias congênitas do aparelho reprodutor e ambiguidade genital eram classificados como portadores de intersexo,

pseudo-hermafroditismo, hermafroditismo ou sexo reverso; além disso, não havia padronização em relação ao manejo nesses casos. Devido ao teor pejorativo dos termos utilizados, e levando em conta os avanços no diagnóstico, prognóstico e conduta nessa área, foi realizada naquele ano uma reunião de consenso internacional na cidade de Chicago, EUA, organizada pelas sociedades norte-americana e europeia de endocrinologia pediátrica.

As conclusões do *Chicago Consensus Meeting* foram publicadas no ano seguinte (33), sendo então proposta uma nova nomenclatura, incluindo o uso do termo *disorders of sex development* – DSD, que, dentre outras traduções em português, inclui distúrbios da diferenciação do sexo – DDS, para definir “condições congênitas em que o desenvolvimento dos cromossomos sexuais, das gônadas ou do sexo anatômico é atípico”. Mais recentemente vem sendo revisto o uso do termo “distúrbio”, por sua conotação patológica e por haver grande variedade na gravidade dos DDS; assim, o termo *differences*/diferenças vem sendo usado por vários autores (4, 34, 35, 36, 37).

Em consonância com a complexidade do processo de determinação e diferenciação sexual, há não só ampla variedade etiológica, mas também fenotípica. O fenótipo pode variar desde genitais tipicamente masculinos ou femininos, em que o diagnóstico é feito devido a alterações puberais, até ambiguidade genital em graus variados (38).

A incidência de ambiguidade genital em recém-nascidos é estimada, de um modo geral, em 1:4.500 a 1:5.500 (39, 40). Ela varia, porém, nos diferentes grupos étnicos: na Alemanha é 1:5.000, enquanto que em algumas populações árabes chega a 1:2.500 (40). Essa diferença pode ser atribuída ao alto índice de consanguinidade e endogamia presente em alguns grupos étnicos, resultando na maior incidência de condições de herança autossômica recessiva (41, 42).

A classificação dos DDS proposta pelo “Consenso de Chicago” baseou-se no sexo genético (35):

1. DDS associados a alterações cromossômicas. Incluem a síndrome de Turner (45,X e variantes), a síndrome de Klinefelter (47,XXY e

variantes), 45,X/46XY (disgenesia gonadal mista ou DDS-OT), e quimeras 46,XX/46,XY (DDS-OT) (35, 43, 44);

2. DDS 46,XY. Incluem distúrbios da diferenciação gonadal (DDS-OT, disgenesia gonadal pura, disgenesia gonadal parcial e regressão testicular), distúrbios na síntese ou ação dos hormônios testiculares (testosterona, HAM) e ambiguidade genital associada a quadros síndrômicos (35, 43, 44);
3. DDS 46,XX. Incluem distúrbios da diferenciação gonadal (DDS-OT, disgenesia gonadal pura e DDS XX testicular), excesso de andrógenos fetais, fetoplacentários ou maternos, ausência congênita de útero e vagina e ambiguidade genital associada a quadros síndrômicos (35, 43, 44).

Ao nascimento, muitas vezes a ambiguidade genital é evidente até mesmo para o leigo; outras vezes, é necessário exame médico cuidadoso para identificar alterações mais discretas que exigem investigação. São critérios para identificação de DDS numa genitália aparentemente feminina haver clitóris aumentado, fusão labial posterior ou massa palpável em região inguinal ou labial, que pode corresponder a testículo; devem ser também investigadas as recém-nascidas com história familiar de insensibilidade completa a andrógenos. Numa genitália aparentemente masculina, testículos não palpáveis bilateralmente, micropênis, hipospadia perineal com ou sem gônadas palpáveis ou hipospadia distal com uma ou ambas as gônadas não palpáveis. Os recém-nascidos devem também sempre ser investigados se houver discordância entre o genital externo e o sexo genético pré-natal (33).

Como salientado no consenso de Chicago, os casos de DDS, principalmente em recém-nascidos, necessitam ser tratados como emergências. No entanto, alguns indivíduos podem vir a ser investigados mais tardiamente, na infância ou adolescência, devido a falha no diagnóstico neonatal da ambiguidade genital, pelo achado de testículos durante a correção de hérnias inguinais em indivíduos fenotipicamente femininos ou por alterações puberais, incluindo sinais de androgenização em meninas, amenorreia primária, atraso puberal em ambos os sexos, ou por ginecomastia ou hematúria cíclica em meninos (33); podem também

ser diagnosticados somente na vida adulta devido a infertilidade. Independentemente da idade em que seja feita a investigação, esta deve ser realizada por equipe multidisciplinar, cuja composição ideal inclui neonatologista, endocrinologista, geneticista, cirurgião pediátrico, urologista, ginecologista e psicólogo para a adequada condução dos casos e, nos recém-nascidos, para a atribuição do sexo (33,45).

A avaliação clínica deve se iniciar com o levantamento de dados gestacionais e pessoais, histórico familiar, e com o exame físico geral, dismorfológico e por aparelhos, sendo que no caso do aparelho reprodutor o exame da genitália externa permite identificar a posição do meato uretral, o tamanho do falo e a localização das gônadas, definindo, assim, o grau de androgenização. Este pode ser expresso por meio da classificação de Prader (figura 4), elaborada originalmente para a descrição dos genitais de meninas 46,XX com hiperplasia adrenal congênita, mas que pode ser utilizado também em outras condições, ou pelo escore de masculinização externa desenvolvido para indivíduos 46,XY (34,35, 46, 47).

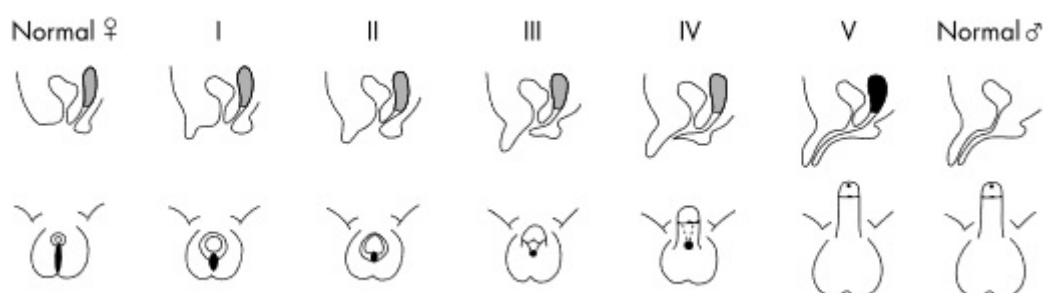


Figura 4. Esquema ilustrando a Classificação de Prader. Classificação de Prader dos diferentes graus de androgenização da genitália externa a partir da genitália feminina normal (esquerda) e da genitália masculina normal (direita). [Fonte: adaptado de Ogilvy-Stuart e Brain, 2004 (48)].

A investigação clínica deve ser complementada com exames endocrinológicos (mensuração de concentrações hormonais); exames de imagem (ultrassonografia, ressonância magnética) para localização das gônadas e avaliação dos genitais internos, principalmente a presença ou não de útero; e procedimentos cirúrgicos para avaliação direta dos genitais internos e biopsia gonadal para a realização de estudos histopatológicos. Os exames genéticos incluem a análise de cariótipo com técnicas

de bandamento G para identificação do complemento de cromossomos sexuais e detecção de anomalias cromossômicas numéricas e estruturais; hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas centroméricas de X e Y para detecção de mosaicismo de cromossomos sexuais e identificação de cromossomos marcadores; análise cromossômica por *microarray* (CMA) para identificação de variações no número de cópias (CNVs); sequenciamento de genes associados a DDS; e técnicas de sequenciamento de alto rendimento, mais conhecidas como sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing*, NGS) para investigação de casos de etiologia indefinida (34, 35).

A atribuição do sexo em recém-nascidos com DDS leva em consideração o diagnóstico, que deve ser o mais preciso possível, as características da genitália externa, as opções cirúrgicas, o potencial de puberdade espontânea e de fertilidade, e o risco de neoplasias gonadais que indiquem remoção profilática das gônadas. É fundamental levar em conta a visão da família e, em alguns casos, questões culturais. Desse modo, espera-se reduzir o risco de futura insatisfação com o sexo que foi atribuído. É importante salientar que o gênero se desenvolve por influência de múltiplos fatores, como exposição intra-útero a andrógenos, sexo cromossômico, e também fatores familiares e sociais, o que torna a atribuição do sexo uma questão bastante complexa (33).

1.3. Distúrbios da diferenciação gonadal

Os distúrbios da diferenciação gonadal (DDG) representam um grupo heterogêneo de DDS em que ocorre o desenvolvimento atípico das gônadas, levando, conseqüentemente, a anomalias na diferenciação dos genitais internos e externos e no desenvolvimento puberal. Nesse grupo pode haver gônadas disgenéticas (também denominadas gônadas em fita ou *streaks*), testículos com diversos graus de disgenesia e coexistência de tecido ovariano e testicular. O fenótipo pode ser masculino, feminino, ou haver ambiguidade genital, e o cariótipo pode ser normal (46,XX ou 46,XY) ou revelar anomalias de cromossomos sexuais (quadro 1) (49, 50).

Quadro 1. Classificação dos distúrbios da diferenciação gonadal de acordo com o cariótipo e fenótipo genital observado [Adaptado Lee et al., 2006 (33)].

Anomalias cromossômicas	DDS 46,XY	DDS 46,XX
45,X/46,XY - disgenesia gonadal mista, DDS ovário-testicular (A)	Disgenesia gonadal parcial (A)	Disgenesia gonadal pura (F)
45,X – S. de Turner e suas variantes (F)	Disgenesia gonadal pura (F)	DDS XX testicular (Homem 46,XX) (M,A)
47,XXY - S. de Klinefelter (M)	Disgenesia gonadal associada a quadros sindrômicos (A,F)	Disgenesia gonadal associada a quadros sindrômicos (A,F)
46,XX/46,XY - DDS ovário-testicular (A)	DDS ovário-testicular (A)	DDS ovário-testicular (A)
	Síndromes de regressão testicular (A,F)	

A= ambiguidade genital; F= fenótipo feminino; M= fenótipo masculino

1.3.1. Quadro clínico

Na disgenesia gonadal pura, assim como na síndrome de Turner, há duas gônadas disgenéticas e, portanto, não há secreção de HAM nem de testosterona; assim, os genitais internos e externos são tipicamente femininos e as pacientes são diagnosticadas na adolescência por atraso puberal e amenorreia primária. O cariótipo pode ser 46,XX (herança autossômica recessiva) ou 46,XY (mais frequentemente mutações no gene *SRY*), tendo sido também descritas mutações no gene *NR5A1* (45, 51, 52).

Já na disgenesia gonadal mista (45,X/46,XY) e na disgenesia gonadal parcial 46,XY são encontrados dois testículos disgenéticos ou um testículo disgenético e uma gônada disgenética. Pode haver derivados dos dutos de Müller e os genitais externos são ambíguos, o que faz com que esses pacientes sejam diagnosticados geralmente na infância (45, 53). Tanto a disgenesia gonadal pura quanto a parcial podem se apresentar associadas a quadros sindrômicos em indivíduos 46,XY.

Na síndrome de Klinefelter (47,XXY) e no DDS XX testicular (anteriormente conhecido como Homem 46,XX) os testículos são pequenos, com ausência de

espermatogônias nos túbulos seminíferos e os genitais internos e externos costumam ser tipicamente masculinos, o que faz com que o diagnóstico seja feito, na maioria dos casos, por infertilidade. Já nas síndromes de regressão testicular há ausência macroscópica de testículos em indivíduos 46,XY com evidências de função testicular pregressa (ao menos regressão dos dutos de Müller, mas podendo chegar também a haver genitais internos e externos masculinos sem gônadas palpáveis) (45).

Finalmente, o DDS-OT caracteriza-se pela presença de tecido ovariano e testicular no mesmo indivíduo. O diagnóstico é feito em geral na infância, por ambiguidade genital externa, ou a partir da adolescência por sinais de androgenização em meninas ou de feminização em meninos. O cariótipo pode ser normal (46,XX ou 46,XY) ou revelar anomalias de cromossomos sexuais (como mosaicismo ou quimerismo) (45).

1.3.2. Etiologia

Além das anomalias de cromossomos sexuais, variantes patogênicas em vários genes que participam da diferenciação gonadal têm sido associadas a distúrbios da diferenciação gonadal. Ao menos 75 genes já foram identificados, incluindo *SRY*, *SOX9*, *NR5A1*, *WT1*, *FOXL2* e *WNT4*, detalhados adiante (38, 54, 55).

1.3.2.1. Alterações cromossômicas

Além de variantes de sequência de base única (*single nucleotide variants*, SNV), anomalias de cromossomos sexuais também podem ser causa de distúrbios da diferenciação gonadal. Dentre elas estão incluídas aneuploidias (45,X, 47,XXY), anomalias estruturais, mosaicismo e quimerismo. O mosaicismo cromossômico é caracterizado pela presença de duas ou mais linhagens celulares em um indivíduo oriundas de um único zigoto, e ocorre devido a erros na mitose. Ocorre com frequência na síndrome de Turner e é a etiologia da disgenesia gonadal mista (cariótipo 45,X/46,XY associado a ambiguidade genital). Já no quimerismo as linhagens encontradas são oriundas de zigotos diferentes; um dos mecanismos é a fertilização de dois óvulos seguida de fusão dos zigotos, podendo originar a constituição cromossômica 46,XX/46,XY, que é causa de DDS-OT (56).

1.3.2.2. Alterações no gene *SRY*

Como descrito anteriormente, a expressão do gene *SRY* desempenha um papel primordial na determinação gonadal em embriões XY, levando à diferenciação das gônadas bipotenciais em testículos. Esse gene é composto por apenas um éxon e codifica um fator de transcrição com domínio de ligação ao DNA altamente conservado (*HMG domain*), responsável por regular a expressão de *SOX9*. Variantes patogênicas no gene *SRY* representam a maioria dos casos de disgenesia gonadal pura 46,XY (52), e nos casos de DDS XX testicular a maioria apresenta um segmento de Yp contendo o *SRY* translocado para o braço curto de um dos cromossomos X (57).

1.3.2.3. Alterações em *NR5A1*

O gene *NR5A1* localizado em 9q33, tem mais de 30 kb e desempenha um papel importante na diferenciação sexual e na esteroidogênese. *NR5A1* codifica a proteína SF1 (*steroidogenic factor 1*), que é expressa nas glândulas adrenais e nas gônadas bipotenciais. Por ser um fator de transcrição, SF1 atua na ativação e repressão de genes-alvo; assim, na diferenciação sexual masculina regula a expressão de *SRY*, *SOX9* e do gene *AMH* (*anti-müllerian hormone*), que codifica o HAM.

NR5A1 é expresso na crista urogenital e na gônada bipotencial; no testículo já diferenciado, sua expressão ocorre nas células de Sertoli e posteriormente nas células de Leydig, onde controla a expressão de várias enzimas, como *STAR* (*steroidogenic acute regulatory protein*), *CYP11A1* (*cytochrome p450 family 11 subfamily a member 1*) e *CYP17A1* (*cytochrome p450 family 17 subfamily a member 1*), que participam da esteroidogênese (58,59).

Variantes patogênicas no *NR5A1* em humanos já foram associadas a insuficiência ovariana primária em indivíduos com cariótipo 46,XX e também a diversas formas de DDS 46,XY, com ampla variabilidade fenotípica. Pode levar a disgenesia gonadal pura (gônadas disgenéticas, genitais internos e externos femininos) e parcial (testículos disgenéticos bilateralmente ou testículo disgenético e

gônada disgenética associados a ambiguidade genital) (2, 7, 60, 61). Em um estudo realizado por Fabri-Scallet e colaboradores (2019) foram identificadas variantes no *NR5A1* em 21 dentre 160 indivíduos com DDS 46,XY (62).

Variantes no *NR5A1* já foram identificadas em indivíduos com DDS-OT 46,XX e DDS XX testicular, sendo a mais comum a p.Arg92Trp (63, 64, 65, 66).

1.3.2.4. Alterações no gene SOX9

SOX9, localizado em 17q24, contém três éxons e codifica um fator de transcrição altamente conservado. Variantes patogênicas de perda de função encontradas em heterozigose no *SOX9* acarretam displasia campomélica [Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) #114290], caracterizada por alterações esqueléticas e, em indivíduos XY, disgenesia gonadal pura (com genitais externos femininos) ou parcial (com ambiguidade genital) (67, 68).

Por sua vez, duplicações em regiões reguladoras *upstream* a *SOX9* já foram identificadas em homens com DDS XX testicular *SRY*-negativo, indicando que este pode desencadear a diferenciação testicular em gônadas XX na ausência de *SRY* (69). Essas duplicações foram observadas em indivíduos com ginecomastia e infertilidade por azoospermia (70, 71, 72) e também em pacientes com ambiguidade genital e DDS-OT (72, 73). Nesses últimos casos, os autores identificaram que as duplicações haviam sido herdadas dos pais.

1.3.2.5. Alterações no gene WT1

O gene *WT1* é um fator de transcrição composto por dez éxons e tem papel no desenvolvimento gonadal e renal. Em indivíduos 46,XY, variantes patogênicas em heterozigose no *WT1* estão associadas à síndrome de Denys-Drash (OMIM #194080), na qual há disgenesia gonadal parcial, ambiguidade genital e alto risco de tumor de Wilms (nefroblastoma) e à síndrome de Frasier OMIM (#136680), na qual há gônadas em fita, genitais internos e externos femininos e alto risco de gonadoblastoma. Em ambas há graves alterações na função renal (74, 75).

Variantes patogênicas em heterozigose no *WT1* também já foram descritas em indivíduos com DDS 46,XX, incluindo gônadas em fita associadas a

glomeruloesclerose segmentar focal (76), DDS XX testicular com ambiguidade genital (77) e DDS-OT (78).

1.3.2.6. Alterações em *WNT4*

O gene *WNT4*, mapeado em 1p36.1, é membro da família WNT e participa da formação dos rins, das gônadas e dos dutos de Müller. Atua nas vias antitesticulares e pró-ovarianas e é expresso nas células pré-granulosas. Sua hiperexpressão em indivíduos 46,XY leva a anomalias gonadais, ambiguidade genital e resquícios dos dutos de Muller e de Wolff (79). Por sua vez, variantes patogênicas bialélicas em indivíduos 46,XX determinam alterações renais, adrenais e pulmonares, além de DDS testicular ou DDS-OT com ambiguidade genital (OMIM # 611812) (80).

1.3.2.7. Alterações em *FOXL2*

O gene *FOXL2* está localizado em 3p22.3, possui apenas um éxon e este codifica um fator de transcrição que apresenta um domínio de ligação ao DNA do tipo *forkhead* (6). Como mencionado anteriormente, *FOXL2* é expresso no início do desenvolvimento ovariano e continua sendo expresso nas células foliculares na vida pós-natal e adulta, promovendo então o desenvolvimento dos folículos ovarianos e sua manutenção durante a vida fértil (2). Variantes patogênicas em *FOXL2* estão associadas à síndrome de Blefarofimose, Ptose e Epicanto Inverso (BPES) (OMIM #110100), caracterizada por malformações palpebrais e insuficiência ovariana primária (81).

1.4. Distúrbios da diferenciação do sexo ovário-testicular

A presença de características físicas femininas e masculinas em um mesmo indivíduo é encontrada, na mitologia grega, na figura de Hermaphroditus, e a primeira menção a ele é feita pelo filósofo da Grécia Antiga Teofrasto. Hermaphroditus nasceu da união entre a deusa Afrodite e o deus Hermes e era extraordinariamente belo. Aos 15 anos de idade, ao se banhar numa fonte, foi observado por uma ninfa chamada Salmacis, que se apaixonou por ele. Tendo sido rejeitada por ele, Salmacis implorou aos deuses que os unissem para sempre; seu pedido foi atendido, e ambos foram unidos em um único indivíduo “com os dois sexos” (82).

Ao contrário dos Gregos, que consideravam crianças com os dois sexos símbolos de beleza física, os Romanos as consideravam mau presságio, e elas eram condenadas à morte (83). Com o passar do tempo, o mundo antigo passou a ver o hermafroditismo como uma excentricidade da natureza (82).

Após o Consenso de Chicago o termo hermafroditismo foi substituído por distúrbio da diferenciação do sexo ovário-testicular (DDS-OT), definido pela presença de tecido ovariano, contendo folículos, e tecido testicular, contendo túbulos seminíferos com ou sem espermatozoides, em um mesmo indivíduo (35). É uma condição rara que faz parte dos distúrbios da diferenciação gonadal.

O DDS-OT tem uma incidência de 1:20.000 nascidos vivos (84). Os casos com cariótipo 46,XX têm maior prevalência na África do Sul e Ocidental (85, 86); entre os DDS com ambiguidade genital, sua frequência varia de 2 a 10% em diversas partes no mundo (87, 88).

Os tecidos ovariano e testicular podem estar presentes em gônadas separadas ou na mesma gônada, denominada ovotestis. A combinação gonadal mais frequente é a de ovotestis com ovário, seguida de ovotestis bilateralmente e de ovário e testículo; nesse último caso, é mais frequente que o testículo esteja do lado direito e o ovário do lado esquerdo (86, 88, 89). Ipsilateral ao ovário observa-se derivados de Müller, e ao lado dos testículos derivados de Wolff; nos ovotestis o predomínio é de derivados dos dutos de Müller. A classificação do DDS-OT pode ser feita de acordo com o tipo e localização das gônadas em lateral (testículo de um lado e ovário do outro), bilateral (ovotestis dos dois lados) e unilateral (ovotestis de um lado e do outro ovário ou testículo normal ou gônada disgenética ou ausência de tecido gonadal) (90).

A análise histopatológica é necessária para confirmação do diagnóstico de DDS-OT; permite, ainda, nos casos com cariótipo 46,XX, descartar que se trate de DDS XX testicular. Neste, antigamente denominado homem 46,XX, há apenas tecido testicular e na maioria dos casos a genitália externa é masculina, com testículos pequenos, azoospermia e hipogonadismo hipergonadotrófico; em uma minoria dos casos pode haver ambiguidade genital (91). A principal causa do DDS 46,XX testicular é um erro durante o *crossing-over* na região pseudoautosômica dos cromossomos sexuais em que o gene *SRY*, situado logo abaixo dessa região, é translocado para o

braço curto do cromossomo X paterno (92, 93). Numa pequena parcela dos casos não há presença do *SRY*; já foi relatada a coexistência de DDS-OT e DDS XX testicular *SRY* (-) em uma mesma família, sugerindo que as duas condições podem ser manifestações diferentes de uma mesma alteração do desenvolvimento gonadal (91).

A presença de ambiguidade genital não é obrigatória entre os casos de DDS-OT, mas está presente em sua maioria (88). Há grande variação fenotípica entre os indivíduos, de genitais femininos típicos a masculinos típicos, passando por diferentes graus de ambiguidade genital. Há ainda ampla variabilidade em relação aos genitais internos de acordo com a composição histológica da gônada e, consequentemente, a secreção de HAM e testosterona na vida embrionária.

Em relação aos genitais externos, é variável o tamanho do falo, a posição do meato uretral e a presença de introito vaginal. Em indivíduos criados no sexo masculino, é frequente a presença de ginecomastia e hematúria cíclica na puberdade. Apesar da função hormonal ovariana ser mais preservada do que a testicular, a produção de andrógenos acarreta o surgimento de caracteres sexuais secundários masculinos. Já foram descritos casos de ovulação e gravidez em indivíduos DDS-OT 46,XX, mas a espermatogênese é rara (90).

De maneira geral, a maioria dos indivíduos possui cariótipo 46,XX, correspondendo a 60% dos casos, e 10% apresentam cariótipo 46,XY com ou sem alterações estruturais no cromossomo Y. Casos de mosaicismo ou de quimerismo 46,XX/46,XY representam 30% (88).

Em 90% dos casos 46,XX não é detectado o gene *SRY*, e são raras as alterações no *SRY* nos casos 46,XY, tanto em sangue periférico quanto em fibroblastos (94, 95, 96, 97, 98, 99, 100). No entanto, a maioria dos estudos utiliza sangue periférico para detecção de *SRY*, e em alguns os resultados foram diferentes quando se analisou o tecido gonadal.

Como já mencionado, em pacientes 46,XX já foram relatadas variantes patogênicas nos genes *NR5A1* e *WT1*, envolvidos no processo de diferenciação gonadal. Também já foi identificada variante no gene *NR2F2* (*NFE2-related factor 2*) (101), além de duplicações envolvendo os genes *SOX9* e *SOX3* (*SRY-related HMG-*

box 3) (102), sendo essas últimas por meio de CMA. Além disso, em casos de DDS-OT 46,XX sindrômico foram detectadas variantes patogênicas bialélicas no gene *RPSO1* (*R-spondin 1*) (103, 104, 105, 106, 107, 108). Ademais, alguns autores já relataram detecção de *SRY* em tecido gonadal de indivíduos 46,XX por meio das técnicas de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) ou imunoistoquímica, como será visto adiante (99, 109, 110). Uma deleção parcial envolvendo o gene *DMRT1* (*doublesex and mab-3 related transcription factor 1*) em indivíduo 46,XY já foi associado ao fenótipo desta condição (103).

1.4.1. A aplicação da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e da imunoistoquímica ao estudo de indivíduos DDS-OT

As técnicas de citogenética molecular têm permitido a identificação, em diferentes células, de anomalias cromossômicas não detectáveis ao exame de cariótipo quando se utiliza apenas as técnicas de bandamento. A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) surgiu no final dos anos 1980 e continua sendo empregada na análise cromossômica para identificação de alterações cromossômicas numéricas e estruturais e localização de regiões específicas nos cromossomos ou tecidos, por meio de sondas de DNA marcadas com fluorescência (111).

Por meio da técnica de FISH é possível identificar linhagens celulares adicionais em outros tecidos, quando o cariótipo em sangue periférico apresenta apenas células com determinada constituição cromossômica, como já demonstrado em pacientes com DDS. Um exemplo é o achado de linhagens 45,X e 46,XY com o uso de sondas específicas para os cromossomos X e Y no tecido gonadal de um indivíduo com cariótipo 46,XY em sangue periférico, cujo quadro clínico era compatível com disgenesia gonadal mista (associada a mosaico 45,X/46,XY) (112).

A técnica de FISH em gônadas também já foi empregada no estudo de um paciente com DDS-OT e cariótipo 46,XX/46,XY. O estudo com sondas centroméricas de X e Y corroborou os achados do cariótipo convencional não só em sangue periférico, mas também em cultura de pele e gônadas. Com exceção da gônada direita, cuja constituição cromossômica era 46,XX, os demais tecidos analisados

apresentaram células contendo dois sinais de X e outras contendo um sinal de X e um de Y. O estudo revelou ainda que se tratava de quimerismo tetragamético (113).

Outro estudo refere-se a um paciente com DDS-OT cujo primeiro cariótipo era 46,XY; a reavaliação por citogenética convencional e FISH em culturas de fibroblastos obtidas a partir de tecido testicular e ovariano revelou o cariótipo 46,XX/46,XY, indicando a presença de quimerismo. Análises moleculares evidenciaram ainda que se tratava de quimera partenogenética (114).

Além da técnica de FISH, a imunoistoquímica também tem sido empregada em estudos de pacientes com DDS. O uso de anticorpos contra SRY levou à detecção dessa proteína em células de Sertoli e células germinativas em oito ovotestis de pacientes 46,XX, sugerindo que mosaicismo ou quimerismo podem ser a causa mais comum de DDS-OT (115).

Técnicas de imunoistoquímica com anticorpos específicos contra os fatores de transcrição SOX9 e FOXL2, necessários para a diferenciação testicular e ovariana, respectivamente, podem também ser empregadas no estudo de pacientes com DDS. SOX9 é detectado em células de Sertoli da vigésima-terceira à trigésima-sétima semana gestacional em meninos e FOXL2 em células da granulosa da vigésima-quarta à quadragésima-primeira semana em meninas. Durante o desenvolvimento embrionário não há expressão de FOXL2 em tecido testicular normal nem de SOX9 em tecido ovariano normal (116).

Salas-Cortés e colaboradores (2001) analisaram a expressão da proteína SRY em diversos estágios do desenvolvimento humano, do período embrionário até a vida adulta. Ao estudar tecido gonadal masculino normal, os autores descreveram a presença do SRY no núcleo das células de Sertoli e das células germinativa de fetos com 26 semanas de gestação, de um menino com um ano de idade e de um homem com 32 anos. Já em pacientes com DDS-OT 46,XX SRY-positivo e gônada do tipo ovotestis, os autores constataram a presença de marcação da proteína SRY no núcleo das células de Sertoli, das células da granulosa, e das células germinativas dos dois tipos de tecido gonadal (117).

Em estudo realizado com dois pacientes com DDS XX testicular e um com DDS- OT 46,XX a técnica de imunoistoquímica com anticorpos contra SOX9 e FOXL2

mostrou expressão de SOX9 no tecido testicular dos três pacientes e do FOXL2 somente no tecido ovariano da paciente com DDS-OT (118). O mesmo pode ser observado em outros estudos, onde se constatou em pacientes com DDS-OT 46,XX e 46,XX/46,XY a expressão de SOX9 em tecido testicular e de FOXL2 apenas em tecido ovariano (119).

Em pacientes com DDS de diversas etiologias, o padrão de marcação de SOX9 e FOXL2 correlaciona-se claramente com a presença de tecidos testicular e ovariano totalmente diferenciados. No entanto, em gônadas disgenéticas (contendo somente estroma ovariano) e em áreas de tecido gonadal indiferenciado, embora a maioria das células seja positiva para FOXL2, células isoladas ou cordões celulares com marcação de SOX9 também podem ser identificados. Também foi observada a presença ocasional da proteína FOXL2 em células localizadas nos túbulos seminíferos de alguns indivíduos com DDS (116).

1.4.2. Análise Cromossômica por *Microarray* (CMA) em indivíduos com DDS-OT

A CMA é uma técnica usada para detecção de alterações cromossômicas estruturais com ganho ou perda no número de cópias e que pode também identificar regiões de perda de heterozigose (LOH). O *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* recomenda o uso de CMA como primeiro teste para detecção de CNVs em indivíduos com atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, autismo e(ou) anomalias congênitas múltiplas (120).

Em DDS, o uso de CMA têm permitido a identificação e caracterização de deleções e duplicações em pacientes 46,XX e 46,XY. Em um estudo com 52 casos de DDS, a CMA possibilitou a identificação de aproximadamente 300 CNVs que incluíam 68 genes já associados a DDS (121). Ademais, CNVs em regiões regulatórias, como as dos genes *SOX3*, *WNT4* e *NR0B1* (*nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1*), têm sido identificadas em pacientes com DDS (122, 123, 124).

Duplicações *upstream* ao gene *SOX9* já foram relatadas em indivíduos com DDS-OT 46,XX *SRY*-negativo, por meio da técnica de CMA. No estudo de Benko e colaboradores (2011) um dos indivíduos apresentava uma duplicação *de novo* de cerca de 605 a 695 kb e o outro uma duplicação de aproximadamente 148 kb. Os

autores concluíram que as duplicações detectadas nesses dois pacientes poderiam ativar o gene *SOX9* em gônadas XX e induzir a diferenciação testicular (125). Um outro relato é o de uma duplicação de 114 kb em 17q24.3 *upstream* ao gene *SOX9*, incluindo sua região promotora, em um paciente com DDS-OT 46,XX (126).

Além de duplicações em *SOX9*, foi descrita em um indivíduo com DDS-OT 46,XX uma deleção *de novo* de 3 Mb em 15q26, causando monossomia parcial dessa região, que engloba os genes *NR2F2* e *SPATA8* (*spermatogenesis associated 8*), três genes não codificantes (*NR2F2-AS1* (*NR2F2 antisense RNA 1*), *SPATA8-AS1* (*SPATA8 antisense RNA 1*) e *miR-1469* (*MicroRNA 1469*) e três pseudogenes (*PGAM1P12* (*phosphoglycerate mutase 1 pseudogene 12*), *RPL31P5* (*ribosomal protein L31 pseudogene 5*) e *FAM149B1P1* (*family with sequence similarity 149 member B1 pseudogene 1*), além de regiões regulatórias contendo 15.000 sítios de ligação para fatores de transcrição, incluindo sítios para *SRY*, *SOX5* (*SRY-related HMG-box 5*) e *SOX9* (101).

Finalmente, em dois pacientes com DDS-OT 46,XY foram detectadas deleções em 9p24.3 incluindo *DMRT1*: uma deleção de aproximadamente 35 kb causando perda dos éxon 3 e éxon 4 desse gene (103) e uma deleção em 9p24.3p23 associada a duplicação 3p26.3p24.3 em uma paciente que apresentava vários distúrbios (127). A haploinsuficiência desse gene vem sendo também descrita em DDS 46,XY com disgenesia gonadal parcial e pura (103).

1.5 Justificativa

A etiologia do DDS-OT ainda é desconhecida na maioria dos indivíduos com cariótipo 46,XX e 46,XY. Estudos mostram que a maioria dos pacientes 46,XX não apresentam o gene *SRY* em sangue periférico e são poucos aqueles em que foram identificadas mutações que levam ao aumento da expressão de genes pró-testiculares ou expressão insuficiente de genes pró-ovarianos (anti-testiculares). Por sua vez, na maioria dos indivíduos 46,XY com DDS-OT não há mutações no *SRY* nem em outros genes responsáveis pela diferenciação testicular.

Em alguns desses pacientes já foi detectada a presença de outra linhagem celular em tecido gonadal levando à diferenciação dos dois tipos de tecido. Assim sendo, é possível que ao menos parte dos indivíduos com DDS-OT 46,XX e 46,XY sejam, na verdade, portadores de mosaicismo ou quimerismo oculto. Portanto, o uso de FISH e(ou) outras técnicas moleculares para identificação de linhagens celulares adicionais nas gônadas pode contribuir para elucidar a etiologia dessas afecções.

Além disso, são poucos os estudos já publicados relacionados à expressão das proteínas SRY, SOX9 e FOXL2 em DDS, particularmente em DDS-OT. Portanto, ainda são necessários estudos adicionais em amostras de tecido gonadal desses pacientes, de modo a ampliar o conhecimento científico a esse respeito.

2. OBJETIVO

Geral:

Aprofundar o conhecimento sobre a etiologia e a fisiopatologia do distúrbio da diferenciação do sexo ovário-testicular em indivíduos com cariótipo normal (46,XX e 46,XY) em que a origem do quadro é indefinida.

Específicos:

- a) investigar a presença de outras linhagens celulares no tecido gonadal (mosaicismo ou quimerismo oculto);
- b) investigar a expressão e localização das proteínas FOXL2, SOX9 e SRY no tecido gonadal;
- c) investigar a presença de desequilíbrios genômicos.

3. MÉTODOS

3.1 Casuística

Dos 408 casos de ambiguidade genital atendidos no ambulatório do Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo (GIEDDS) no Hospital de Clínicas (HC) da Unicamp em cerca de 25 anos (de 1989 a 2011), 21 (5%) apresentavam DDS-OT com diversas constituições cromossômicas (128). Outros dois foram diagnosticados nos anos subsequentes. A esses 23 foram aplicados os seguintes critérios de inclusão:

- ambiguidade genital;
- diagnóstico de DDS-OT estabelecido por meio de exame histopatológico: presença de tecido testicular (com túbulos seminíferos) e ovariano (com folículos ovarianos) na mesma gônada ou em gônadas opostas;
- cariótipo 46,XX ou 46,XY em sangue periférico (ausência de alterações cromossômicas que expliquem o fenótipo);
- estudo prévio do gene *SRY* em sangue periférico, estando este ausente nos pacientes 46,XX e não apresentando mutações nos 46,XY;
- disponibilidade de tecido gonadal incluído em parafina para os estudos de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH), imunoistoquímica e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- e disponibilidade de DNA extraído de sangue periférico para investigação de variações no número de cópias (CNVs) por meio de CMA.

Uma análise inicial da casuística de DDS-OT do GIEDDS revelou que oito pacientes preenchem os critérios de inclusão, sendo seis 46,XX e dois 46,XY (quadro 2). Dentre os pacientes 46,XX, quatro são casos isolados nas famílias, um tem um irmão gêmeo monozigótico com diagnóstico de DDS 46,XX Testicular e outro uma irmã com DDS 46,XX idiopático. Os dois pacientes 46,XY são casos isolados nas famílias.

Também foi selecionado material de um indivíduo com DDS-OT associado a quimerismo 46,XX/46,XY já detectado em sangue periférico para ser usado como controle na técnica de FISH.

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp (CAAE 65249316.0.0000.5404 e 65478617.2.0000.5404) (anexo 2 e 3), foi solicitado ao blocário do HC o levantamento dos blocos com o tecido gonadal incluído em parafina. Os cortes histológicos de cada paciente foram processados no Laboratório de Anatomia Patológica do HC-Unicamp e posteriormente usados nas técnicas de FISH, imunoistoquímica e extração de DNA para a reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR). A técnica de CMA foi realizada a partir do DNA extraído de amostras de sangue periférico no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp.

Quadro 2. Descrição clínica de oito pacientes e um controle.

Indivíduos	Cariótipo	Idade (meses)**	Sexo Inicial	Sexo Final	Falo (cm)	Uretra	TG direito	TG esquerdo	SRY
A1	46,XY	2,7	I	F	0,5	Balânica	Ovotestis	Testículo	Sem mutações
A2	46,XY	19	M	F	2	Perineal	Testículo	Ovário***	Sem mutações
B1*	46,XX	9	M	M	1,5	Penoescrotal	Testículo	Ovotestis	Negativo
B2	46,XX	58	M	F	2,5	Perineal	Testículo	Ovotestis	Negativo
B3	46,XX	2	M	M	3	Peniana	Testículo	Ovotestis	Negativo
B4	46,XX	0,84	I	F	2	Balânica	Testículo	Ovário	Negativo
B5#	46,XX	1,3	I	F	1	Penoescrotal	Testículo	Ovotestis	Negativo
B6	46,XX	18	F	F	2,5	Perineal	Ovotestis	Ovotestis	Negativo
C1	46,XX/46,XY	145	M	M	4	Penoescrotal	Ausente	Ovotestis	NA

idade da primeira avaliação; *irmã com DDS XX idiopático (ovários bilateralmente); # irmão gêmeo com DDS XX testicular (testículos bilateralmente); I: indefinido; NA= não se aplica; SRY: Estudo molecular de SRY em sangue periférico; TG: Tecido Gonadal; *laudo prévio à realização deste trabalho.

3.2 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Para detecção de outras linhagens celulares (mosaicismo ou quimerismo) em tecido gonadal, foi inicialmente empregada a técnica de FISH no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica (LCHC) da FCM - Unicamp. Inicialmente foi utilizado o protocolo descrito pelo laboratório do *Dr. Jeremy Squire*. Além desse, foram testados mais dois protocolos manuais e dois kits específicos para FISH em material parafinado (anexo 1). O teste utilizando o kit *Zytovision* foi realizado no Laboratório de Citogenética do Centro Infantil Boldrini. Todos os protocolos utilizados são descritos a seguir, e em todos eles foram usadas lâminas silanizadas contendo cortes histológicos de 5 µm e sonda X e Y (*CEPX Spectrum green, CEPY Spectrum orange; Vysis, Downers Grove, IL*).

Protocolo do Laboratório do *Dr. Jeremy Squire* do Departamento de Patologia e Medicina Molecular de Queen's University, Kingston, Canadá

As lâminas foram incubadas a 65°C, por 16 horas. Posteriormente, o material foi desparafinado em três lavagens de xilol, 10 minutos cada em temperatura ambiente (TA). Após estarem secas, as lâminas foram lavadas em etanol 100% duas vezes durante 5 minutos cada em TA.

Após estarem secas, as lâminas foram incubadas em HCl 0,2N por 30 minutos em TA; posteriormente em citrato de sódio 10 mM/ EDTA 2mM por 45 minutos a 85°C e em seguida em 2xSSC por 2 minutos em TA. Posteriormente foram incubadas em dH₂O (água destilada) por 10 minutos em TA e em HCl 0,2N por 2 minutos também em TA.

As lâminas foram incubadas em pepsina/0,01N HCl entre 10 a 30 minutos a 37°C. Posteriormente, foram incubadas em dH₂O por 10 minutos em TA e em 2xSSC por 5 minutos também em TA. Foram então desidratadas em série alcoólica 70%, 85% e 100% TA.

A sonda foi aquecida durante 5 minutos a 37°C, agitada em Vortex e centrifugada rapidamente. As lâminas foram aquecidas durante 5 minutos a 45°C e foram

aplicados 10 µL de sonda (*CEPX Spectrum green*, *CEPY Spectrum orange*; Vysis, Downers Grove, IL; *SRY Vysis*, Downers Grove, IL). Foi colocada lamínula de vidro (22x22) sobre o material e esta foi vedada com cola de vinil. A co-denaturação foi realizada em chapa aquecida a 83°C, inicialmente durante 10 minutos. O tempo de co-denaturação foi alterado, variando entre 10 e 15 minutos. As lâminas foram incubadas em câmara úmida durante 16 horas, inicialmente, a 37°C, variando o tempo de incubação em câmara úmida entre 16 horas e 24 horas.

No dia seguinte, foram removidas com cuidado a cola e a lamínula de vidro, e as lâminas foram incubadas em 0,4xSSC/0,3% Tween-20 durante 2 minutos a 72°C. Posteriormente foram lavadas em 2xSSC por 5 minutos em TA. Em seguida, as lâminas foram montadas com 25 µL de DAPI II sobre o material e lamínula de vidro (22x50).

Adaptação do protocolo de FISH em mucosa oral para tecido parafinado

As lâminas foram desparafinizadas de acordo com o protocolo descrito por *Dr. Jeremy Squire Laboratory*. Após a desparafinização, foram colocadas em solução de 2xSSC a 73°C durante 2 minutos, incubadas em solução de pepsina a 37°C durante 40 minutos e lavadas duas vezes em solução de PBS 1x.

Posteriormente, as lâminas foram incubadas em solução de PBS 1x/formaldeído 37% durante 5 minutos em TA, passadas duas vezes em solução de PBS 1x, desidratadas em série alcóolica 70%, 85% e 100% gelada e incubadas em TA até estarem secas.

O material foi desnaturado em solução 2xSSC/formamida 70% a 73°C durante 2 minutos e desidratado em série alcóolica 70%, 85% e 100% gelada.

Foram aplicados 5 µL de sonda (2,5 µL + 2,5 Hy-Buffer) sobre as lâminas e estas foram cobertas com lamínula de vidro (22x22 mm). Posteriormente as lâminas foram colocadas em placa aquecida a 73°C durante 7 minutos e incubadas *overnight* a 37°C.

No dia seguinte, foi removida cuidadosamente a lamínula e as lâminas foram colocadas em solução 2xSSC/0,05% Tween-20 a 37°C durante 5 minutos. Em

seguida, as lâminas foram lavadas em solução 0,4xSSC/0,15% Tween-20 a 73°C durante 2 minutos, posteriormente passadas em 2xSSC/0,05% Tween-20 em TA, e então montadas com 15 µL de DAPI e lamínula de vidro.

Protocolo para FISH em material parafinado do Laboratório de Patologia–
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Primeiramente foi feita a desparafinização do material em quatro banhos de xilol por 10 minutos cada e em seguida quatro banhos de etanol 100% durante 10 minutos cada, ambos em TA. As lâminas foram guardadas em etanol 100% durante um dia.

As lâminas foram incubadas em NaSCN (tiocianato de sódio) a 80°C durante 12 minutos e posteriormente lavadas em dH₂O em TA durante 3 minutos.

Foram colocados 36 mL de HCl 0,1N e 4 mL de solução de pepsina em um borel, e as lâminas foram incubadas nessa solução de pepsina por 12 a 20 minutos a 37°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em dH₂O em TA durante 3 minutos e depois desidratadas em série alcoólica 70%, 85% e 100% durante 2 minutos cada.

Foram aplicados 7 µL de sonda sobre o material, que foi então coberto com lamínula de vidro e vedado com cola de vinil. A co-denaturação foi realizada em placa aquecedora a 80°C durante 10 minutos. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* a 37°C.

No dia seguinte, foram retiradas as lamínulas e as lâminas foram colocadas em *Wash Buffer* I (2xSSC + 0,3% Tween-20) durante 5 minutos em TA. Posteriormente, foram incubadas em *Wash Buffer* a 73°C durante 2 minutos. As lâminas foram então montadas com 15 µL de DAPI e lamínula de vidro.

Kit *Aquarius Tissue Pretreatment* (Cytocell - RU-LPS100)

Foi utilizado o protocolo descrito pelo fabricante:

Primeiramente foi feita a desparafinização das lâminas em três lavagens em xilol durante dez minutos. Posteriormente foram lavadas duas vezes em etanol 100% durante dois minutos e em duas lavagens em etanol 70% durante dois minutos.

As lâminas foram colocadas em solução de pré-tratamento a 100°C durante 15 minutos e depois lavadas duas vezes em dH₂O por 3 minutos cada.

Foram aplicados sobre o material 200 µL de enzima e as lâminas ficaram em TA durante 10 a 30 minutos. Foram então lavadas 3 vezes em dH₂O durante 2 minutos e desidratadas em série alcoólica 70%, 85% e 100% durante dois minutos cada.

Posteriormente, foram aplicados 7 µL de sonda sobre o material, que foi então coberto com lamínula de vidro e selado com cola de vinil. As lâminas foram colocadas a 37°C durante 10 minutos. A co-denaturação foi feita em placa aquecedora a 75°C durante cinco minutos. As lâminas foram incubadas *overnight* em câmara úmida a 37°C.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em solução 0,4xSSC a 72°C durante dois minutos e posteriormente em solução 2xSSC/0,05% Tween-20 por trinta segundos em TA. Foram então montadas com 15 µL de DAPI e lamínula de vidro.

Protocolo FISH em material parafinado - Kit Zytovision

Inicialmente as lâminas com corte histológico foram incubadas por 10 minutos a 70°C. Posteriormente foi realizada a desparafinização com dois banhos de xilol em TA durante 10 minutos cada. As lâminas foram incubadas durante 5 minutos cada em etanol 100% (duas vezes), etanol 90% e etanol 70%, e lavadas duas vezes durante 2 minutos cada em água deionizada.

As lâminas foram então incubadas em solução *Pre Treatment Solution Citric* durante 15 minutos a 98°C. Posteriormente foram lavadas duas vezes durante dois minutos em água deionizada. Foram aplicadas 3 gotas de *Pepsina Solution* sobre o material e este foi incubado durante 15 minutos a 37°C. As lâminas foram lavadas em *Wash Buffer* durante 5 minutos e em dH₂O por 1 minuto. O material foi desidratado em série alcoólica 70%, 90% e 100% durante 1 minuto cada. Foram aplicados 4 µL da sonda sobre o material e este foi coberto com lamínula e selado com cola de vinil. A co-denaturação foi feita em placa aquecedora a 75°C durante 10 minutos. A lâmina foi incubada *overnight* em câmara úmida a 37°C.

No dia seguinte, foram feitas três lavagens em Wash Buffer, sendo a primeira lavagem durante 2 minutos a 37°C e as seguintes durante 5 minutos cada em TA. O material foi desidratado em série alcoólica 70%, 90% e 100% durante 1 minuto cada. A lâmina foi seca em TA, foram aplicados 10 µL de DAPI e o material foi coberto com lamínula de vidro.

3.3. Extração de DNA em tecido parafinado

Outra estratégia para detecção de sequências de Y nos indivíduos 46,XX foi a extração de DNA de tecido gonadal parafinado seguido de PCR para amplificação dessas sequências. Para extração de DNA foi utilizado o kit *Q Amp mini kit - Qiagen* seguindo protocolo utilizado no Laboratório de Patologia da UNIFESP. Primeiramente foram preparadas 10 lâminas de cada paciente com cortes de 5 µm cada. Foi selecionada a região de interesse utilizando lâmina de vidro; nesse processo, foram descartadas as bordas de cada corte para evitar resultados falso positivos, visto que o funcionário responsável em fixar os tecidos era do sexo masculino. Após a seleção da região de interesse, esta foi retirada da lâmina com auxílio de lâmina de barbear e o material foi colocado em microtubo de 1,5 mL.

A desparafinização do material foi feita adicionando 1 mL de xilol ao microtubo, que foi passado no vortex durante 5 segundos e centrifugado a 16000 rpm durante 5 minutos. Foi desprezado o sobrenadante e acrescentado 1 mL de etanol absoluto, sendo o microtubo passado no vórtex por 5 segundos e centrifugado a 16000 rpm durante 5 minutos; essa etapa foi realizada duas vezes. Foi retirado o sobrenadante e o microtubo foi incubado com a tampa aberta a 37°C até que o etanol evaporasse totalmente.

Após a evaporação do etanol foram adicionados 180 µL de tampão ATL para ressuspender o *pellet* e acrescentados 20 µL de proteinase K (30mg/µL). O microtubo foi então passado no vórtex por 5 segundos e incubado *overnight* a 56°C.

Posteriormente foram acrescentados 200 µL de tampão AL; o microtubo foi então passado no vórtex durante 15 segundos e incubado a 70°C por 10 minutos. Foram adicionados 200 µL de etanol absoluto e o microtubo foi passado no vórtex durante 15 segundos; todo o conteúdo foi transferido para a coluna do kit e centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto. Foi então trocado o tubo da coluna e

adicionados 500 µL de tampão AW1, seguindo-se centrifugação a 8000 rpm durante 1 minuto. Foi trocado o tubo da coluna novamente, adicionados 500 µL de tampão AW2, e foi feita nova centrifugação a 14000 rpm por 3 minutos. Foi mais uma vez trocado o tubo da coluna e feita centrifugação por mais 1 minuto para que fosse retirado todo o excesso da solução.

A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e foram adicionados 50 µL de tampão AE, permanecendo em TA durante 1 minuto. O material foi centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto e a coluna foi descartada. Após a extração o DNA foi quantificado no *Epoch* (BioTek) e armazenado a -15°C/-20°C.

3.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR para detecção de sequências presentes em Yp e no centrômero de Y foi realizada no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp, conforme o protocolo padronizado no laboratório.

Inicialmente foram feitas três reações de PCR convencional utilizando os *primers* descritos no quadro 3. Foram selecionadas três regiões: TSPY (engloba o gene *TSPY* (*testis specific protein Y-linked 1*), localizado em Yp11.2), XES (engloba o gene *SRY* localizado em Yp11.3) e DYZ3, que amplifica uma sequência centromérica do cromossomo Y. Os primers para essa reação da PCR convencional foram denominados primers externos.

Quadro 3. Sequência de *primers* usados na PCR convencional.

Primers	Sequência	amplicon
<i>Primer XES 10</i>	5' GTG TTG AGG GCG GAG AAA T 3'	780pb
<i>Primer XES 11</i>	5' CAC AAA CAT AGG CAG GCT CA 3'	
<i>Primer TSPY 56</i>	5' GA TAG GCC TCC ACT TCA TA3'	1300pb
<i>Primer TSPY 52</i>	5' GAT GAC ATA ATG GCG GAG 3'	
<i>Primer DYZ3 A</i>	5' TGA AAA CTA CAC AGN AAG CTG 3'	1100pb
<i>Primer DYZ3 B</i>	5' ACA CAT CAC AAA GAA CTA TG 3'	

Em todas as reações foram utilizados controle positivo masculino (46,XY), controle negativo feminino (46,XX) e controle branco. Os protocolos utilizados são descritos a seguir:

- *Primer* XES 10/XES 11: 18,2 μL H_2O , 2,5 μL *Buffer*, 0,7 μL MgCl_2 , 1 μL dNTP 2mM, 0,7 μL *Primer* 1, 0,7 μL *Primer* 2, 0,2 μL Taq, 1 μL DNA. O ciclo utilizado foi:

	98°C – 5'		
35 ciclos	{ 94°C – 45''		
		{ 60°C – 30''	
			72°C – 1'
			72 °C – 5'
	Hold 4° C		

- *Primer* TSPY 56/TSPY 52: 17,2 μL H_2O , 2,5 μL *Buffer*, 0,8 μL MgCl_2 , 1,5 μL dNTP 2mM, 1 μL *Primer* 1, 1 μL *Primer* 2, 0,2 μL Taq, 0,8 μL DNA. O ciclo utilizado consiste em:

	98°C – 5'		
30 ciclos	{ 95°C – 1'		
		{ 56°C – 1'	
			72°C – 1'
			72 °C – 5'
Hold 4° C			

- *Primer* DYZ3 A/ DYZ3 B: 14,1 μL H_2O , 2 μL *Buffer*, 0,5 μL MgCl_2 , 1 μL dNTP 2mM, 0,7 μL *Primer* 1, 0,7 μL *Primer* 2, 0,2 μL Taq, 0,8 μL DNA, respectivamente. O ciclo utilizado consiste em:

98°C – 5'
 30 ciclos { 95°C – 1'
 58°C – 1'
 72°C – 1'
 72 °C – 5'
 Hold 4° C

A amplificação foi realizada em termociclador, e posteriormente os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1 %, corados com brometo de etídio e fotografados em um fotodocumentador.

Nos casos em que não ocorreu amplificação, foi realizada *nested* PCR. Este consiste em uma amplificação utilizando primers internos para os primers da primeira reação e o produto da PCR realizada anteriormente (quadro 4), garantindo uma amplificação mais específica da região. Sendo assim foram utilizados primers internos para *SRY* e *TSPY* (sequências localizadas em Yp) e para *DYZ3* (sequência localizada em região centromérica do cromossomo Y). A representação esquemática dos primers utilizados na PCR convencional e no *nested* PCR podem ser visto na figura 5.

Quadro 4. Sequência de primers usados no *nested* PCR.

Primers	Sequência	amplicon
<i>Primer SRY 1</i>	5' CAT CGA CCA GTG TGA AAC GGG AG 3'	
<i>Primer SRY 4</i>	5' CAT TGT CGA CGT ACA ACC CTG TTG TC 3'	380pb
<i>Primer TSPY 35</i>	5' CCC CAC CTA GAC CGC AGA GG 3'	
<i>Primer TSPY 30</i>	5' GGG AAG AAG CCT AAG AGC ACC 3'	608pb
<i>Primer DYZ3 G</i>	5' AGG CTT TTG TGG CCT ACG 3'	
<i>Primer DYZ3 H</i>	5' ATC CTC CTG GAG ATA CCA 3'	330pb

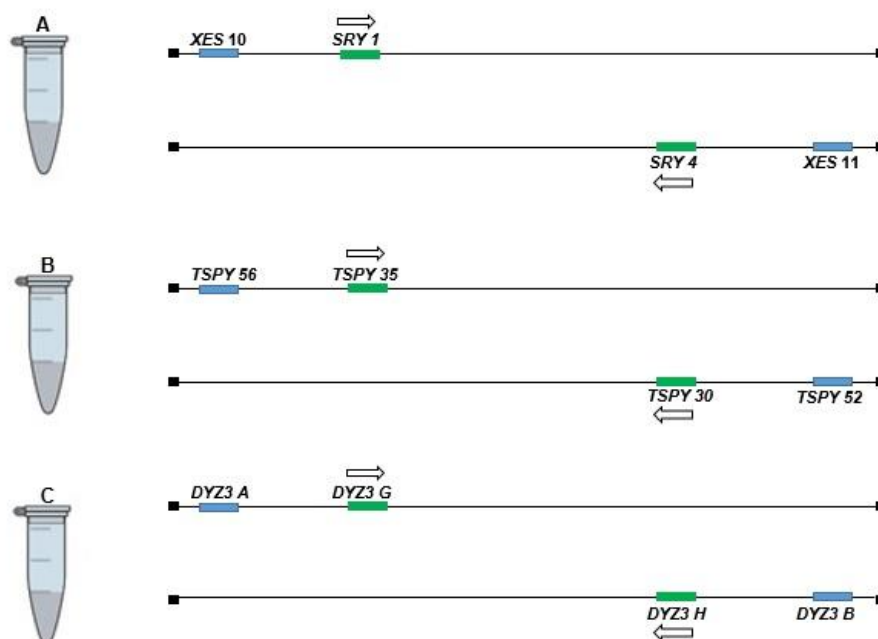


Figura 5. Representação esquemática da PCR convencional e do *nested* PCR. O retângulo azul representa os primers utilizados na PCR convencional (XES 10/11, TSPY 56/52 e DYZ3 A/B) e o retângulo verde representa os primers internos (SRY 1/4, TSPY 35/30 e DYZ3 G/H) usados no *nested* PCR. Inicialmente é realizada a PCR convencional e posteriormente o *nested* PCR, utilizando o produto da primeira PCR.

O protocolo utilizado foi o mesmo descrito anteriormente; a única alteração foi a substituição de DNA pelo produto da PCR e a substituição dos *primers*. Em todas as reações foram utilizados controle positivo masculino (46,XY), controle negativo feminino (46,XX) e controle branco. Após a amplificação, os produtos foram visualizados em gel de agarose a 1 %, corados com brometo de etídio e fotografados em um fotodocumentador.

3.3.2. Análise cromossômica por *microarray* (CMA)

A técnica de Análise Cromossômica por *microarray* (CMA) foi previamente padronizada no Laboratório de Citogenética e Citogenômica Humana da FCM/UNICAMP e foi realizada utilizando os chips CytoScan 750K (pacientes A2, B1

e B5) e HD Array (Affymetrix®) (B2, B3, B4 e B6), e o kit de reagentes compatível - Reagent Kit Bundle (Affymetrix®). A técnica foi feita de acordo com as recomendações do fabricante e consiste nas seguintes etapas:

Digestão do DNA:

- Foram adicionados DNA dos pacientes e DNA dos controles em uma placa de 96 poços com a solução de digestão (em um tubo de 1,5 ml acrescentar 11,55 µl de água livre de nuclease (Chilled Affymetrix® Nuclease-Free Water), 0,2 µl de BSA 100X, 2,0 µl de tampão da Nspl10X e 1,0 µl enzima Nspl para cada reação. Em seguida, a placa foi selada e colocada no vórtex três vezes, posteriormente foi centrifugada a 2000 rpm por um minuto. A reação foi incubada em termociclador nas seguintes condições:

37°C – 2 horas
65°C – 20 minutos
Hold 4°C

Ligação:

- Em um tubo de 1,5 ml foram adicionados 0,75 µl de adaptador Nspl 50 µM, 2,5 µl tampão da DNA Ligase T4 10X e 2,0 µl da enzima DNA Ligase T4. Em seguida, os tubos foram colocados no vórtex três vezes. Foram distribuídos 5,25 µl da solução em cada poço da placa. A placa foi selada novamente e colocada no vórtex três vezes e centrifugada a 2000 rpm durante um minuto. A placa foi incubada em termociclador nas seguintes condições:

16°C – 3 horas
70°C – 20 minutos
Hold 4°C

Amplificação dos fragmentos por PCR:

- As amostras foram diluídas em 75 µl de água livre de nuclease (Chilled Affymetrix® Nuclease-Free Water) e transferidas 4 alíquotas de 10 µl de cada amostra para outra placa de PCR. Em um tubo de 50 mL, foi preparada uma solução contendo 39,5 µl de água livre de nuclease, 20,0 µl de reagente GC-Melt, 14,0 µl de dNTP, 4,5 µl de iniciador (PCR Primer 002), 10,0 µl tampão da Taq TITTANIUM™ 10X, 2,0 µl da enzima Taq DNA Polimerase TITTANIUM™ 50X. A solução foi colocada no vórtex

três vezes e em cada poço da placa foram distribuídos 90 µl dessa solução. A placa foi selada, passada no vórtex três vezes e centrifugada a 2000 rpm por um minuto. Posteriormente, a placa foi incubada em termociclador nas seguintes condições:

	94°C – 3 minutos	
30 ciclos	{	94°C – 30 segundos
		60°C – 45 segundos
		68°C – 15 segundos
		68°C – 7 minutos
		Hold 4°C

Purificação dos produtos de PCR:

- Após incubação em termociclador, os 4 produtos de PCR de cada amostra foram transferidos para tubos de 1.5 mL correspondentes. Adicionou-se 720 µl do reagente Purification Beads em cada amostra. Os tubos foram tampados e misturados por inversão, em seguida foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 16.100 rcf durante três minutos e transferidos para um suporte magnético (MagnaRack™). Foi retirado e descartado o sobrenadante com auxílio de micropipeta e adicionado 1,0 ml do tampão de lavagem (Purification Wash Buffer) em cada amostra. Os tubos foram colocados no vórtex por dois minutos e centrifugados a 16.100 rcf durante três minutos. Posteriormente, os tubos foram colocados no suporte magnético e foi retirado o sobrenadante. Os tubos foram centrifugados a 16.100 rcf por 30 segundos e com o auxílio de uma micropipeta, foram retirados os resíduos do tampão de lavagem. Os tubos ficaram destampados em temperatura ambiente por dez minutos. Foram adicionados 52 µl do tampão de eluição às amostras e colocadas no vórtex durante dez minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 16.100 rcf por três minutos e colocados novamente no suporte magnético por dez minutos. Com auxílio da micropipeta, foram transferidos 47 µl de cada amostra para os poços correspondentes da placa de 96 poços. A placa foi selada, colocada no vórtex três vezes e centrifugada a 2.000 rpm por um minuto.

Fragmentação:

- A etapa de fragmentação foi realizada com a placa sobre o bloco de refrigeração em gelo. Inicialmente, foi preparada a solução de fragmentação um tubo de 1,5 ml. Para

isso, foram adicionados 122,4 µl de água livre de nuclease (Chilled Affymetrix® Nuclease-Free Water); 7,2 µl de reagente de fragmentação (2.5 U/µl); 158,4 µl de tampão de fragmentação. Com auxílio da micropipeta, foram adicionados 10 µl da solução em cada poço correspondente da placa. A placa foi selada, colocada no vórtex três vezes e centrifugada a 4°C a 2.000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente, a placa foi incubada em termociclador nas seguintes condições:

37°C – 35 minutos

95°C – 15 minutos

Hold 4°C

Pré-marcação:

- A etapa de pré-marcação também foi realizada com a placa sobre um bloco de refrigeração em gelo. Preparou-se a solução de pré-marcação em um tubo de 1,5 ml contendo os reagentes: 2,0 µl de reagente de marcação do DNA (30 mM DNA Labeling Reagent), 14,0 µl de tampão da TdT 5X e 3,5 µl de enzima TdT. Foram adicionados 19,5 µl em cada poço correspondente da placa. A placa foi selada, colocada no vórtex três vezes e centrifugada a 4°C a 2.000 rpm durante 1 minuto. A placa contendo a reação foi incubada em termociclador nas seguintes condições:

37°C – 4 horas

95°C – 15 minutos

Hold 4°C

Hibridação:

- Cada amostra foi hibridada em um *Chip CytoScan 750K* ou *HD Array (Affymetrix®)*. Preparou-se a solução da hibridação em um tubo de 1,5 ml com 165,0 µl de tampão de hibridação I, 15,0 µl de tampão de hibridação II, 7,0 µl de tampão de hibridação III, 1,0 µl de tampão de hibridação IV e 2,0 µl do reagente *Oligo Control 0100*. Foram distribuídos 190 µl nos poços correspondentes de cada amostra. A placa foi selada, colocada no vórtex três vezes e centrifugada a 2.000 rpm durante 1 minuto. Em seguida, ocorreu a incubação da reação em termociclador nas seguintes condições: 95°C durante 10 minutos, e mantidas em seguida a 49°C. Sem retirar a placa do termociclador, utilizou-se uma micropipeta para transferir 200 µl de cada amostra nos *chips* correspondentes. Os septos dos chips foram vedados com adesivo e colocados

no forno de hibridação (*GeneChip® Hybridization Oven 640; Affymetrix Inc.*) a 50°C por 18 horas a 60 rpm.

Lavagem e marcação:

- Com auxílio da micropipeta, foi removido o conteúdo do chip e substituído por 200 µl de tampão do array (*Array Holding Buffer*). Cada chip foi inserido na estação de lavagem (*GeneChip® Fluidics Station 450; Affymetrix Inc.*), onde ocorreram as etapas de remoção do excesso de marcador, coloração e escaneamento.

3.3.3. Análise e interpretação dos resultados de CMA

A análise das imagens e dos dados gerados foi feita utilizando o software específico *Chromosome Analysis Suite (ChAS)* (*Affymetrix®*). As alterações detectadas nas amostras dos pacientes foram comparadas com 117 controles compostos por indivíduos da população geral brasileira e 2.421 controles da base de dados interna da Affymetrix (aDGV - *Affymetrix Database of Genomic Variants*) disponível no ChAS. Posteriormente as alterações foram comparadas com a base de dados DGV (*Database of Genomic Variants*).

A análise e interpretação dos resultados foram realizadas seguindo protocolo do Laboratório de Citogenética/FCM, adaptado a partir de revisão da literatura (129 a 137), de acordo com as recomendações do *American College of Medical Genetics* (ACMG) e do Grupo Europeu de Genética Humana.

- Etapa 01: verificação dos parâmetros de qualidade através do software *Chromosome Analysis Suite (ChAS)* (*Affymetrix®*), analisando os seguintes parâmetros:
 - SNPQC (*Single Nucleotide Polymorphism Quality Control*): ≥ 15 ;
 - MAPD (*Median Absolute Pairwise Difference*): $\leq 0,25$
 - Waviness (*Waviness Standard Deviation*): $\leq 0,12$
- Etapa 02: estabelecimento do número mínimo de sondas de cada filtro. Para detecção de deleção foi selecionado um filtro de no mínimo 25 sondas consecutivas, e no mínimo 50 sondas consecutivas para duplicação. Para alterações em mosaico, foi selecionado o filtro de

5.000 marcadores, tanto para deleções como para duplicações, e para perda de heterozigose (LOH) no mínimo 500 marcadores e tamanho de 1.500 kb.

- Etapa 03: verificou-se se havia alterações maiores que ~ 500 Kb em regiões de desequilíbrios genômicos recorrentes e bem estabelecidos como patogênicos. Foi realizada a comparação entre os dados clínicos do paciente com os descritos na literatura (DECIPHER, OMIM, GeneReviews ou artigos de revisão).
- Etapa 04: para cada desequilíbrio genômico encontrado, verificou-se a “confiabilidade” da alteração identificada pelo programa ChAS, principalmente para as alterações muito pequenas. Nessa etapa, foi analisado o número de marcadores destruídos dentro da região do desequilíbrio, com o objetivo de verificar se a cobertura e distribuição estavam boas ou não. Essa verificação foi realizada checando os gráficos de *Log2 Ratio* para averiguar se a alteração realmente existia e se a alteração foi confirmada pelos oligonucleotídeos de SNPs.
- Etapa 05: após a análise inicial, as alterações que não foram classificadas como patogênicas e nem benignas, foram interpretadas utilizando o no *UCSC Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/>). Para isso foi realizada a seguinte configuração:
 - Foi selecionada a versão do genoma (Human assembly) hg19, de acordo com a versão do chip utilizado;
 - Os genes presentes na região da CNV foram avaliados quanto a função, padrão de expressão e mutações associadas a condições patogênicas, através das seguintes bases de dados: ClinGen CNVs (<https://clinicalgenome.org/>), OMIM Genes (<https://www.omim.org/>), DECIPHER (www.deciphergenomics.org/browner);
 - Verificou-se se havia genes OMIM dentro da região alterada, e se incluía éxons.
 - No DGV (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) foi verificado se a alteração já havia sido descrita. Se sim, foi analisado se era uma alteração frequente ou rara. Foram consideradas alterações frequentes aquelas presentes em mais de 1% dos indivíduos no DGV. Foram consideradas raras aquelas ausentes no DGV ou encontradas em menos de dois

indivíduos e em menos de dois estudos diferentes (133). No DGV também foi observada a sobreposição da região alterada com os controles. Em caso de não ocorrer 100% de sobreposição, verificou-se se havia genes na região sem sobreposição, se sim, a alteração não pôde ser considerada como uma mesma alteração;

- Nas bases de dados clínicos (DECIPHER e ClinGen), verificou-se se a alteração já havia sido descrita. Se sim, conferiu-se se o paciente descrito na base de dados apresentava outras alterações e se eram classificadas como patogênicas ou não. Também foi realizada a comparação do fenótipo entre os pacientes e os casos descritos nas bases de dados, e se as alterações tinham tamanho igual ou menor;

Após as etapas de análise, as alterações foram classificadas em cinco diferentes classes, seguindo os critérios estabelecidos na literatura (131 a 133):

- Benignas: variantes comuns encontradas em mais de 1% da população geral;
- Provavelmente benignas: variantes raras, porém sem genes em sua extensão ou que compreendem regiões intrônicas. Alteração descrita em um número pequeno de casos ($\leq 1\%$), com pelo menos dois indivíduos em dois estudos depositados em bases de dados da população;
- Variante de significado clínico incerto (VOUS): variantes raras, não detectadas em controles (interno e DGV) e que não foram descritas previamente em outros pacientes com quadro clínico semelhante, podendo incluir éxons ou genes sem função definida, não relacionados a doenças.
- Provavelmente patogênicas: variantes raras, não descritas nos controles, com pontos de quebra sobrepostos parcialmente a outros indivíduos com fenótipo anormal. Ademais, variantes descritas em um indivíduo com fenótipo semelhante e que incluem éxons de genes relacionadas a doenças.
- Patogênicas: variantes bem estabelecidas na literatura, descritas em dois ou mais casos com fenótipo semelhante. No geral, são alterações maiores que 3 a 5 Mb, incluindo vários genes.

Além da análise descrita acima, com foco em diagnóstico, foi realizada também uma análise com filtros de apenas 10 sondas (para duplicação e deleção) para chamada de CNVs, com objetivo de identificar CNVs menores potencialmente

relacionadas ao fenótipo. Após aplicação desses filtros foi realizada a inspeção visual dos gráficos de Log2Ratio e SNPs, das regiões dos genes *SOX3*, *SOX9*, *SOX10*, *WNT4*, *RSPO1*, *NR5A1* e *DMRT1*, considerando o intervalo de 1 Mb *upstream* e *downstream* de cada gene.

3.4. Coloração de HE

A coloração de HE foi realizada para auxiliar na confirmação e identificação dos túbulos seminíferos em tecido testicular, e dos folículos ovarianos em tecido ovariano.

As lâminas contendo cortes histológicos de 4 µm foram desparafinizadas em estufa a 60°C durante 20 minutos. Posteriormente, foram incubadas em solução de Xilol (I e II, durante 5 minutos cada) e em seguida foi realizada hidratação, sendo passadas em série alcoólica (100%, 80%, 70% e 50%) e incubadas em água corrente durante 5 minutos.

As lâminas foram então incubadas em hematoxilina durante 3 minutos, em água corrente durante 5 minutos, em eosina durante 7 minutos, e passadas em água corrente três vezes. Foram desidratadas em série alcoólica (50%, 70%, 80% e 100%) durante 5 minutos cada e a fixação do corante foi realizada em duas lavagens em xilol durante 5 e 10 minutos, respectivamente. A montagem das lâminas foi realizada utilizando *Entellan neu* (Merck, 1.07961, Darmstadt, Alemanha) e lâminula de vidro.

3.5. Imunoistoquímica

Para detecção das proteínas SRY, SOX9 e FOXL2 em tecido gonadal dos pacientes foi realizada a técnica de imunoistoquímica no Laboratório de Patologia do Centro de Investigação em Pediatria - CIPED/ UNICAMP, com a colaboração do Prof. Dr. José Vassallo e do biomédico Paulo Latuf Filho.

Os anticorpos utilizados foram SRY (mouse monoclonal, ab135239; Abcam, Cambridge, MA, USA), SOX9 (mouse monoclonal, ab76997; Abcam, Cambridge, MA, USA) e FOXL2 (goat polyclonal, ab5096; Abcam, Cambridge, MA, USA). Todas as

reações foram feitas com controle negativo e controle positivo (FOXL2: ovário/ SRY: testículo/ SOX9: cólon), seguindo o mesmo protocolo utilizado nas lâminas dos pacientes.

Dia 1

As lâminas silanizadas contendo cortes histológicos de 4 µm foram incubadas a 100°C durante 25 minutos. Posteriormente foi realizada a desparafinização em dois banhos de xilol a 100°C durante 10 minutos cada e um banho de xilol em TA durante 10 minutos. As lâminas foram passadas em etanol em TA durante 30 segundos. Em seguida foram feitas três lavagens em etanol absoluto, etanol 70% e etanol 50%. As lâminas foram incubadas em água corrente durante 5 minutos.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feita com H₂O₂ 3% (água oxigenada 10 vol) com três trocas de 10 minutos cada. Posteriormente foram incubadas em água corrente e em solução salina tamponada com fosfatos (*PBS-phosphate buffered saline*) 10mM pH 7.4 por 5 minutos.

Para recuperação antigênica as lâminas foram colocadas em panela a vapor por 30 minutos a 95°C, em Tampão Citrato 10 mM pH 6.0 para FOXL2 e Tampão Tris-EDTA (pH=9.0) para SRY e SOX9.

O bloqueio de proteínas de membrana foi realizado com solução de leite Molico® Ca⁺ a 3% em água destilada, por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido (quadro 5), em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% por 18-24 horas a 4°C em câmara úmida.

Quadro 5. Titulação dos anticorpos e padrão de positividade.

FOXL2 (núcleo)	SOX9 (núcleo)	SRY (núcleo e citoplasma)
1:1000	1:150	1:300

Dia 2

Foram feitas 3 lavagens em PBS 1x em TA durante 5 minutos cada. Para o anticorpo FOXL2, após a lavagem em PBS 1x foi aplicado o anticorpo secundário *anti-goat* e incubado durante 2 horas a 37°C.

Posteriormente, para os três anticorpos, foi aplicado o *Sistema Advance* (ADVANCE / HRP, Rb/Mo - Agilent Technologies) e as lâminas foram incubadas em TA durante 30 minutos, sendo então lavadas em PBS 1x (três lavagens, durante 5 minutos cada). Posteriormente foi aplicado novamente o *Sistema Advance* e a seguir as lâminas foram lavadas em PBS 1x.

Foi aplicado DAB (*Liquid DAB+ Dako Omnis*) e as lâminas foram incubadas por 5 minutos. A contra-coloração foi feita com hematoxilina durante 40 segundos. As lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos, passadas em amônia 1% e lavadas em água corrente. Depois de estarem secas, foram passadas três vezes em etanol absoluto e três vezes em xilol. A montagem das lâminas foi feita utilizando *Entellan neu* (Merck, 1.07961, Darmstadt, Alemanha).

Todas as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico comum pelos autores e os resultados foram classificados em negativo (-), baixo positivo (+), correspondendo a marcações fracas, e positivo (++)

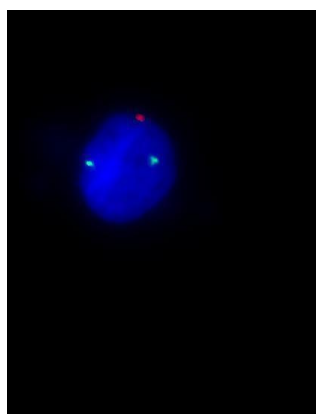
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Busca de mosaicismo ou quimerismo oculto

4.1.1. Técnica de FISH

Para identificação de linhagens celulares adicionais (mosaicismo ou quimerismo oculto) em tecido gonadal, a técnica de FISH foi inicialmente realizada por meio do protocolo descrito pelo laboratório do *Dr. Jeremy Squire*, variando o tempo de desparafinização, incubação na pepsina, co-denaturação e hibridação. Como mencionado na seção de Métodos, após várias tentativas infrutíferas foram testados outros protocolos manuais e dois *kits* próprios para FISH em material parafinado. Nos protocolos manuais também foram testadas variações nas etapas de desparafinização, tempo de incubação em pepsina, co-denaturação e hibridação (anexo 1). Entretanto, mais uma vez não foram obtidos resultados.

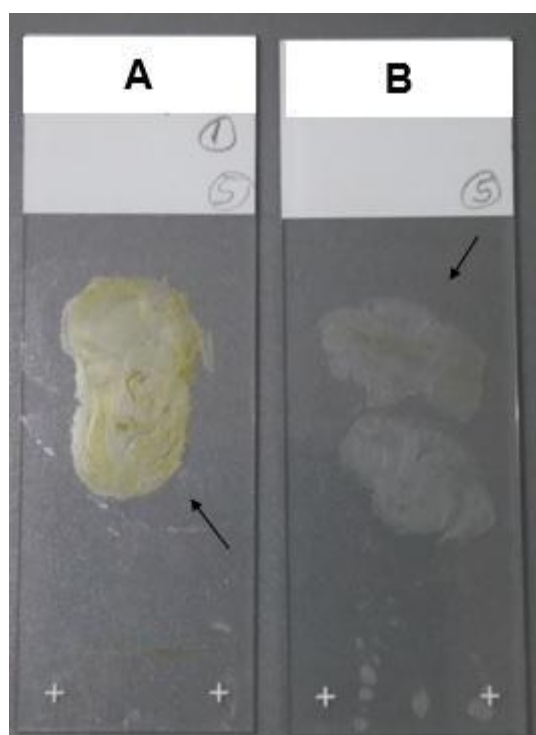
Com o objetivo de identificar se o problema se encontrava nos protocolos ou nos tecidos incluídos em parafina, foi realizada FISH em uma biópsia de 2018 de um paciente com DDS-OT 47,XXY, seguindo o protocolo utilizado no Laboratório de Patologia da Unifesp e utilizando sondas CEP X/CEP Y. Logo na primeira tentativa foi possível visualizar duas marcações verdes (correspondendo ao cromossomo X) e uma marcação vermelha (correspondendo ao Y) nos núcleos, indicando cariótipo 47,XXY, sendo o mesmo observado em sangue periférico (figura 6).



Marcações verdes: sonda CEP X. Marcação vermelha: sonda CEP Y.

Figura 6. Resultado de FISH em paciente controle. FISH em tecido gonadal incluído em parafina com sondas CEP X/CEP Y de paciente 47,XXY em sangue periférico.

Além do uso de diferentes protocolos, também foram feitos contatos pessoais com profissionais experientes na área a respeito das dificuldades inerentes ao emprego dessa técnica em tecido parafinado. Todos relataram dificuldade em conseguir resultados utilizando esse tipo de material. Dessa troca de informações concluímos que o ponto crucial para obtenção de resultados de FISH em tecido incluído em parafina é a etapa de fixação do tecido; esta depende do fixador utilizado, e é necessário respeitar o tempo de cada etapa de fixação. Podemos observar que a maioria dos tecidos parafinados selecionados para o projeto foram super-fixados (figura 7), o que provavelmente prejudicou a realização do método de FISH.



Lâmina A: tecido com coloração amarelada (super-fixado). Lâmina B: tecido com aspecto adequado para realização de FISH.

Figura 7. Imagem comparando a qualidade dos cortes histológicos entre os pacientes. Lâminas silanizadas com cortes de 5 μ m de dois pacientes com DDS-OT.

A técnica de FISH é ideal para identificar linhagens celulares adicionais tecido-específicas. Por ser uma condição rara, são poucos os trabalhos na literatura que descrevem a presença de mosaicismo ou quimerismo oculto por meio de FISH em

pacientes com DDS-OT (113, 114). Nesses trabalhos, porém, não foram relatadas dificuldades na obtenção de resultados por meio dessa técnica, o que pode se dever a melhor qualidade no processo de parafinização.

De todo modo, neste trabalho não foi possível atingir o objetivo de pesquisar a presença de outras linhagens celulares restritas ao tecido gonadal por meio de FISH. Quando são estudadas condições raras, como o DDS-OT, com casuísticas que incluem pacientes atendidos há muitos anos, cujas biópsias passaram por um processo de parafinização que pode não ser o ideal. Por outro lado, em serviços universitários voltados para a pesquisa em doenças raras é importante aprimorar o processo de inclusão dos tecidos em parafina visando a realização de estudos futuros.

4.1.2. Pesquisa de sequências de Y em pacientes 46,XX por PCR

Uma vez que não houve sucesso no emprego da técnica de FISH em tecido gonadal incluído em parafina, foi realizada a PCR com *primers* específicos para sequências do cromossomo Y utilizando DNA extraído desse mesmo tecido de três dos pacientes com cariótipo 46,XX (2B, 5B e 6B), e dos dois pacientes 46,XY (A1 e A2), usados como controles. Nas reações foram incluídos ainda o DNA de sangue periférico de homem normal (46,XY, controle positivo) e o de mulher normal (46,XX, controle negativo), e o DNA extraído de tecido incluído em parafina oriundo dos ovários de duas mulheres gonadectomizadas (controles negativos das reações) e dos testículos de dois pacientes 46,XY com insensibilidade total a andrógenos (controles positivos).

Após a extração de DNA de material parafinado, foi realizada a quantificação para determinar a concentração das amostras usando Epoch Biotek, que quantifica através do comprimento de ondas. A concentração obtida de DNA dos pacientes variou de 0,8 ng/ul a 17,4 ng/ul (tabela 1), enquanto a concentração de DNA dos controles de material incluído em parafina variou de 40 ng/ul a 93,9 ng/ul. As amostras de DNA dos controles masculino e feminino extraídos de sangue periférico tinham concentração de 250 ng/ul.

Tabela 1. Concentração do DNA extraído de tecido gonadal incluído em parafina de pacientes com DDS-OT e controles.

Paciente genético	(sexo)	C(-)1 (ND)	C(-)2 (ND)	C(+)1 (XY)	C(+)2 (XY)	A1 (XY)		A2 (XY)	B1 (XX)	B2 (XX)		B3 (XX)		B4	B5 (XX)	B6 (XX)	
Gônada		O	O	T	T	OT	D E	O E	T D	T D	OT E	T D	OT E	OT D	T D	OT D	OT E
Concentração (ng/ µl)		86	48,3	93,9	40	5,8	10,1	0,8	2,23	2,7	2,90	3,08	17,14	2,35	11,7	5,7	3,6

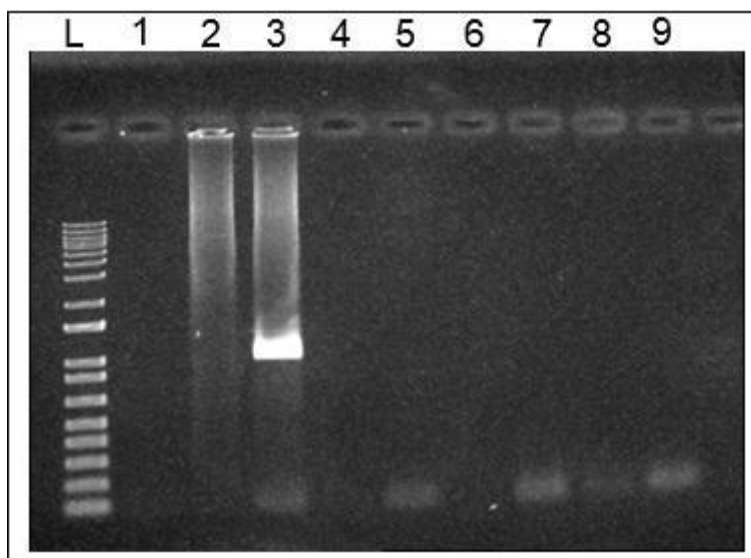
C(-): controle negativo em tecido gonadal; C(+): controle positivo em tecido gonadal; D: direita; E: esquerda; ND: cariótipo não disponível, paciente clinicamente compatível com 46,XX; O: ovário; OT: ovotestis; T: testículo

Na PCR com *primers* externos para XES, TSPY e DYZ3 não houve amplificação dos fragmentos correspondentes nos pacientes. Os três fragmentos foram visualizados no controle positivo em sangue periférico (homem normal 46,XY), no qual foram obtidos amplicons de 780 pb para XES, 1300 pb para TSPY e 1100 pb para DYZ3 (tabela 2, figuras 8-11). Nos controles em tecido gonadal incluído em parafina não houve amplificação das três sequências de Y, observou-se amplificação apenas para o controle masculino (XY) de DNA de sangue periférico (figuras 12 e 13).

Tabela 2. PCR com os *primers* externos para XES, TSPY e DYZ3 no DNA extraído de tecido gonadal incluído em parafina dos pacientes com DDS-OT e controles.

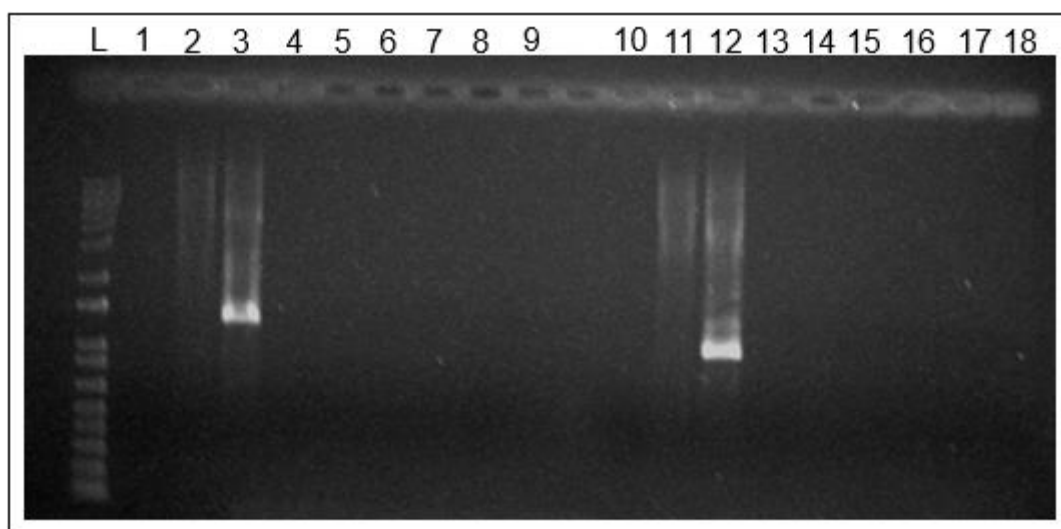
Paciente (sexo genético)	C(-)1 (ND)	C(-)2 (ND)	C(+)1 (XY)	C(+)2 (XY)	CS(-) (XX)	CS(+) (XY)	A1 (XY)		A2 (XY)	B1 (XX)	B2 (XX)		B3(XX)		B4 (XX)	B5 (XX)	B6 (XX)	
Gônada	O	O	T	T	NA	NA	OT D	T E	O E	OT E	T D	OT E	T D	OT E	OT D	T D	OT D	OT E
XES	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSPY	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DYZ3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Reações feitas usando controle positivos e negativos e controle branco. C(-): controle negativo em tecido gonadal; C(+): controle positivo em tecido gonadal; CS(-): controle em sangue negativo (46,XX); CS(+): controle em sangue positivo (46,XY); D: gônada direita; E: gônada esquerda; NA: não se aplica; ND: cariótipo não disponível, paciente clinicamente compatível com 46,XX; O: ovário; OT: ovotestis; T: testículo.



L: marcador *ladder* de 1kb; 1: controle branco; 2: controle negativo (mulher 46,XX); 3: controle masculino (homem 46,XY); 4: paciente A1 (XY); 5: paciente A2 (XY); 6: paciente B2 (XX); 7: paciente B5 (XX); 8: paciente B6 (XX) (gônada direita); 9: paciente B6 (XX) (gônada esquerda).

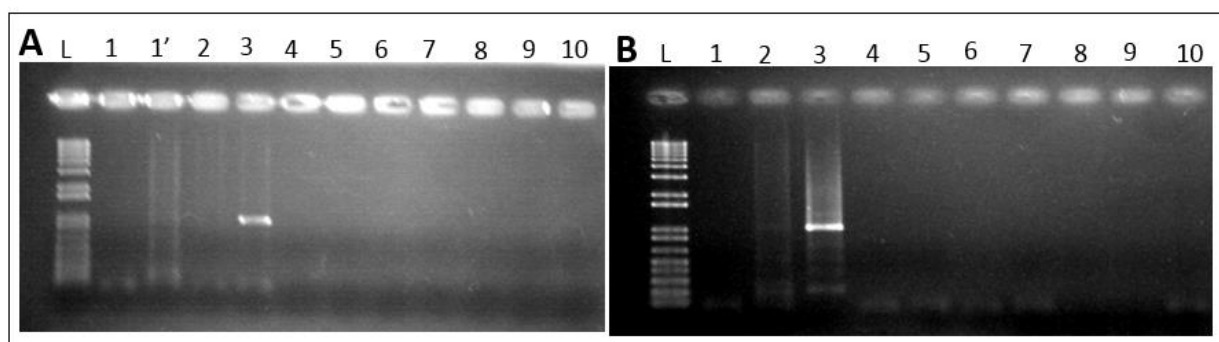
Figura 8. Imagem do gel de agarose da PCR convencional (XES) dos pacientes A1, A2, B2, B5 e B6. Eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando fragmento de 780pb gerados pela técnica de PCR convencional utilizando *primer XES* em indivíduos com DDS-OT e controles.



L: marcador *ladder* de 1kb. 1: controle branco; 2: controle negativo (mulher 46,XX); 3: controle positivo (homem 46,XY); 4: paciente A1 (XY); 5: paciente A2 (XY); 6: paciente B2 (XX); 7: paciente B5 (XX); 8: paciente B6 (XX) (gônada direita); 9: paciente B6 (XX) (gônada esquerda); 10: controle branco; 11: controle negativo (mulher 46,XX); 12: controle masculino (homem 46,XY); 13: paciente A1 (XY); 14: paciente A2 (XY); 15: paciente B2 (XX); 16: paciente B5 (XX); 17: paciente B6 (XX) (gônada direita); 18: paciente B6 (XX) (gônada esquerda).

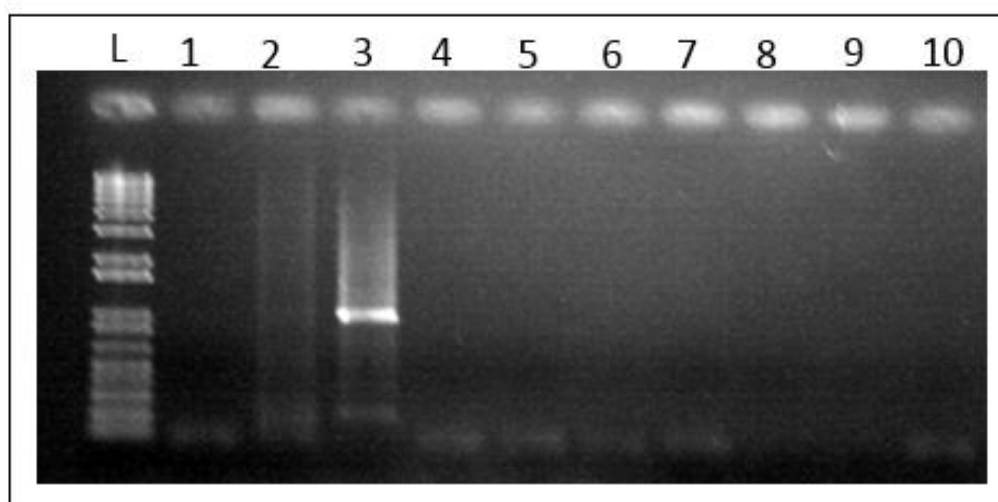
Figura 9. Imagem do gel de agarose da PCR convencional (TSPY e DYZ3) dos pacientes A1, A2, B2, B5 e B6. Eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando fragmento de 1300pb gerado pela técnica de PCR convencional utilizando *primer*

TSPY (1-9) e fragmento de 1100 pb gerado pela técnica de PCR convencional utilizando *primer* *DYZ3* (10-18) em indivíduos com DDS-OT e controles.



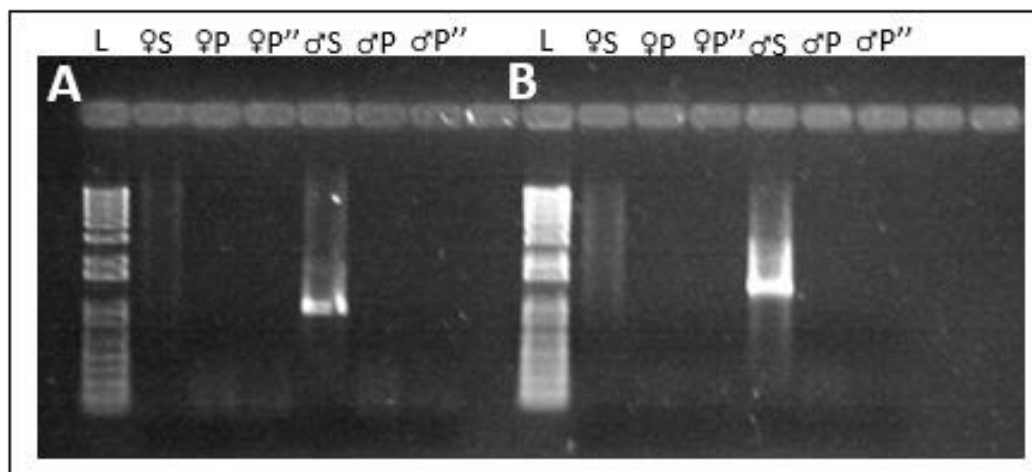
L: marcador *ladder* de 1kb. A: PCR *XES* - 1: controle branco; 1': controle branco; 2: controle negativo (mulher 46,XX); 3: controle positivo (homem 46,XY); 4: paciente A1 (XY); 5: paciente B1 (XX); 6: paciente B2 (XX) (gônada direita); 7: paciente B2 (XX) (gônada esquerda); 8: paciente B3 (XX) (gônada direita); 9: paciente B3 (XX) (gônada esquerda). B: PCR *TSPY* - 1: controle branco; 1': controle branco; 2: controle negativo (mulher 46,XX); 3: controle positivo (homem 46,XY); 4: paciente A1 (XY); 5: paciente B1 (XX); 6: paciente B2 (XX) (gônada direita); 7: paciente B2 (XX) (gônada esquerda); 8: paciente B3 (XX) (gônada direita); 9: paciente B3 (XX) (gônada esquerda); 10: paciente B4 (XX).

Figura 10. Imagem do gel de agarose da PCR convencional (*XES* e *TSPY*) dos pacientes A1, B1, B2, B3 e B4. Eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando fragmento de 780pb gerados pela técnica de PCR convencional utilizando *primer* *XES* em indivíduos com DDS-OT e controles (A) e fragmento de 1300pb gerado pela técnica de PCR convencional utilizando *primer* *TSPY* (B).



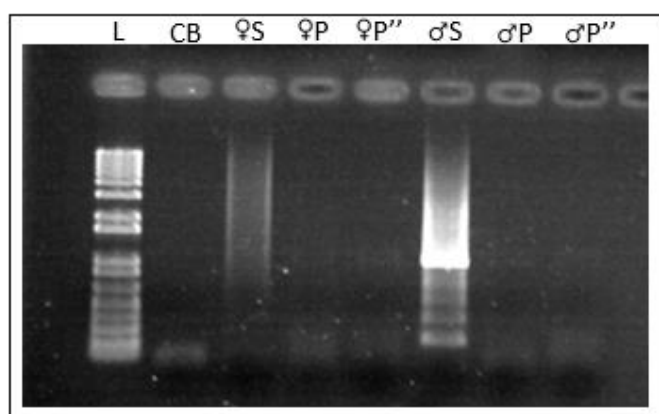
L: marcador *ladder* de 1kb. 1: controle branco; 1': controle branco; 2: controle negativo (mulher 46,XX); 3: controle positivo (homem 46,XY); 4: paciente A1 (XY); 5: paciente B1 (XX); 6: paciente B2 (XX) (gônada direita); 7: paciente B2 (XX) (gônada esquerda); 8: paciente B3 (XX) (gônada direita); 9: paciente B3 (XX) (gônada esquerda); 10: paciente B4 (XX).

Figura 11. Imagem do gel de agarose da PCR convencional (*DYZ3*) dos pacientes A1, B1, B2, B3 e B4. Eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando fragmento de 1100 pb gerado pela técnica de PCR convencional utilizando *primer* *DYZ3* em indivíduos com DDS-OT e controles.



♀P e ♀P': controles femininos de DNA em tecido parafinado; ♂P e ♂P'': controles masculinos de DNA de tecido parafinado; ♂S: controle masculino de DNA em sangue periférico; ♀S: controle feminino de DNA em sangue periférico. L: marcador *ladder* de 1kb.

Figura 12. Imagem do gel de agarose da PCR convencional (XES e TSPY) dos controles femininos e masculinos de DNA em tecido parafinado. Eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando fragmento de 780pb gerados pela técnica de PCR convencional utilizando *primer* XES (A), fragmento de 1300pb utilizando *primer* TSPY (B) em controles masculinos e femininos de DNA extraído de sangue periférico e de tecido gonadal incluído em parafina.



CB: controle branco; ♀P e ♀P': controles femininos de DNA em tecido parafinado; ♂P e ♂P'': controles masculinos de DNA de tecido parafinado; ♂S: controle masculino de DNA em sangue periférico; ♀S: controle feminino de DNA em sangue periférico. L: marcador *ladder* de 1kb.

Figura 13. Imagem do gel de agarose da PCR convencional (DYZ3) dos controles femininos e masculinos de DNA em tecido parafinado. Eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando fragmento de de 1100 pb gerado pela técnica de PCR

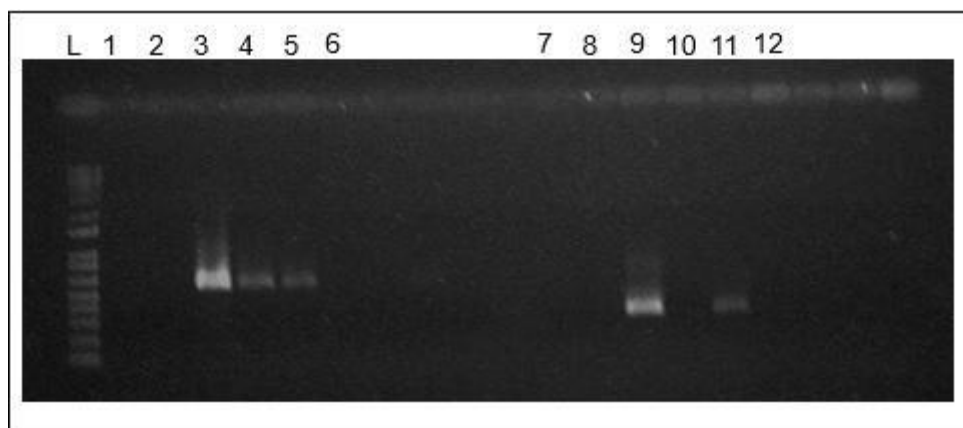
convencional utilizando *primer* *DYZ3* em controles masculinos e femininos de DNA extraído de sangue periférico e de tecido gonadal incluído em parafina.

Em seguida, foi feito o *nested* PCR utilizando *primers* internos para *SRY*, *TSPY* e *DYZ3* (tabela 3), onde foi possível observar amplicons de 380 pb para *SRY*, 608 pb para *TSPY* e 330 pb para *DYZ3* no controle em sangue positivo (homem normal, 46,XY) (figuras 14 a 19). Nos dois pacientes 46,XY, A1 e A2, ocorreu amplificação do *TSPY*, porém *DYZ3* amplificou apenas no A2 (figura 14) e a amplificação do *SRY* estava ausente em ambos (figura 15). Já nos casos 46,XX, no paciente B5 ocorreu amplificação de *SRY*, *TSPY* e *DYZ3* (figuras 15 e 16) e no paciente B6 observou-se resultado positivo para *TSPY* e *DYZ3* na gônada direita e para *SRY* e *TSPY* na gônada esquerda (figuras 16 e 17). Nos pacientes B1 e B2 ocorreu amplificação de *SRY* nas gônadas esquerdas (figura 17). Já no paciente B3 observou-se amplificação de *DYZ3* na gônada direita (figura 18). Apenas no paciente B4 não ocorreu nenhuma amplificação (figura 18 e 19). Quanto aos controles em tecido gonadal incluído em parafina, houve amplificação das três sequências de Y tanto nos positivos (XY) quanto nos negativos (femininos) (figura 20). Na reação mostrada na figura 20, diferentemente do observado nas figuras 14 a 19, no controle masculino de DNA de sangue periférico não houve amplificação somente do *SRY*.

Tabela 3. *Nested* PCR com os primers internos para *SRY*, *TSPY* e *DYZ3* no DNA extraído de tecido gonadal incluído em parafina dos pacientes com DDS-OT e controles.

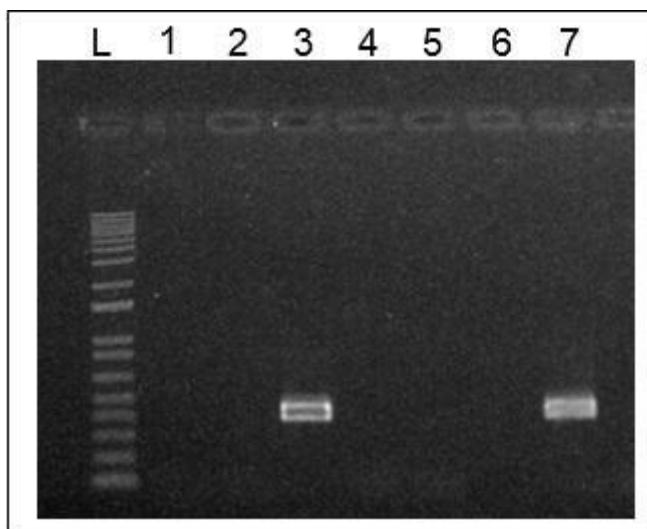
Paciente (sexo genético)	C(-)1 (ND)	C(-)2 (ND)	C(+)1 (XY)	C(+)2 (XY)	CS(-) (XX)	CS(+) (XY)	A1 (XY)		A2 (XY)		B1 (XX)	B2 (XX)		B3 (XX)	B4 (XX)	B5 (XX)	B6 (XX)	
Gônada	O	O	T	T	NA	NA	OT D	T E	O E	T E	T D	OT E	T D	OT E	OT D	T D	OT D	OT E
<i>SRY</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>TSPY</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>DYZ3</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-

Reações feitas usando controle positivos e negativos e controle branco. C (-): controle negativo em tecido gonadal; C(+): controle positivo em tecido gonadal; CS(-): controle em sangue negativo (46,XX); CS(+): controle em sangue positivo (46,XY); D: gônada direita; E: gônada esquerda; NA: não se aplica; ND: cariótipo não disponível, paciente clinicamente compatível com 46,XX; O: ovário; OT: ovotestis; T: testículo.



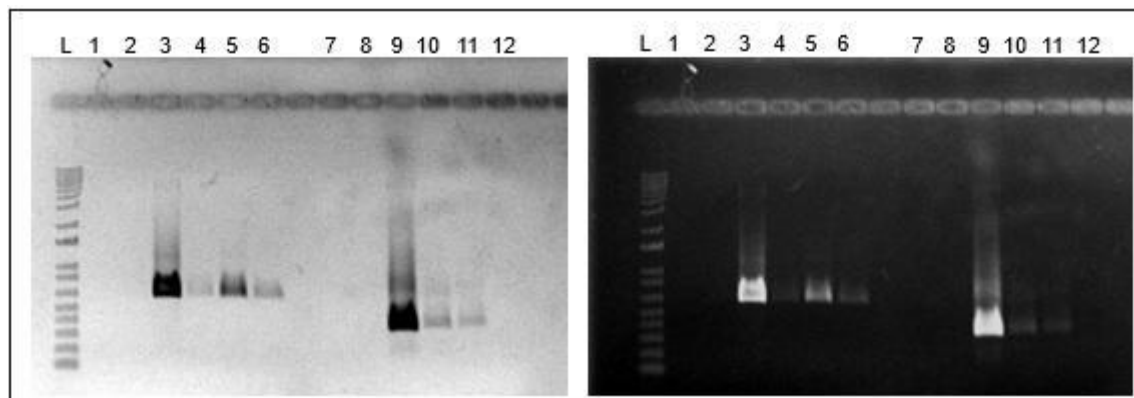
L: marcador *ladder* de 1kb; 1: controle branco; 2: controle negativo (mulher 46,XX); 3: controle positivo (homem 46,XY); 4: paciente A1 (XY); 5: paciente A2 (XY); 6: paciente B2 (XX); 7: controle branco; 8: controle negativo (mulher 46,XX); 9: controle positivo (homem 46,XY); 10: paciente A1 (XY) (gônada direita); 11: paciente A2 (XY); 12: paciente B2 (XX) (gônada direita).

Figura 14. Imagem do gel de agarose do *nested*-PCR (*TSPY* e *DYZ3*) dos pacientes A1, A2 e B2. Eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando fragmentos de 608pb gerados pela técnica de *nested*-PCR utilizando *primer TSPY* (1-6) e fragmentos de 330pb gerados pelo *nested*-PCR com *primer DYZ3* (7-12) em pacientes com DDS-OT (A1-gônada direita e A2) e controle positivo (XY).



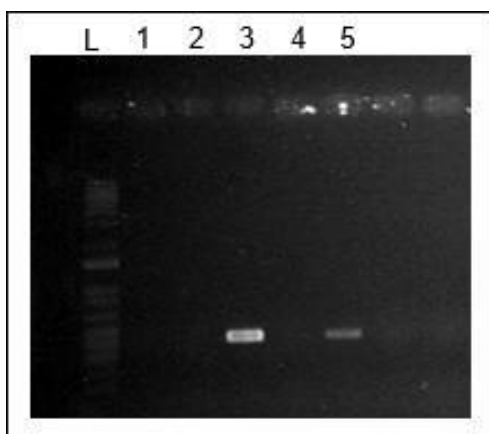
L: marcador *ladder* de 1kb; 1: controle branco; 2: controle negativo (mulher 46,XX); 3: controle positivo (homem 46,XY); 4: paciente A1 (XY); 5: paciente A2 (XY); 6: paciente B2 (XX); 7: paciente B5 (XX).

Figura 15. Imagem do gel de agarose do *nested*-PCR (*SRY*) dos pacientes A1, A2, B2 e B5. Eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando fragmentos de 380pb gerado pela técnica *nested*-PCR utilizando *primer SRY* em paciente com DDS-OT (B5) e controle positivo (XY).



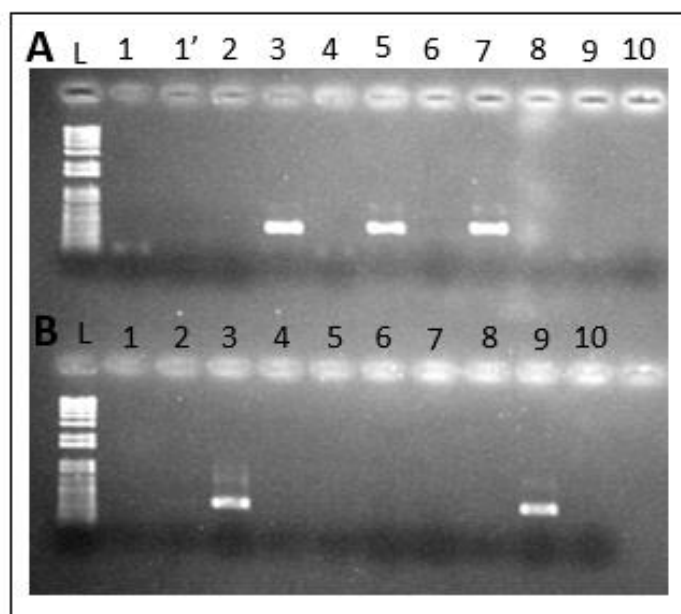
L: marcador *ladder* de 1kb; 1: controle branco; 2: controle negativo (mulher 46,XX); 3: controle positivo (homem 46,XY); 4: paciente B5 (XX); 5: paciente B6 (XX) (gônada direita); 6: paciente B6 (XX) (gônada esquerda); 7: controle branco; 8: controle negativo (mulher 46,XX); 9: controle positivo (homem 46,XY); 10: paciente B5 (XX); 11: paciente B6 (XX) (gônada direita); 12: paciente B6 (XX) (gônada esquerda). Figuras com cores invertidas de uma mesma reação.

Figura 16. Imagem do gel de agarose do *nested*-PCR (*TSPY* e *DYZ3*) dos pacientes B5 e B6. Eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando fragmentos de 608pb gerados pela técnica de *nested*-PCR utilizando *primer TSPY* (1-6) e fragmentos de 330pb gerados pelo *nested*-PCR com *primer DYZ3* (7-12) em pacientes com DDS-OT (B5 e B6) e controle positivo (XY).



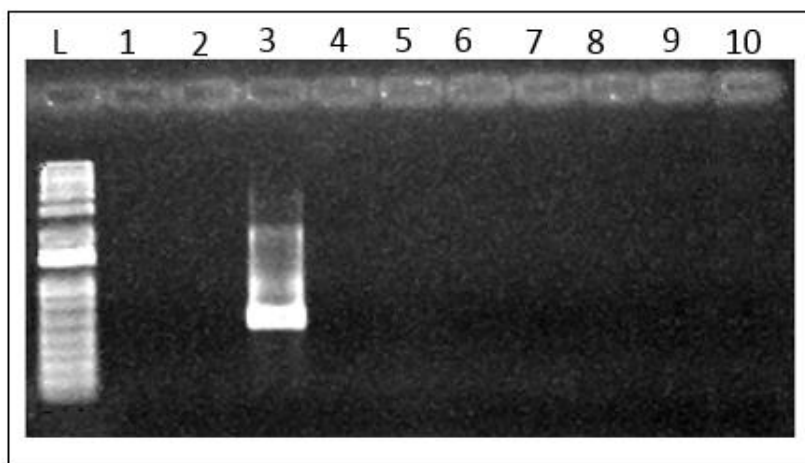
L: marcador *ladder* de 1kb; 1: controle branco; 2: controle negativo (mulher 46,XX); 3: controle positivo (homem 46,XY); 4: paciente B6 (XX) (gônada direita); 5: paciente B6 (XX) (gônada esquerda).

Figura 17. Imagem do gel de agarose do *nested*-PCR (*SRY*) do paciente B6. Eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando fragmentos de 380pb gerado pela técnica *nested*-PCR utilizando *primer SRY* em paciente com DDS-OT (B6) e controle positivo (XY).



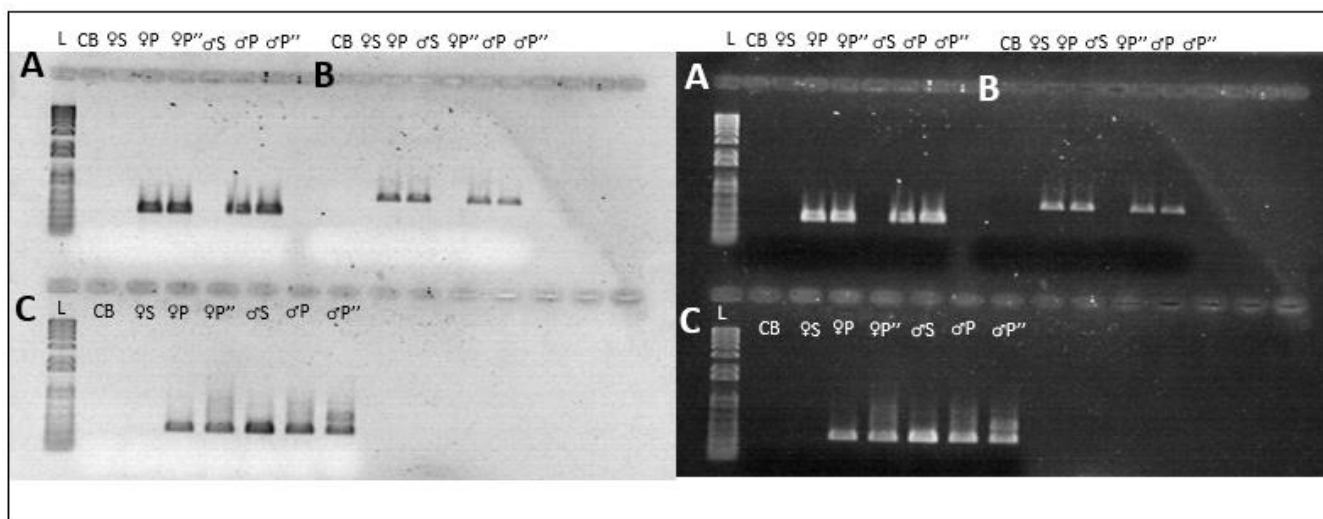
L: marcador *ladder* de 1kb. 1: controle branco; 1': controle branco; 2: controle negativo (mulher 46,XX); 3: controle positivo (homem 46,XY); 4: paciente A1 (XY); 5: paciente B1 (XX); 6: paciente B2 (XX) (gônada direita); 7: paciente B2 (XX) (gônada esquerda); 8: paciente B3 (XX) (gônada direita); 9: paciente B3 (XX) (gônada esquerda); 10: paciente B4 (XX).

Figura 18. Imagem do gel de agarose do *nested*-PCR (*SRY* e *DYZ3*) dos pacientes A1, B1, B2, B3 e B4. Eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando fragmentos de 380pb gerado pela técnica *nested*-PCR utilizando *primer SRY* (A) em pacientes com DDS-OT (B1 e B3) e controle positivo (XY); e fragmentos de 330pb gerados pelo *nested*-PCR com *primer DYZ3* (B) em pacientes com DDS-OT (B3) e controle positivo (XY)



L: marcador *ladder* de 1kb. 1: controle branco; 1': controle branco; 2: controle negativo (mulher 46,XX); 3: controle positivo (homem 46,XY); 4: paciente A1 (XY); 5: paciente B1 (XX); 6: paciente B2 (XX) (gônada direita); 7: paciente B2 (XX) (gônada esquerda); 8: paciente B3 (XX) (gônada direita); 9: paciente B3 (XX) (gônada esquerda); 10: paciente B4 (XX).

Figura 19. Imagem do gel de agarose do *nested*-PCR (*TSPY*) dos pacientes A1, B1, B2, B3 e B4. Eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando fragmento de 608pb gerado pela técnica de *nested*-PCR utilizando *primer TSPY* controle positivo (XY).



CB: controle branco; ♀P e ♀P': controles femininos de DNA em tecido parafinado; ♂P e ♂P': controles masculinos de DNA de tecido parafinado; ♂S: controle masculino de DNA em sangue periférico; ♀S: controle feminino de DNA em sangue periférico. L: marcador *ladder* de 1kb. Figuras com cores invertidas de uma mesma reação.

Figura 20. Imagem do gel de agarose do *nested*-PCR (*SRY*, *TSPY* e *DYZ3*) dos controles femininos e masculinos de DNA em tecido parafinado. Eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando fragmentos gerados pela técnica *nested*-PCR (fragmento de 380 pb (A), utilizando *primer SRY*, de 608 pb (B) utilizando *primer TSPY*, e de 330 pb (C) utilizando *primer DYZ3*) em controles masculinos e femininos de DNA extraído de sangue periférico e de tecido gonadal incluído em parafina.

Nossos resultados mostram, portanto, nítida diferença no padrão de amplificação das sequências específicas do cromossomo Y dos controles de DNA de sangue periférico (46,XY e 46,XX) em relação aos tecidos gonadais femininos e masculinos utilizados como controles. No sangue periférico, como esperado, a amplificação das três sequências de Y ocorreu no controle 46,XY e estava ausente no 46,XX, tanto na PCR convencional quanto no *nested* PCR. Por outro lado, no tecido testicular dos controles XY a técnica não teve sensibilidade para detectar as regiões *XES* e *TSPY* na PCR convencional, e as três sequências foram amplificadas somente no *nested*. Além disso, no tecido ovariano em um dos controles femininos houve amplificação das três sequências de Y no *nested*.

Os resultados dos controles tornam difícil a interpretação dos resultados dos pacientes da amostra, uma vez que a falta de amplificação de determinadas sequências nos pacientes 46,XY pode corresponder a falsos negativos e a amplificação de sequências nos pacientes 46,XX pode corresponder a falsos positivos.

A validação destes resultados dos pacientes por alguma outra técnica teria como empecilho a qualidade do DNA, que é um ponto crucial na PCR. A extração do DNA do tecido gonadal teve como obstáculos o tamanho do fragmento da biopsia e a qualidade da fixação do tecido. Isso porque quanto menor o tamanho do tecido, menor a concentração de DNA obtida; além disso, a fixação do material interfere na qualidade do DNA, que pode estar degradado. Ademais, a amplificação em controles femininos evidenciou uma possível contaminação das amostras, o que pode ter ocorrido pela manipulação dos fragmentos por profissionais da saúde e técnicos do sexo masculino. Outra estratégia para investigar a presença de outras linhagens celulares em nossa amostra poderia ser a análise de outros tecidos. No entanto, por ser um estudo retrospectivo, a maioria dos pacientes já não são acompanhados no serviço.

Embora não tenha sido possível detectar mosaicismo ou quimerismo oculto em nossa amostra, é importante enfatizar que outros autores já descreveram casos de DDS-OT com cariótipo 46,XX em sangue periférico e 46,XX/46,XY em cultura de fibroblastos das gônadas, indicando um quimerismo oculto (113, 138, 139). Além de quimerismo, já foram descritos também casos de mosaicismo restrito às gônadas em pacientes DDS-OT com cariótipo 46,XX em sangue (140).

Como já mencionado, o quimerismo pode ocorrer a partir da fecundação de dois ovócitos ou de um ovócito e do primeiro corpúsculo polar por dois espermatozoides e posterior fusão dos zigotos formando apenas um indivíduo (141, 142). Já no mosaicismo as linhagens são originárias de um único zigoto. Pode ocorrer, por exemplo, a partir de um zigoto 47,XXY no qual, devido a atraso anafásico numa divisão celular num estágio inicial do desenvolvimento embrionário, haja perda de uma cromátide de Y, gerando uma linhagem 46,XX em mosaico com a linhagem

47,XXY (143). O fenótipo dependeria da proporção de cada linhagem celular nas gônadas (140, 144, 145).

Outra estratégia que pode ser empregada em estudo futuro para investigar a hipótese de mosaicismo ou quimerismo restrito às gônadas é a extração de RNA do tecido gonadal incluído em parafina, seguindo-se a síntese de cDNA por PCR via transcriptase reversa (RT-PCR) para análise do transcriptoma. O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos de um determinado tecido e sua quantificação em um determinado estágio do desenvolvimento ou condição fisiológica. É essencial para a interpretação de elementos funcionais do genoma, para revelar os constituintes moleculares de células e tecidos e para compreender o desenvolvimento normal e situações patológicas (146).

Até recentemente o transcriptoma vinha sendo analisado por meio de hibridização em *microarrays* ou métodos baseados em sequenciamento do cDNA por Sanger. A partir do final dos anos 2000, as técnicas de sequenciamento de nova geração permitiram o desenvolvimento de um novo método para obtenção do transcriptoma, denominado RNA-seq (RNA sequencing). Nele, o RNA extraído é convertido a uma biblioteca de fragmentos de cDNA; cada molécula é então sequenciada com técnicas de alto rendimento para obter sequências curtas de 30 a 400 pb (short reads), que são então alinhadas ao genoma de referência ou utilizadas para construir um mapa contendo a estrutura transcricional e(ou) o nível de expressão de cada gene. A técnica de RNA-seq já foi aplicada a DDS na análise do transcriptoma de testículos de fetos e homens adultos com a síndrome de Klinefelter (147, 148).

No caso específico da amostra estudada neste trabalho, permitiria não só verificar se há expressão de sequências específicas do cromossomo Y no tecido gonadal dos pacientes 46,XX e, com isso, detectar a presença de mosaicismo ou quimerismo oculto, mas também analisar a expressão de outros genes envolvidos na diferenciação gonadal, contribuindo, assim, para a elucidação da etiologia do DDS-OT.

4.2. Busca de desequilíbrios genômicos por meio de CMA

Foi possível realizar a CMA em um dos pacientes com cariótipo 46,XY (caso A2) e de todos os seis pacientes 46,XX (B1 a B6). Foram encontradas CNVs patogênicas nos casos A2 e B1; nos demais foram encontradas somente variantes classificadas como benignas ou provavelmente benignas.

Na paciente A2 foram encontradas duas CNVs patogênicas: uma deleção terminal em 9p e uma duplicação terminal em 18p: arr[GRCh37] 9p24.3p23(208454_13036611)x1, 18p11.32p11.23(136227_7961882)x3

A deleção no braço curto do cromossomo 9 tem aproximadamente 12,8 Mb, estendendo-se da banda p24.3 até a banda p23 e correspondendo a 3.514 sondas de oligonucleotídeos. O intervalo deletado possui 53 genes, dentre os quais 34 possuem entrada no OMIM. Com base no número de genes afetados, na extensão da alteração detectada e nas informações disponíveis em bases de dados no momento, a alteração foi considerada patogênica (figura 21).

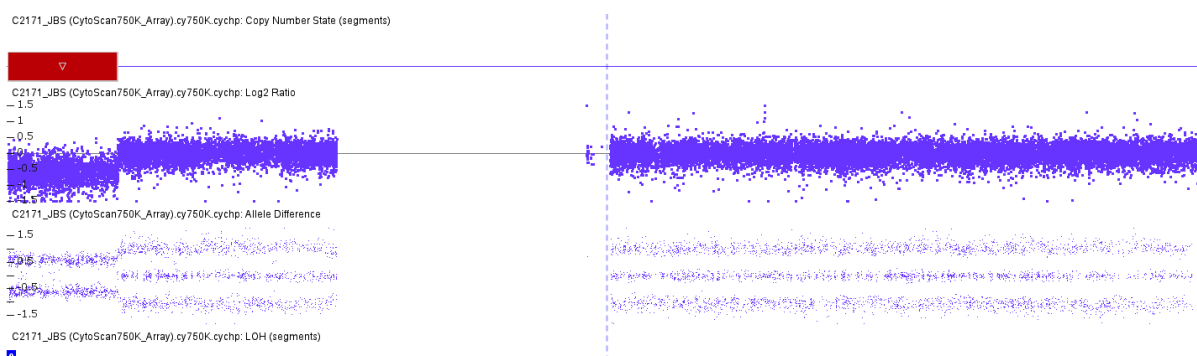


Figura 21. Log2Ratio da deleção em 9p24.3p23 do paciente A2. Deleção de aproximadamente 12,8 Mb no braço curto do cromossomo 9, estendendo-se da banda p24.3 até a banda p23, entre as posições genômicas 208454_13036611 (Build 32.3/Hg 19) do paciente A2.

Por sua vez, a duplicação no braço curto do cromossomo 18 tem aproximadamente 7,8 Mb, estendendo-se da banda p11.32 até a banda p11.23, correspondendo a 2.186 sondas de

oligonucleotídeos. O intervalo duplicado possui 51 genes, dentre os quais 23 possuem entrada no OMIM. Com base no número de genes afetados, na extensão da alteração detectada e nas informações disponíveis em bases de dados no momento, a alteração também foi considerada patogênica (figura 22).

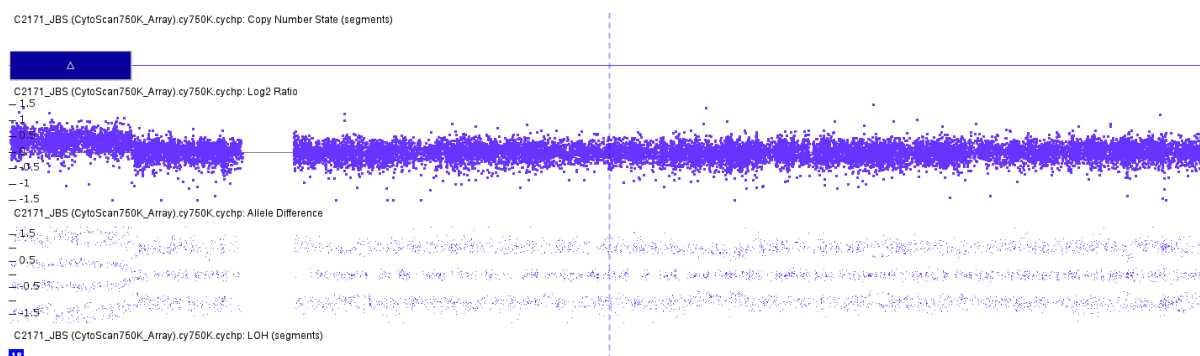


Figura 22. Log2Ratio da duplicação em 18p11.32p11.23 do paciente A2. Duplicação de aproximadamente 7,8 Mb no braço curto do cromossomo 18 estendendo-se da banda p11.32 até a banda p11.23, entre as posições genômicas 136227_7961882 (Build 32.3/Hg 19) do paciente A2.

Dentre os genes incluídos nas duas CNVs chama a atenção o *DMRT1*, localizado em 9p24.3, que se encontra, portanto, em cópia única na paciente. Como já mencionado, foram relatados na literatura dois casos de DDS-OT 46,XY associados a haploinsuficiência desse gene (103, 127), que já vinha sendo associada também a disgenesia gonadal pura e parcial 46,XY (149).

A reavaliação clínica da paciente, hoje adulta, revelou atraso no desenvolvimento neuromotor, deficiência intelectual e vários sinais dismórficos. Seu exame de cariótipo, previamente 46,XY sem alterações estruturais detectadas, foi refeito; foi realizado também o cariótipo de seus pais. Na paciente foi possível observar o cromossomo derivado 9, e o exame da mãe mostrou uma translocação equilibrada entre o braço curto do cromossomo 9 e o braço curto do cromossomo 18.

Uma vez que a haploinsuficiência do *DMRT1* pode levar não só a DDS-OT mas também à disgenesia gonadal pura e parcial, sendo esta última também caracterizada por ambiguidade

genital, foi solicitada revisão da lâmina referente à biópsia realizada no início dos anos 1990. Essa revisão colocou em dúvida o laudo anterior que descrevia folículos ovarianos escassos, porém bem caracterizados; no entanto, o material remanescente da biópsia era escasso, o que impede um diagnóstico histológico definitivo.

Por sua vez, o paciente B1 apresentou uma duplicação intersticial em Xq: arr[GRCh37] Xq27.1(139357310_140094746)x3. Essa duplicação tem aproximadamente 737 kb, correspondendo a 321 sondas de oligonucleotídeos, no braço longo do cromossomo X, envolvendo a banda q27.1, entre as posições genômicas 139357310_140094746 (*Build 32.3/Hg 19*). O intervalo duplicado possui cinco genes, dentre os quais três possuem entrada no OMIM: o gene *SOX3* e outros dois sem fenótipo associado [*CDR1-AS (CDR1 antisense RNA)* e *CDR1 (Cerebellar Degeneration Related Protein 1)*]. Com base nas informações disponíveis em bases de dados no momento, particularmente aquelas relacionadas à hiperexpressão do *SOX3*, essa alteração foi considerada provavelmente patogênica.

O paciente B1 tem uma irmã com DDS 46,XX idiopático na qual foi detectada a mesma duplicação por CMA; essa duplicação está ausente nos pais, cuja paternidade e maternidade foram confirmadas, indicando assim mosaicismo em linhagem germinativa. Os casos são detalhados no artigo “*SOX3 duplication in a boy with 46,XX ovotesticular disorder of sex development and his 46,XX sister with atypical genitalia – evidence of germline mosaicism*” publicado pela revista *American Journal of Medical Genetics*.

Duplicações em Xq27.1 incluindo o *SOX3* já foram descritas em alguns casos de DDS-OT 46,XX e de DDS 46,XX testicular (72, 150, 151, 152, 153, 154). Estudos indicaram que, em indivíduos XX, o aumento de dose ou expressão ectópica de *SOX3* pode levá-lo a atuar sinergicamente com *NR5A1* para aumentar a expressão de *SOX9* e ativar a via da diferenciação testicular (150).

Portanto, em dois dos sete casos da amostra em que foi possível realizar a CMA havia uma CNV patogênica ou provavelmente patogênica envolvendo genes que participam do processo de diferenciação testicular e que já foram associados a DDS-OT. Como já mencionado

na introdução deste trabalho, o uso de CMA em DDS tem permitido a caracterização de deleções e duplicações causais tanto em pacientes 46,XX quanto 46,XY, sendo identificadas CNVs que incluem genes já associados a DDS (121) e outras em regiões regulatórias, como as dos genes *SOX3*, *SOX9*, *WNT4* e *NR0B1* (122, 123, 124). Assim, nossos resultados indicam que a CMA deve fazer parte da investigação rotineira de pacientes com distúrbios da diferenciação gonadal, particularmente o DDS-OT.

Apesar dos demais casos não apresentarem variantes patogênicas, o paciente B2 apresentou uma deleção de 105 kb em 13q: arr[GRCh37] 13q14.2(48027448_48132734)x1 (figura 23). A variante foi classificada como provavelmente benigna por não possuir genes na região deletada. Porém, ao realizar a análise no DGV, observou-se que essa variante foi relatada em dois estudos populacionais, em apenas um indivíduo por estudo, sendo uma variante extremamente rara. Nenhuma deleção de tamanho semelhante nesta região foi encontrada nas bases de dados DECIPHER e ClinGen.

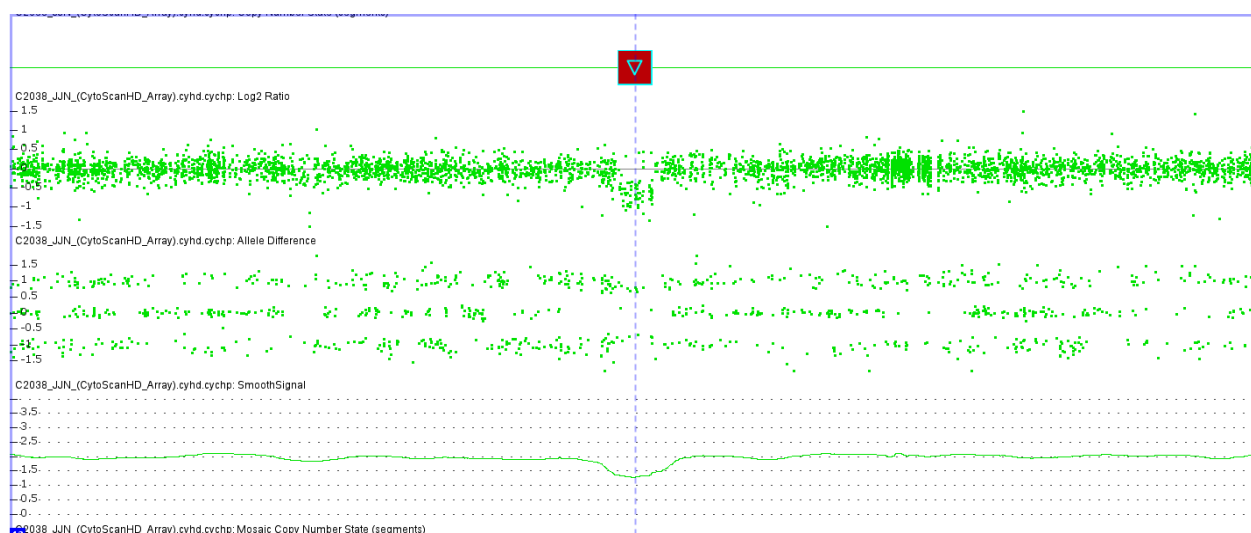


Figura 23. Log2Ratio da deleção em 13q14.2 do paciente B2. Deleção de aproximadamente 105 kb no braço longo do cromossomo 13, entre as posições genômicas 48027448_48132734 (Build 32.3/Hg 19) do paciente B2.

As análises realizadas para detecção de CNVs através da técnica de CMA possibilitaram a exclusão de CNVs grandes, > 100 kb. Entre os casos de CNVs em pacientes com DDS-OT,

descritos na literatura, a maioria apresentava variantes maiores que 500 kb e em apenas três casos foram encontradas CNVs menores (quadro 6). Ohnesorg e colaboradores (2017) detectaram uma duplicação pequena (248 a 323 kb) em 17q24.3, utilizando um *microarray* customizado, com maior concentração de sondas nas regiões de interesse. Em suma, no presente trabalho, CNVs grandes e patogênicas ao longo de todo o genoma puderam ser detectadas ou descartadas, CNVs acima de 100 kb nas regiões dos genes de interesse também foram descartadas. Porém, não se pode descartar pequenas alterações, abaixo do limite de resolução do chip utilizado, envolvendo genes já relacionados a DDS-OT ou outros genes possivelmente relacionados a este fenótipo. Para isso, deve ser usado um CMA customizado com uma cobertura maior de sondas para os genes de interesse, ou outro método, como análise de CNVs em dados de sequenciamento genômico.

Quadro 6. Tamanho das alterações em pacientes com DDS-OT descritas na literatura.

Referência	Tamanho da variante	Localização	Posição genômica (Hg 19)	Gene
73	150 kb	17q24.3	Paciente 1: (69515001–69668000)x3 ; paciente 2: 69511806–69666935)x3	SOX9
101	3.000 kb	15q26	(95127653_98146649)x1	NR2F2, SPATA8, NR2F2-AS1, SPATA8-AS1, miR-1469, PGAM1P12, RPL31P5, FAM149B1P1
103	~ 35 kb	9p24.3	(883300-918342)x1	DMRT1

104	500 kb	Xq27.1	(139541737_140043863)	<i>SOX3,</i> <i>RPS17P17,</i> <i>CDR1,</i> <i>MIR320D2</i>
105	248 a 323 kb	17q24.3	(69311111-69558832)x3	<i>SOX9</i>
125	~762-780 kb	17q24.3	(68838024_69599915)x3	<i>SOX9</i>
126	1.114 kb	17q24.3	(69006280_70120619)x3	<i>SOX9</i>
154	2.200 kb	Xq27.1q27.2	(139,499,778_141,777,782)	<i>CDR1, LDOC1,</i> <i>MAGEC1,</i> <i>MAGEC2,</i> <i>MAGEC3,</i> <i>SOX3,</i> <i>SPANXA1,</i> <i>SPANXB1,</i> <i>SPANXB2,</i> <i>SPANXC,</i> <i>SPANXD</i>

4.3. Imunoistoquímica

4.3.1. Avaliação inicial com coloração de hematoxilina-eosina (HE)

A coloração de HE foi realizada em todas as biópsias para identificação dos tecidos ovariano e testicular; essa análise foi feita com a colaboração da Profa. Dra. Liliana De Angelo Andrade, do departamento de Anatomia Patológica da FCM - Unicamp. Na maioria das biópsias, nas regiões correspondentes ao tecido testicular, havia túbulos seminíferos em fase pré-puberal com pouca luz tubular e poucas células de Leydig. Nas regiões ovarianas foram observados folículos primordiais e também folículos grandes em desenvolvimento, como pode ser observado

no paciente B3 (figura 36). As imagens dos tecidos de cada paciente com coloração de HE podem ser visualizadas juntamente com os resultados de imunoistoquímica (figuras 26 a 54).

Na primeira biópsia da paciente A2 a gônada esquerda foi inicialmente classificada como ovário devido à descrição de “raros folículos primordiais de aspecto habitual”; a reavaliação em HE visando a análise imunoistoquímica mostrou, porém, apenas estroma do tipo ovariano com células foliculares, mas sem células germinativas. Na gônada direita foi observado apenas tecido testicular, sem áreas de tecido ovariano que indicassem a existência de ovotestis (figura 35). É possível que não houvesse mais resíduos do tecido ovariano descrito na avaliação original; no entanto, dada a coexistência de tecido testicular e áreas de estroma ovariano, não se pode descartar que se trate de um caso de disgenesia gonadal parcial XY erroneamente interpretado como DDS-OT, fato esse recorrente na literatura (50).

Posteriormente, como já mencionado nos resultados e discussão referentes a CMA, foi realizada nova análise das lâminas da paciente A2 pela Dra. Liliana Andrade à luz do achado de haploinsuficiência do gene *DMRT1*. Na gônada direita, inicialmente descrita como testículo, havia características de uma gônada com fibrose, semelhante a estroma ovariano, desprovida de células germinativas e com raros túbulos seminíferos de permeio, indicando grave disgenesia testicular com predomínio do aspecto de gônada disgenética. Na gônada esquerda o material disponível era escasso, mas focalmente havia o mesmo aspecto descrito no parágrafo anterior. Diante da reanálise do material, já não é possível afirmar que a paciente A2 tenha, de fato, DDS-OT.

É importante levar em consideração que o diagnóstico histológico de DDS-OT foi feito, nesse caso, no início dos anos 1990, quando não só a experiência do GIEDDS, criado em 1989, era ainda pequena, mas também o conhecimento acerca dessa condição, tanto clínico quanto laboratorial, era escasso. De todo modo, esses achados demonstram a necessidade de maior participação dos patologistas nos serviços de DDS, com discussões anátomo-clínicas que permitam a união dos conhecimentos de cada área em prol de diagnósticos mais precisos que permitam, por sua vez, uma melhor definição do prognóstico e da conduta mais adequada à

condução de cada caso. É importante, ainda, que novos estudos retrospectivos relacionados a distúrbios da diferenciação gonadal sejam precedidos de revisão dos laudos anátomo-patológicos, particularmente aqueles emitidos há muitos anos.

Além do paciente A2, houve divergência na análise realizada nesse trabalho com a descrição prévia do tecido gonadal nos pacientes B2, B4 e B5. O laudo histopatológico do paciente B2 descreve a gônada direita como testículo, no entanto, foi observado nas lâminas de HE a presença de ovotestis na segunda biópsia. O mesmo ocorreu com os pacientes B4 e B5, ambos apresentaram gônada direita do tipo ovotestis, com a presença de folículos ovarianos e túbulos seminíferos.

4.3.2. Reações de imunoistoquímica

Todas as reações de imunoistoquímica foram realizadas utilizando controles positivos e negativos para cada anticorpo. O tipo de tecido escolhido para ser usado como controle e a titulação foram definidos pelo patologista Prof. Dr. José Vassallo, do departamento de Anatomia Patológica da FCM - Unicamp. (figura 24).

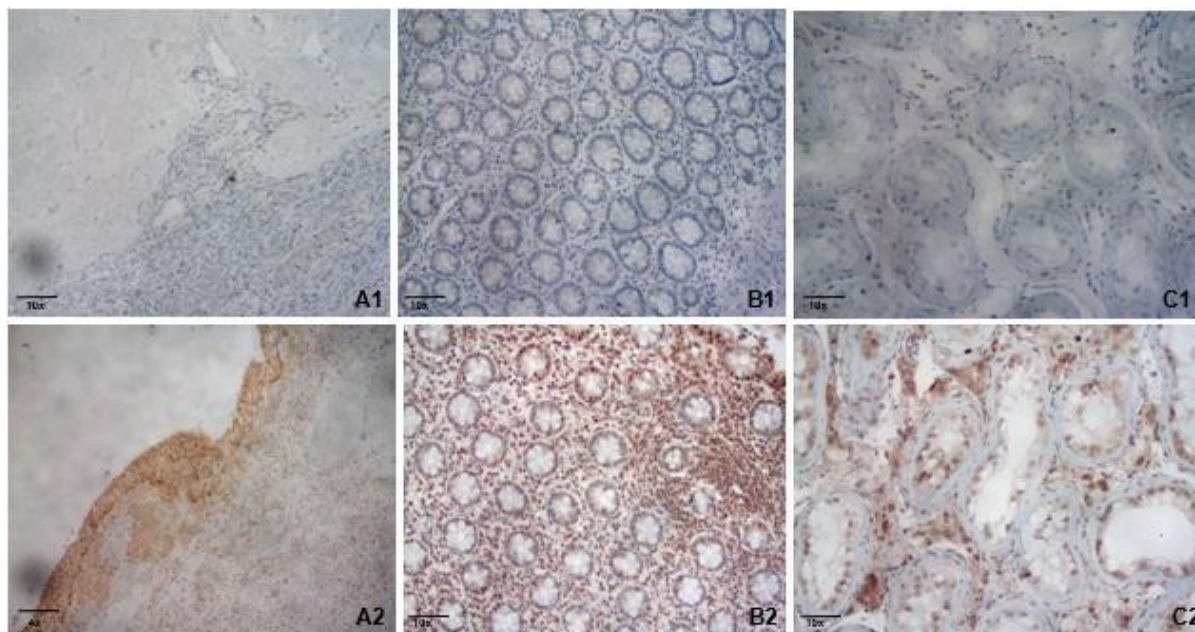
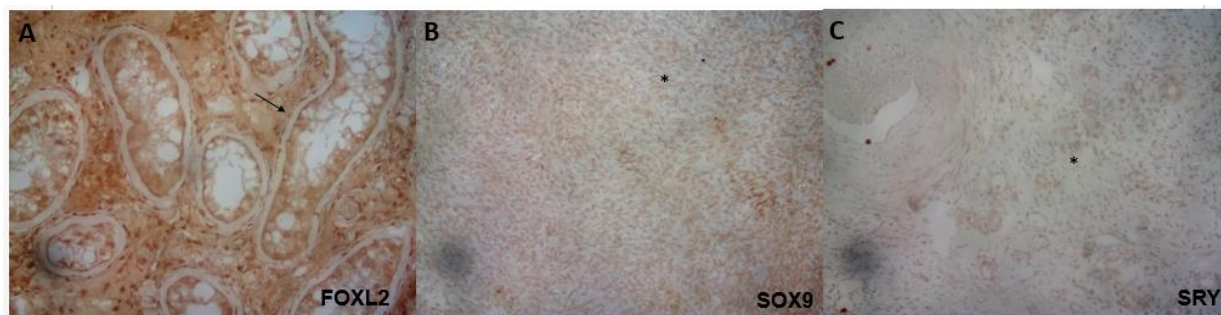


Figura 24. Reação de imunoistoquímica nos controles positivos e negativos. A1: controle negativo para FOXL2 - tecido: ovário; A2: controle positivo para FOXL2 - tecido: ovário; B1: controle negativo para SOX9 - tecido: cólon; B2: controle positivo para SOX9 - tecido cólon; C1: controle negativo para SRY - tecido: testículo; C2: controle positivo para SRY - tecido: testículo. Aumento: 100x.

Como mencionado anteriormente, SRY, SOX9 e FOXL2 são excelentes marcadores de tecido testicular (SRY e SOX9) e ovariano (FOXL2), porém poucos trabalhos investigaram a presença dessas proteínas em tecido gonadal de indivíduos com DDS-OT. No presente trabalho, foram analisados materiais de biópsia gonadal e gonadectomia dos oito pacientes com diagnóstico prévio de DDS-OT. Embora os resultados observados em relação ao FOXL2 tenham sido os esperados, com positividade apenas em tecido ovariano (tabela 4), os achados em relação aos marcadores SOX9 e SRY são de difícil interpretação. Além disso, como pode ser observado nessa mesma tabela, houve variação nos resultados entre diferentes amostras de biópsia e de gonadectomia de um mesmo indivíduo. Desta forma, com o objetivo de verificar a especificidade dos anticorpos foi realizado um teste usando o FOXL2 em tecido testicular, e o SOX9 e SRY em tecido ovariano (figura 25). Vale ressaltar que os cortes usados foram dos mesmos indivíduos definidos como controle negativo e positivo antes da realização dos ensaios

com os pacientes do presente trabalho. Observou-se reação de fundo em ambas as reações, não sendo possível determinar se os anticorpos possuem baixa especificidade ou se é um problema da técnica.



Túbulos seminíferos indicados pela seta e estroma do tipo ovariano indicado pelo asterisco (*). A: FOXL2; B: SOX9; C: SRY. Aumento 100x

Figura 25. Reação de imunoistoquímica teste em tecido ovariano e testicular. Teste de imunoistoquímica usando anticorpo FOXL2 em tecido testicular (A); e SOX9 (B) e SRY (C) em tecido ovariano.

Tabela 4. Resultados de imunoistoquímica com os anticorpos anti-FOXL2, SOX9 e SRY da amostra de pacientes com DDS ovário-testicular.

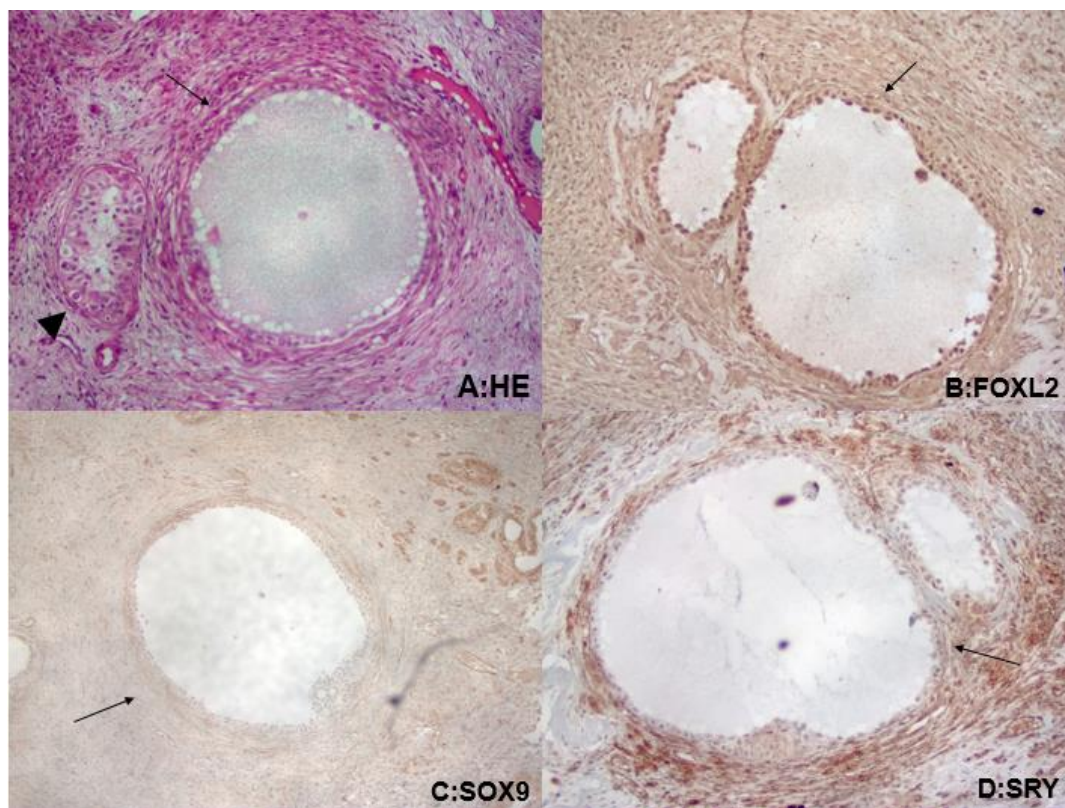
Paciente/cariótipo	Biópsia idade [#]	Gônada	FOXL2	SOX9	SRY
A1 46,XY	Bx1	OT D: TS	-	++	++
	12 meses	OT D: FO	++	-	+
	Bx2	OT D: TS	-	++	-
	24 meses	OT D: FO	++	++	-
A2 46,XY	Bx1 (22 meses)	T D: TS	-	-	+
	Bx2	T D: TS	-	++	++
	28 meses	O E: FO	MI	MI	MI
B1 46,XX	Bx1	T D: TS	-	++	-
	25 meses	OT E: TS	-	++	-
	Bx2	OT E: TS	-	-	-
	32 meses	OT E: FO	++	-	++
B2 46,XX	Bx1 59 meses	OT D: FO	++	+	-
		OT D: TS	-	++	-
		T E: TS	-	++	-
	Bx2 60 meses	OT D: TS	-	-	++
		OT D: FO	++	+	-
		OT E: TS	-	-	++
		OT E: FO	++	+	-
B3 46,XX	Bx1	T D: TS	-	-	-
	147 meses	O E: FO	++	-	+
B4 46,XX	Bx1	T D: TS	-	++	-
	2 meses	O E: FO	++	+	-
	Bx2	OT D: TS	-	++	-
	16 meses	OT D: FO	++	+	-
B5 46,XX	Bx1	OT D: TS	-	-	++
	5 meses	OT D: FO	++	-	-
B6 46,XX		OT D: TS	-	++	-
		OT D: FO*	MI	MI	MI
	Bx1	OT E: TS	-	++	-
	24 meses	OT E: FO	++	+	-
	Bx2	OT D: TS	-	-	++

36 meses	OT D: FO	++	-	++
	OT E: TS	-	++	++
	OT E: FO	++	++	-

Bx1: primeira biópsia ou biópsia única; Bx2: segunda biópsia; D: direita; E: esquerda; FO: folículo ovariano; MI: material insuficiente; O: ovário; OT: ovotestis; T: testículo; TS: túbulo seminífero; ++ :positivo; + :baixo positivo; - :negativo; #idade no momento da biópsia; * região destruída em que foram analisados poucos folículos ovarianos

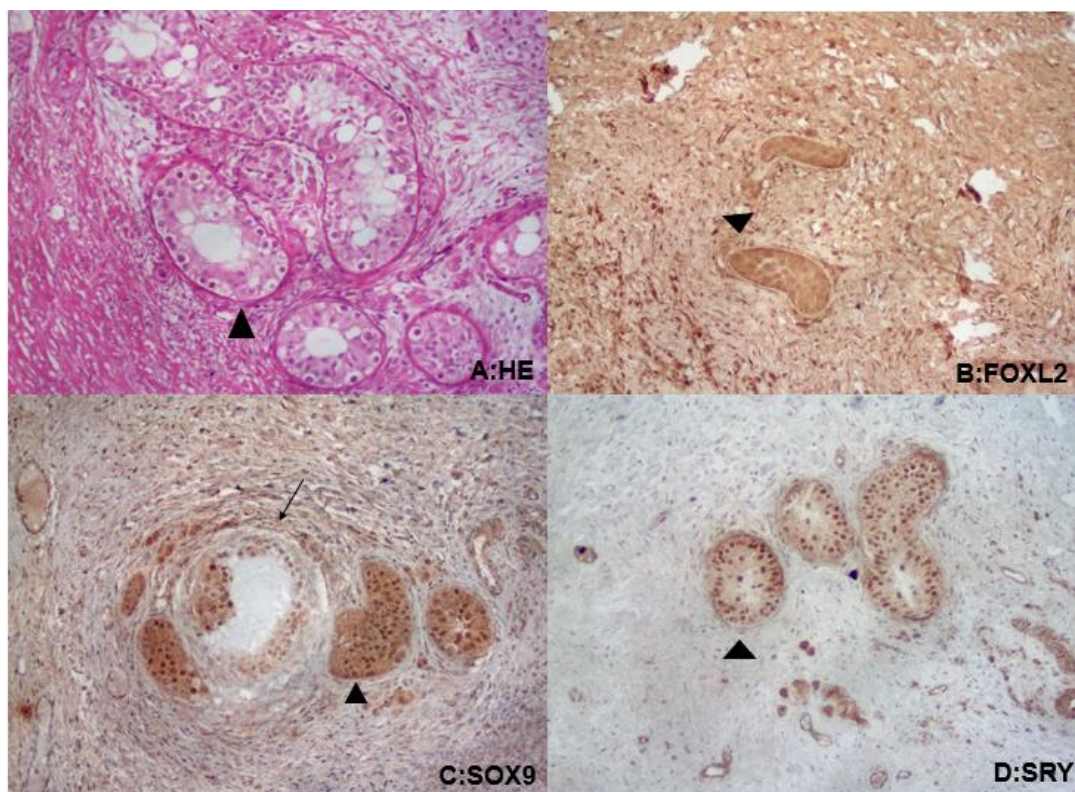
Pacientes 46,XY

Paciente A1 (ovotestis à direita, testículo à esquerda): No tecido ovotestis da primeira biópsia, observou-se FOXL2 positivo apenas em folículo ovariano (figura 26). Embora a expressão de SOX9 e SRY em túbulos seminíferos na primeira biópsia da gônada direita sejam esperadas em situações normais (figura 27) e a não positividade do SRY na segunda biópsia possa ser decorrente de questões técnicas (figura 28), chama a atenção o achado observado no ovotestis direito. Nela houve resultado positivo para SOX9 não somente em túbulos seminíferos, mas também em folículo ovariano (figura 27). O fato de SOX9 estar também positivo nesse folículo torna esse achado mais difícil ainda de interpretar, uma vez que há normalmente uma relação inversa na expressão desses dois genes, sendo o *FOXL2* expresso em tecido ovariano, mas não no testicular e o inverso ocorrendo em relação à expressão do *SOX9*.



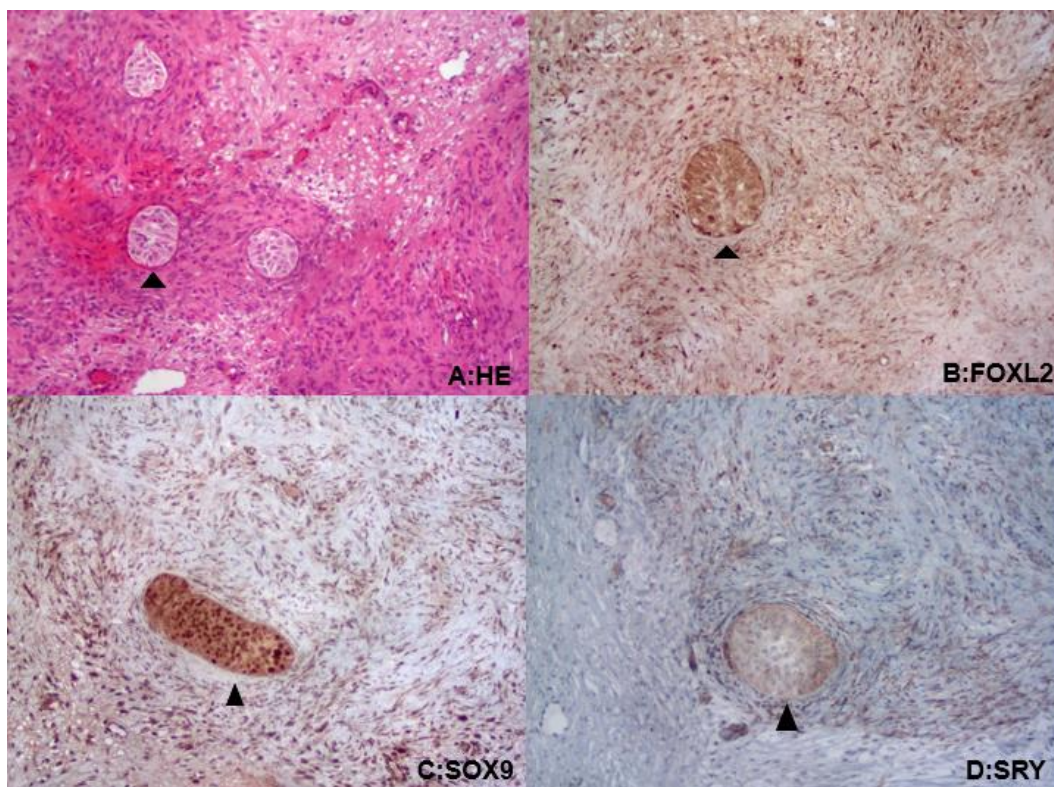
Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta e folículos ovarianos indicados pela seta, indicando ovotestis. A: ovotestis em coloração HE. B: FOX L2 positivo em folículo ovariano. C: SOX9 negativo em folículo ovariano. D: SRY baixo positivo em folículo ovariano. Aumento 100x.

Figura 26. Reação de imunoistoquímica da gônada direita (1ª biópsia) do paciente A1, tecido ovariano. Coloração de HE e imunoistoquímica da primeira biópsia da gônada direita (ovotestis) do paciente A1 (46,XY) com ênfase nos folículos ovarianos.



Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta e folículos ovarianos indicados pela seta, indicando ovotestis A: túbulos seminíferos em coloração HE. B: FOX L2 negativo em túbulos seminíferos. C: SOX9 positivo em túbulos seminíferos. D: SRY positivo em túbulos seminíferos. Aumento 100x.

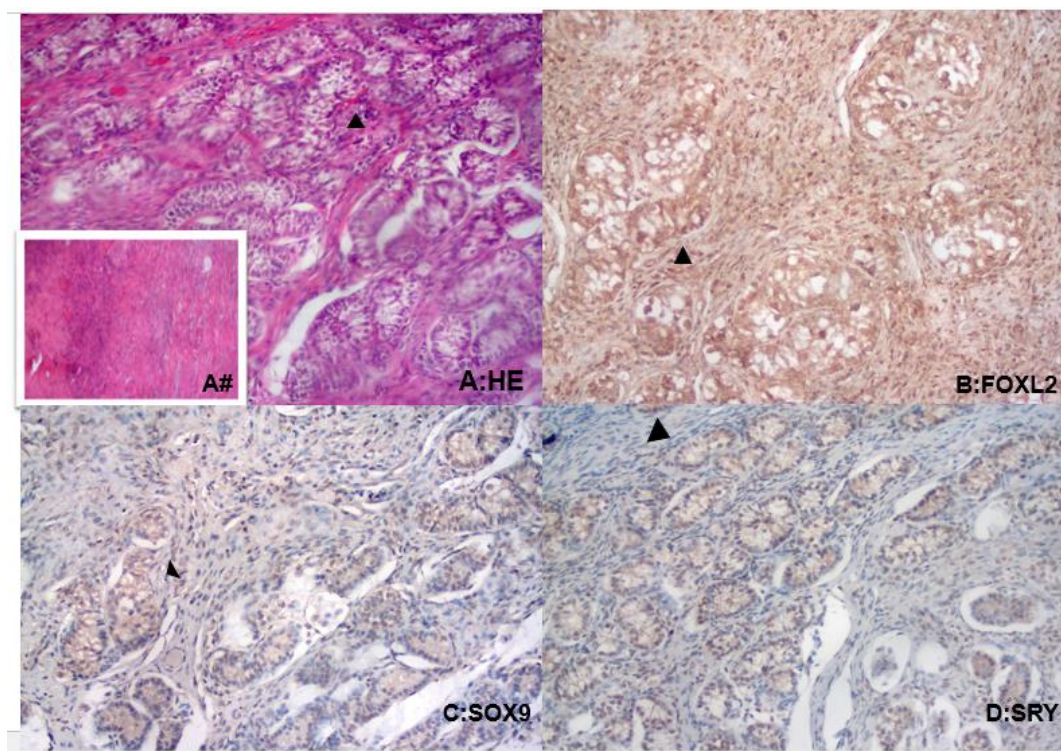
Figura 27. Reação de imunoistoquímica da gônada direita (1ª biópsia) do paciente A1, ênfase no tecido testicular. Coloração de HE e imunoistoquímica da primeira biópsia da gônada direita (ovotestis) do paciente A1 (46,XY) com ênfase nos túbulos seminíferos.



Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta. A: coloração HE. B: FOXL2 negativo em túbulos seminíferos. C: SOX9 positivo em túbulos seminíferos. D: SRY negativo em túbulos seminíferos. Aumento 100x.

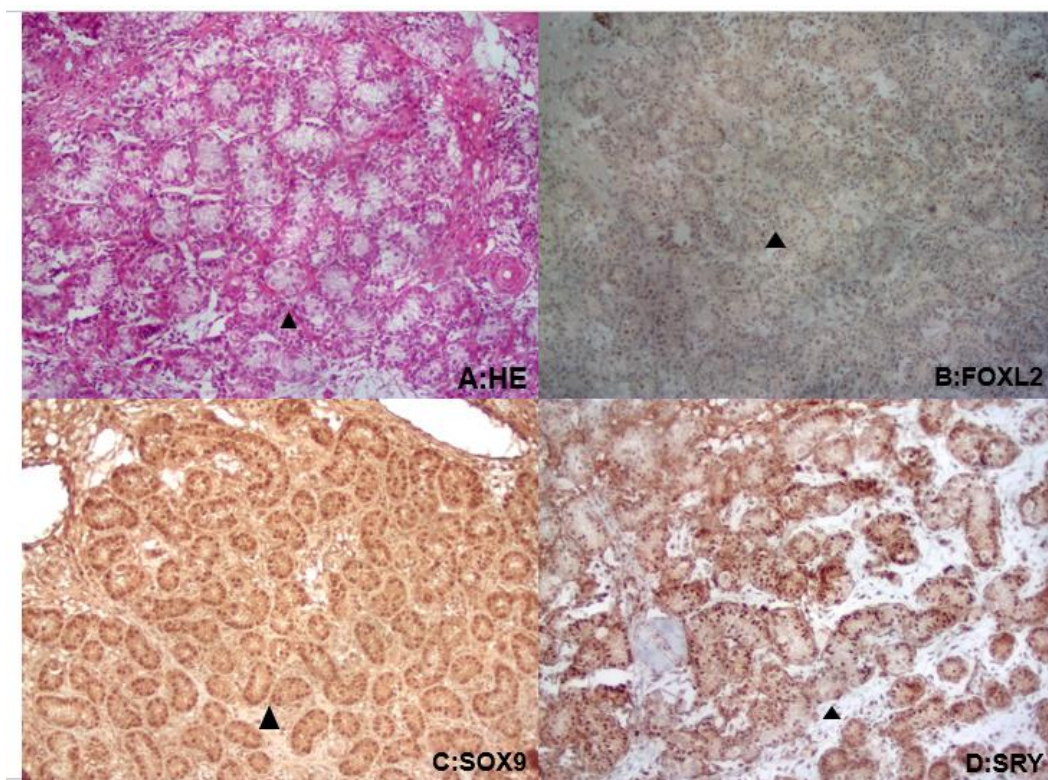
Figura 28. Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente A1. Coloração de HE e imunoistoquímica da segunda biópsia do gônada direita (ovotestis) do paciente A1 (46,XY) com ênfase nos túbulos seminíferos.

Paciente A2 (testículo à direita, gônada esquerda disgenética): Neste paciente, no qual a avaliação por HE para este trabalho não detectou folículos ovarianos à esquerda, mas apenas estroma do tipo ovariano, só foi possível analisar o tecido testicular em duas biópsias (figuras 29 e 30). Somente na segunda biópsia SOX9 foi positivo em túbulos seminíferos, assim como SRY (figura 30).



Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta. A: coloração HE. A#: estroma do tipo ovariano. B: FOX L2 negativo em túbulos seminíferos. C: SOX9 negativo em túbulos seminíferos. D: SRY fracamente positivo em túbulos seminíferos. Aumento 100x.

Figura 29. Reação de imunoistoquímica da gônada direita (1ª biópsia) do paciente A2. Coloração de HE e imunoistoquímica da primeira biópsia da gônada direita (testículo) do paciente A2 (46,XY), evidenciando apenas túbulos seminíferos.



Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta. A: coloração HE. B: FOX L2 negativo em túbulos seminíferos. C: SOX9 positivo em túbulos seminíferos. D: SRY positivo em túbulos seminíferos. Aumento 100x.

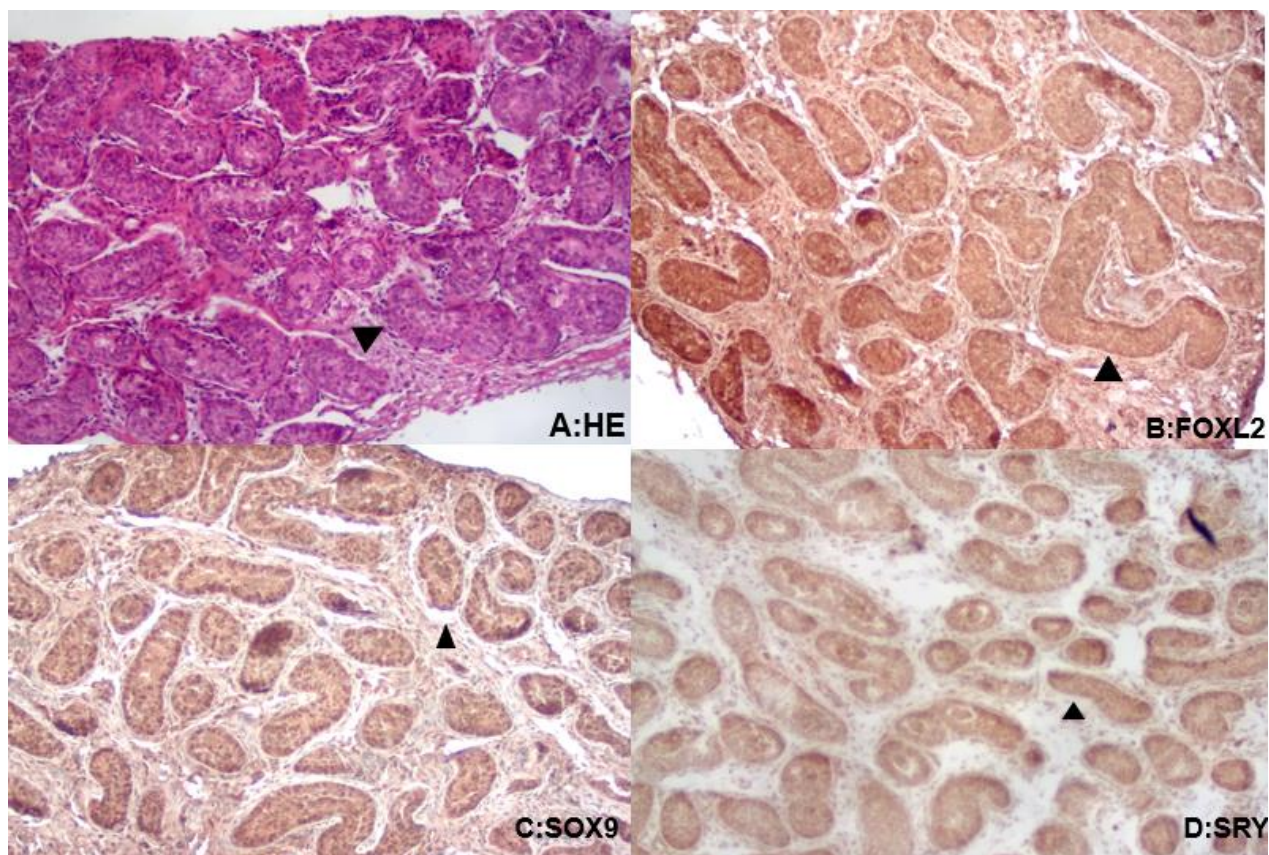
Figura 30. Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente A2. Coloração de HE e imunoistoquímica da segunda biópsia da gônada direita (testículo) do paciente A2 (46,XY), evidenciando apenas túbulos seminíferos.

Uma vez que o diagnóstico de DDS-OT na paciente A2 não foi corroborado pelas revisões de lâminas, a discussão da imunoistoquímica nos casos com cariótipo 46,XY limita-se à paciente A1, na qual chama a atenção a co-expressão de SOX9 e FOX L2 em folículo ovariano, que não foi observada em outros estudos (116). Este achado é de difícil compreensão, uma vez que há normalmente uma relação inversa na expressão desses dois genes, sendo o FOX L2 expresso em tecido ovariano, mas não no testicular, e o inverso ocorre em relação à expressão do SOX9. Esses achados dependem, porém, de comprovação futura com outra técnica, como o RNA-seq.

Caso seja confirmada a co-expressão desses genes no tecido ovariano, será importante que essa investigação imunoistoquímica seja realizada em outras amostras de DDS-OT.

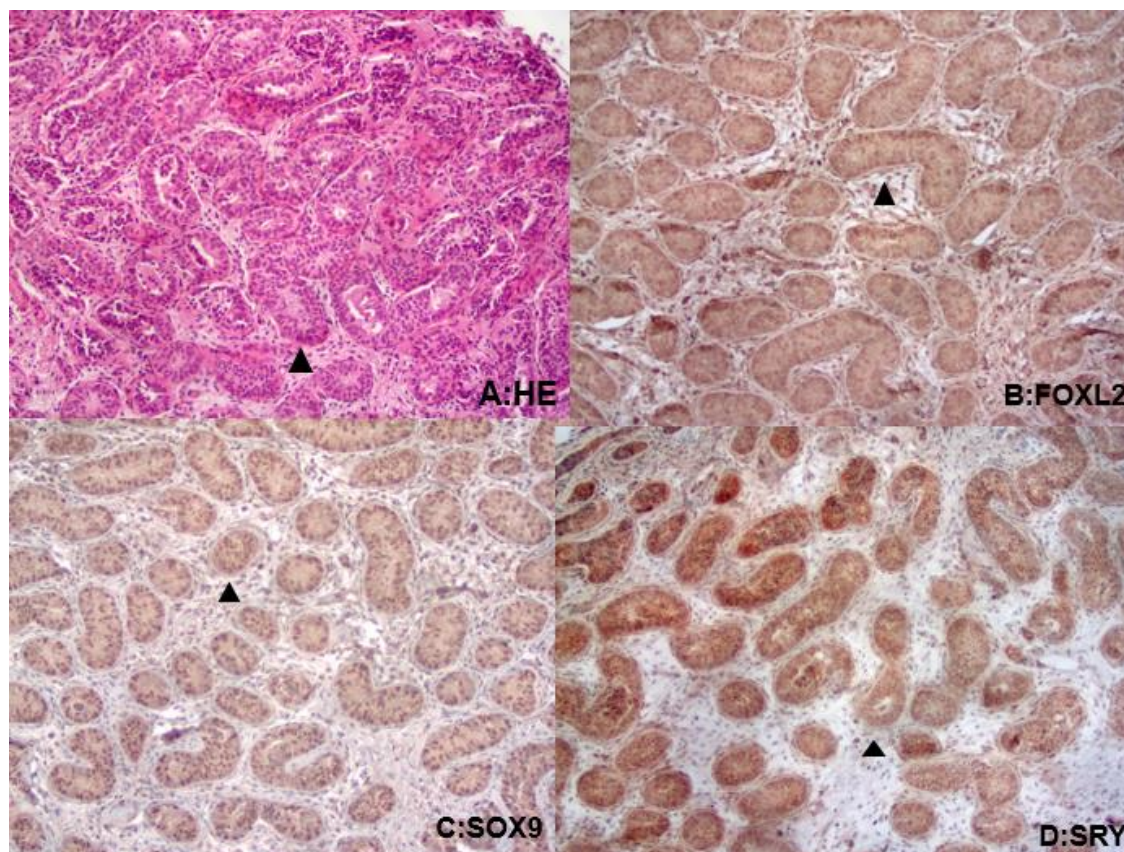
Pacientes 46,XX

Paciente B1 (testículo à direita, ovotestis à esquerda): Neste paciente, no qual uma duplicação do gene *SOX3* foi detectada por CMA, *FOXL2* foi positivo somente nos folículos ovarianos do ovotestis, enquanto que a expressão de *SOX9* foi detectada somente nos túbulos seminíferos em duas das três lâminas analisadas, uma do testículo e outra do ovotestis, expressão essa que condiz com a esperada nesses dois tipos de tecido (figura 31 e 32). Por outro lado, *SRY* foi negativo em túbulos seminíferos na gônada esquerda da segunda biópsia (figura 32), e fortemente positivo em folículos ovarianos (figura 33), achados esses inesperados não só por não haver sido detectado *SRY* em DNA de sangue periférico, mas também pelo achado em folículos ovarianos.



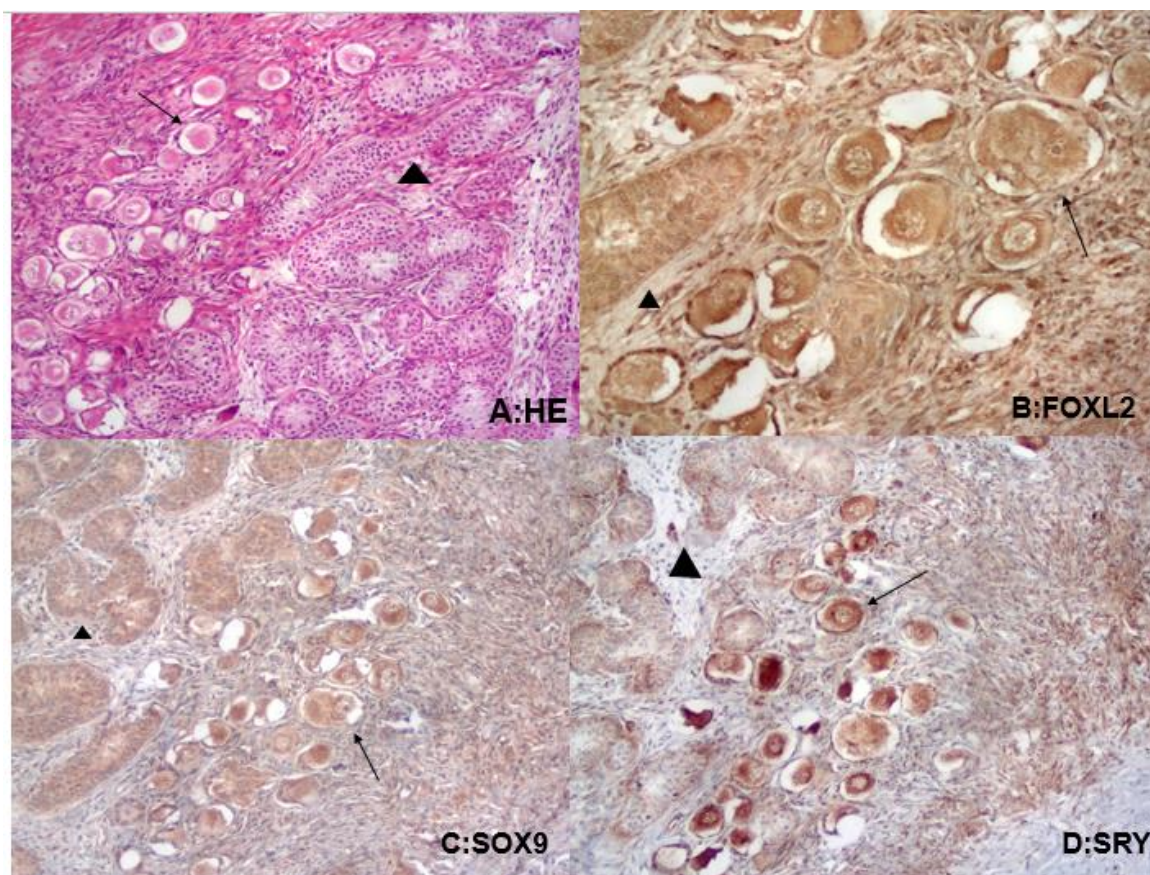
Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta. A: coloração HE. B: FOXL2 negativo em túbulos seminíferos. C: SOX9 positivo em túbulos seminíferos. D: SRY negativo em túbulos seminíferos (marcação citoplasmática). Aumento 100x.

Figura 31. Reação de imunoistoquímica da gônada direita (1ª biópsia) do paciente B1, ênfase no tecido testicular. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada direita (testículo) da primeira biópsia do paciente B1 (46,XX), evidenciando apenas túbulos seminíferos.



Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta. A: coloração HE. B: FOX L2 negativo em túbulos seminíferos. C: SOX9 positivo em túbulos seminíferos. D: SRY negativo em túbulos seminíferos (marcação citoplasmática). Aumento 100x.

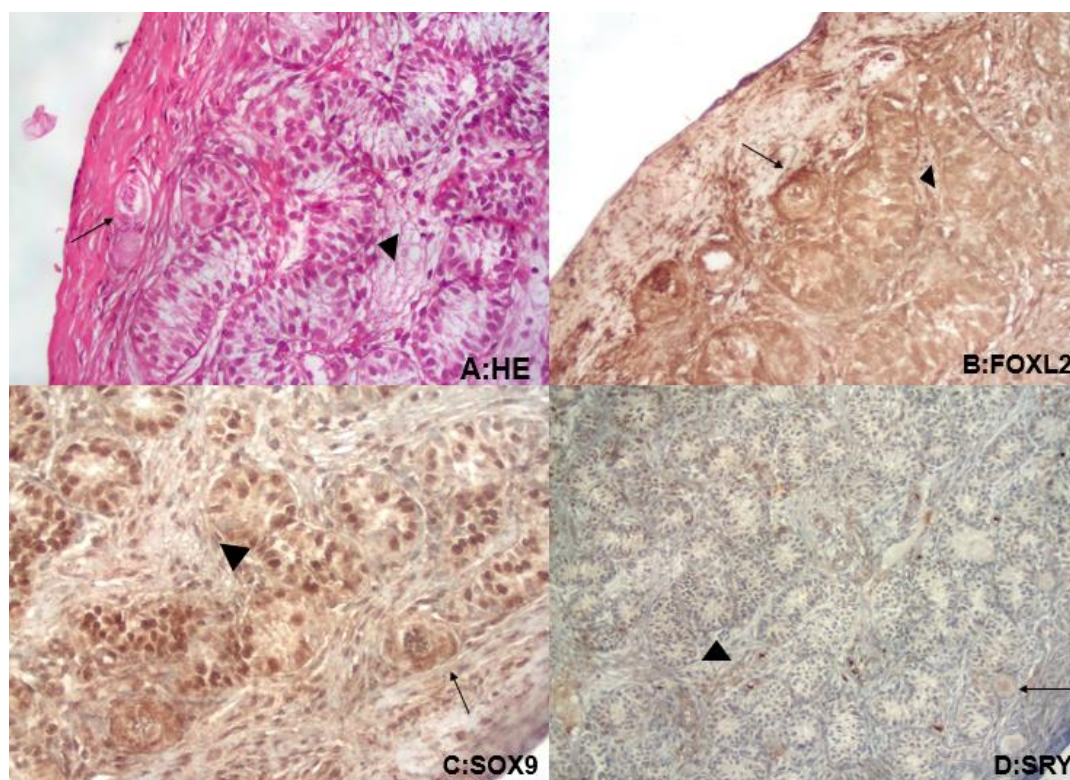
Figura 32. Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (1ª biópsia) do paciente B1, ênfase no tecido testicular Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada esquerda (ovotestis) da primeira biópsia do paciente B1 (46,XX), evidenciando apenas os túbulos seminíferos.



Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta e folículos ovarianos indicados pela seta. A: coloração HE. B: FOX L2 positivo em folículos ovarianos. C: SOX9 negativo em folículos ovarianos e em túbulos seminíferos. D: SRY positivo em folículos ovarianos. Aumento 100x.

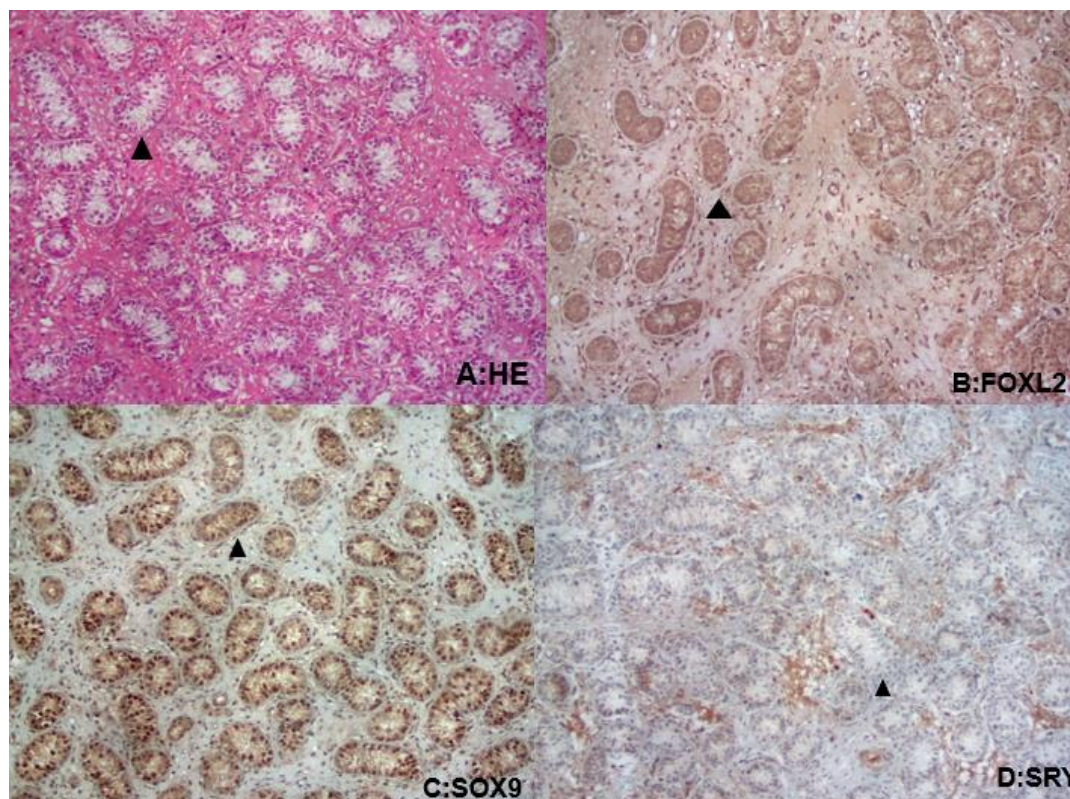
Figura 33. Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (2ª biópsia) do paciente B1. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada esquerda (ovotestis) da segunda biópsia do paciente B1 (46,XX), evidenciando túbulos seminíferos e folículos ovarianos.

Paciente B2 (ovotestis à direita e ovotestis à esquerda): Nesta paciente FOX L2 foi positivo somente em folículos ovarianos. SOX9 foi positivo em duas das quatro lâminas de túbulos seminíferos (figuras 34 e 35); foi ainda fracamente positivo em folículos ovarianos (34, 36 e 38). O SRY positivo em duas lâminas de túbulos seminíferos (figuras 37 e 39).



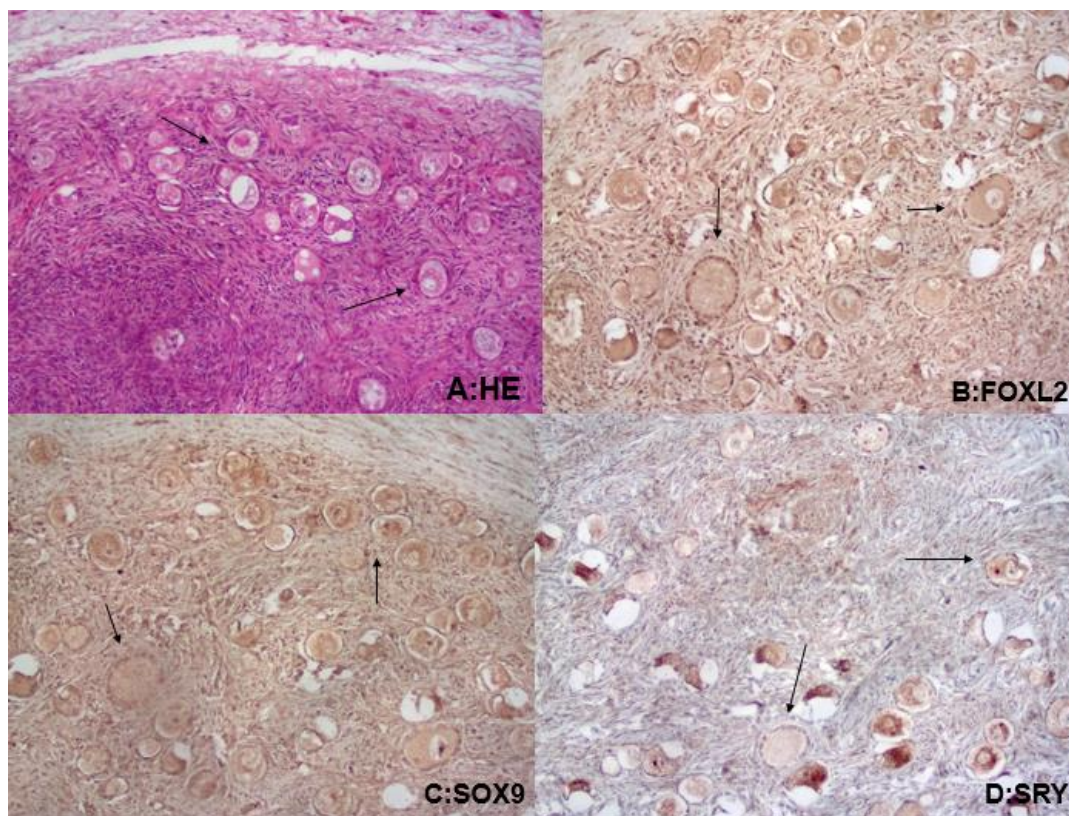
Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta e folículos ovarianos indicados pela seta. A: coloração HE. B: FOX L2 negativo em túbulos seminíferos e positivo em folículos ovarianos. C: SOX9 positivo em túbulos seminíferos e fracamente positivo em folículo ovariano. D: SRY negativo. Aumento 100x (A, B e C) e 40x (D).

Figura 34. Reação de imunoistoquímica da gônada direita (1ª biópsia) do paciente B2. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada direita (ovotestis) da primeira biópsia do paciente B2 (46,XX), evidenciando túbulos seminíferos e folículos ovarianos.



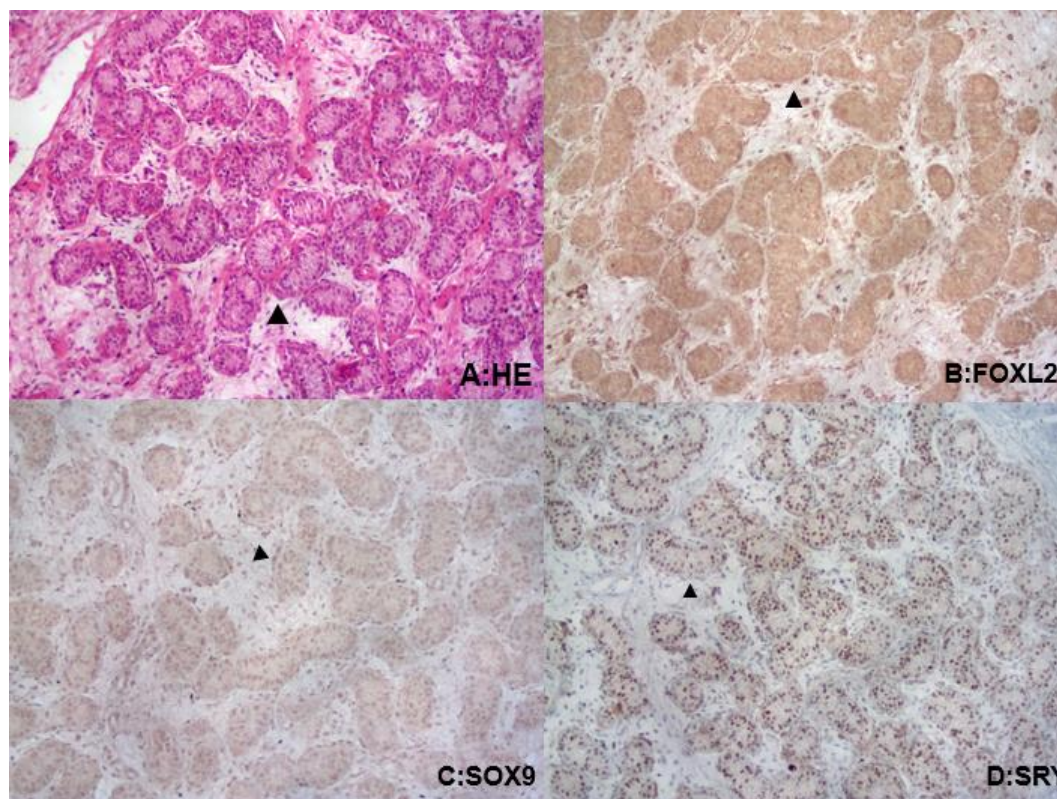
Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta. A: coloração HE. B: FOXL2 negativo em túbulos seminíferos. C: SOX9 positivo em túbulos seminíferos. D: SRY negativo em túbulos seminíferos. Aumento 40x.

Figura 35. Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (1ª biópsia) do paciente B2. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada esquerda (testículo) da primeira biópsia do paciente B2 (46,XX), evidenciando os túbulos seminíferos.



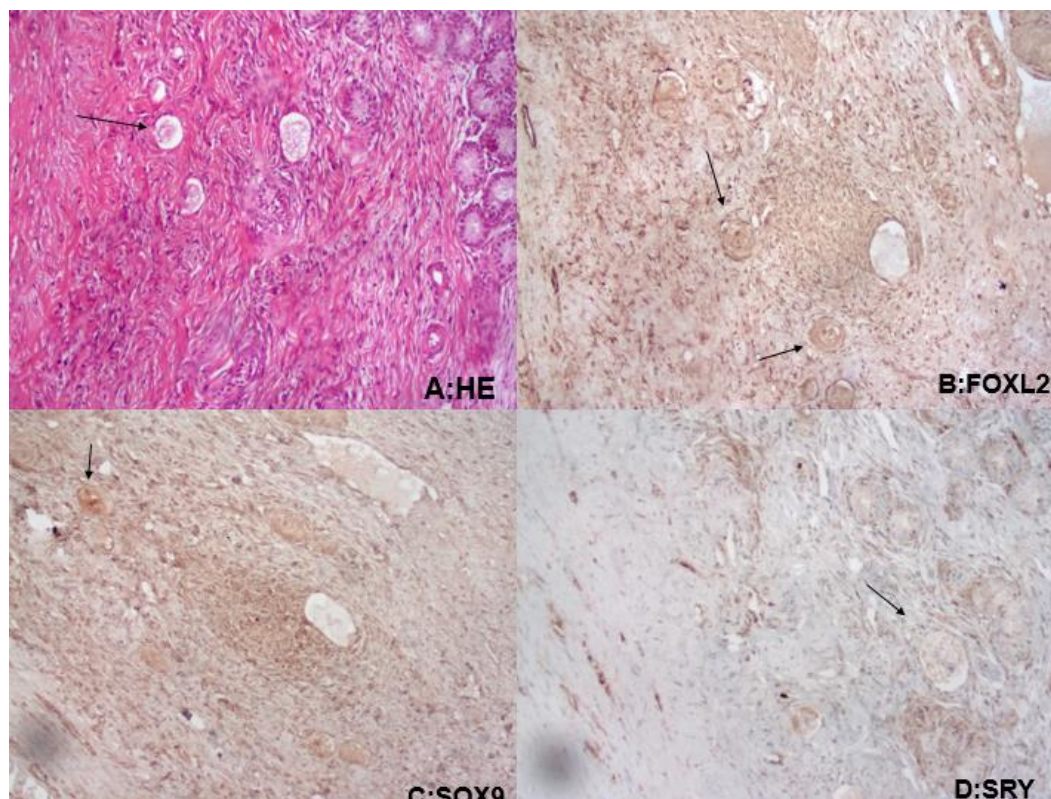
Folículos ovarianos indicados pela seta. A: coloração HE. B: FOXL2 positivo. C: SOX9 fracamente positivo em folículo ovariano. D: SRY negativo. Aumento 40x.

Figura 36. Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente B2, ênfase em tecido ovariano. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada direita (ovotestis) da segunda biópsia do paciente B2 (46,XX), evidenciando tecido ovariano.



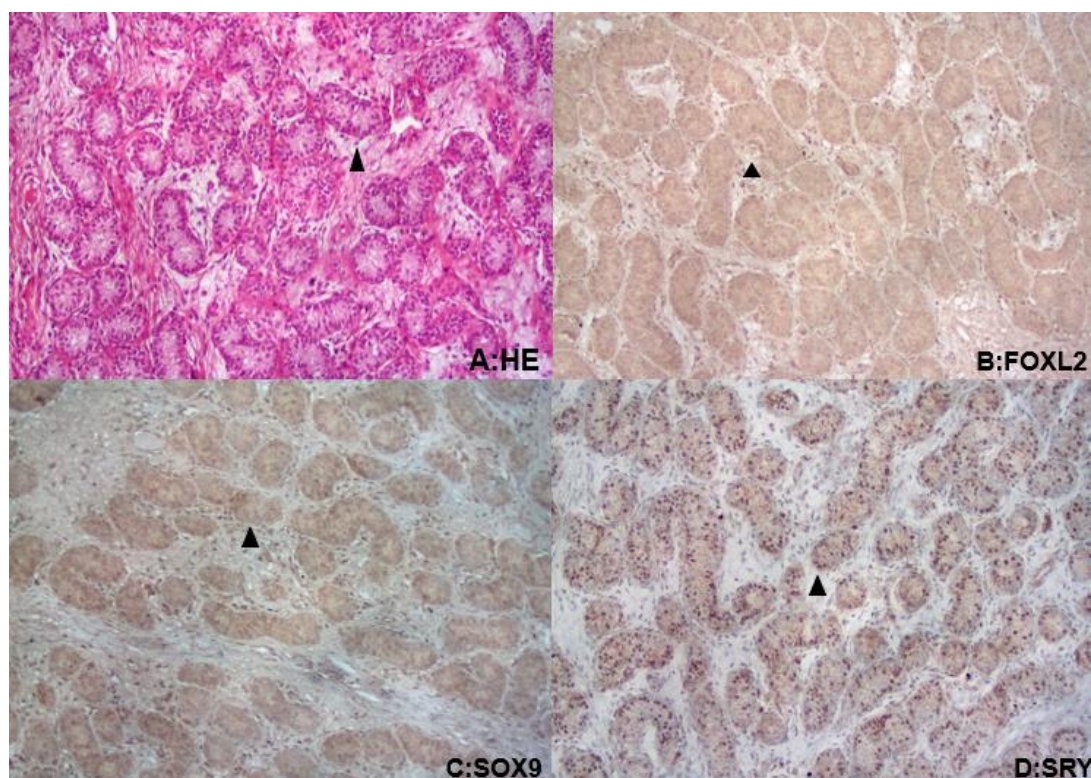
Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta. A: coloração HE. B: FOX L2 negativo. C: SOX9 negativo. D: SRY positivo. Aumento 40x.

Figura 37. Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente B2, ênfase no tecido testicular. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada direita (ovotestis) da segunda biópsia do paciente B2 (46,XX) evidenciando os túbulos seminíferos.



Folículos ovarianos indicados pela seta. A: coloração HE. B: FOXL2 positivo. C: SOX9 fracamente positivo em folículo ovariano. D: SRY negativo. Aumento 40x.

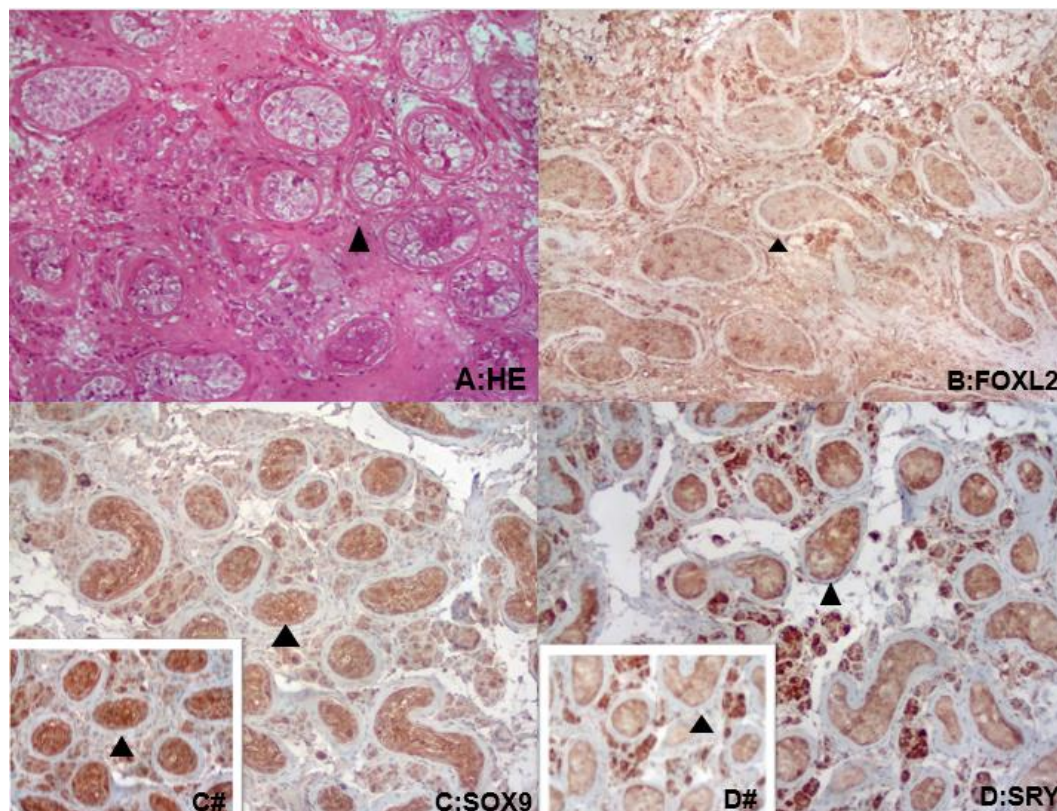
Figura 38. Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (2ª biópsia) do paciente B2, ênfase no tecido ovariano. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada esquerda da segunda biópsia do paciente B2 (46,XX), evidenciando folículos ovarianos.



Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta. A: coloração HE. B: FOXL2 negativo. C: SOX9 negativo. D: SRY positivo. Aumento 40x.

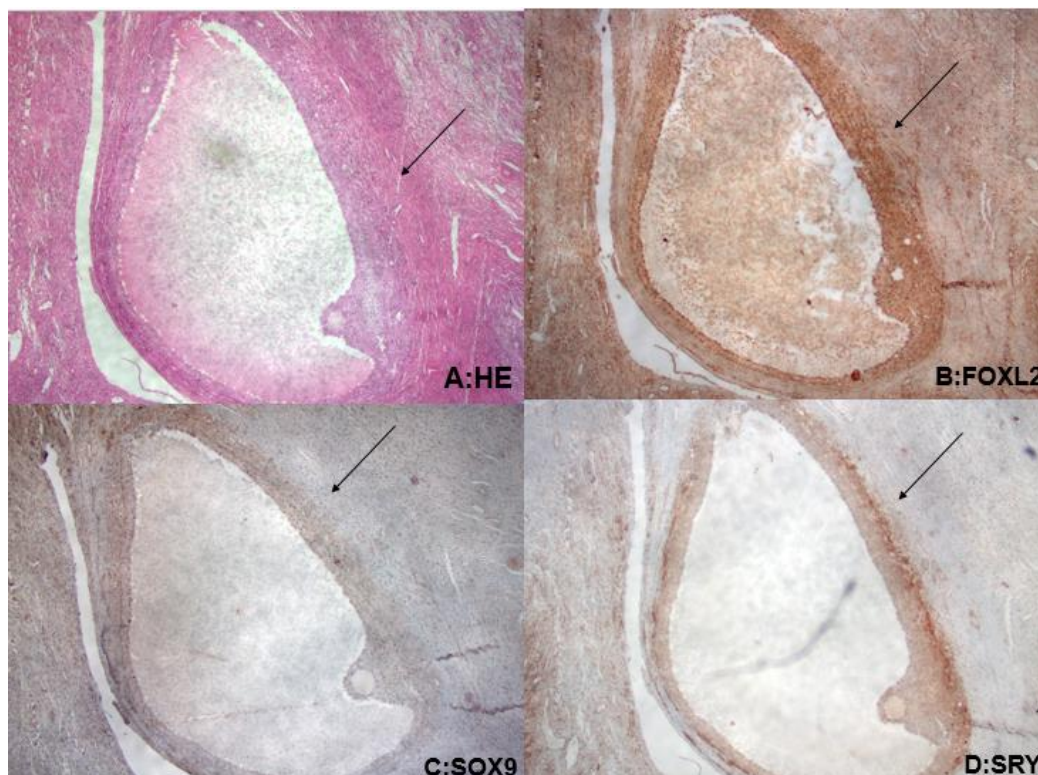
Figura 39. Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (2ª biópsia) do paciente B2, ênfase no tecido testicular. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada esquerda da segunda biópsia do paciente B2 (46,XX) evidenciando os túbulos seminíferos.

Paciente B3 (testículo à direita e ovotestis à esquerda): Neste paciente FOXL2 foi positivo apenas nos folículos ovarianos. Houve resultado negativo de SOX9 e SRY em túbulos seminíferos da gônada esquerda (figura 40). Ademais, observou-se SRY fracamente positivo em folículo ovariano (figura 41).



Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta. A: coloração HE. B: FOXL2 negativo. C: SOX9 negativo. C#: aumento 100x para evidenciar SOX9 negativo nos núcleos de túbulos seminíferos com marcação citoplasmática. D: SRY negativo. D# aumento 100x para evidenciar SRY negativo nos núcleos de túbulos seminíferos com marcação citoplasmática Aumento 40x.

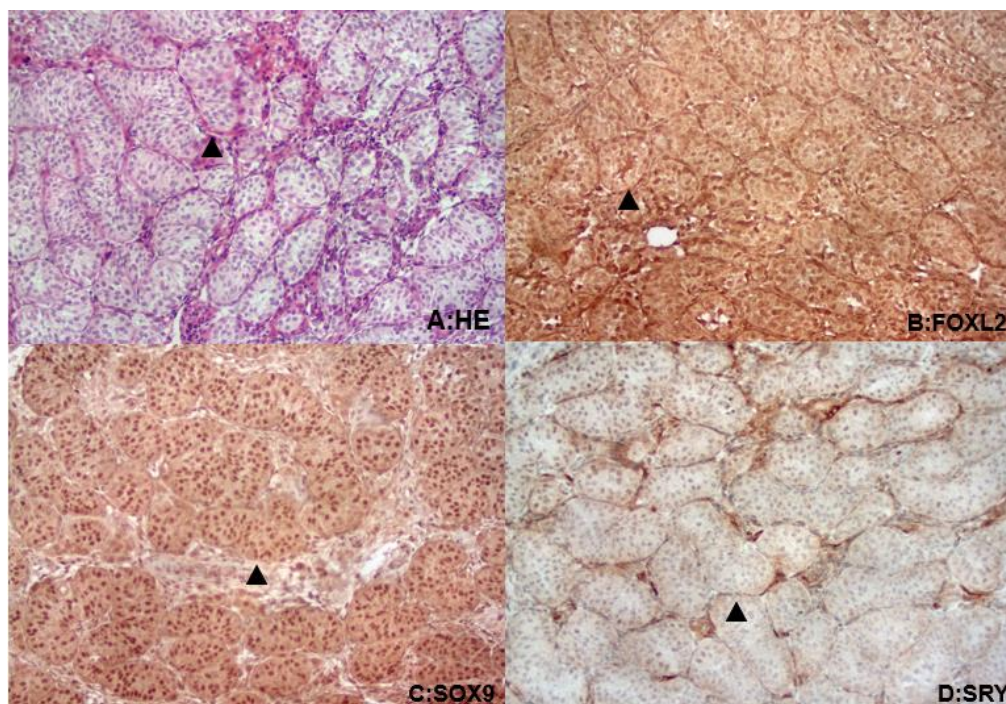
Figura 40. Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda do paciente B3, ênfase no tecido testicular. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada esquerda (ovotestis) do paciente B3 (46,XX) evidenciando os túbulos seminíferos,



Folículo maduro indicados pela seta. A: coloração HE. B: FOX L2 positivo. C: SOX9 negativo. D: SRY fracamente positivo. Aumento 20x.

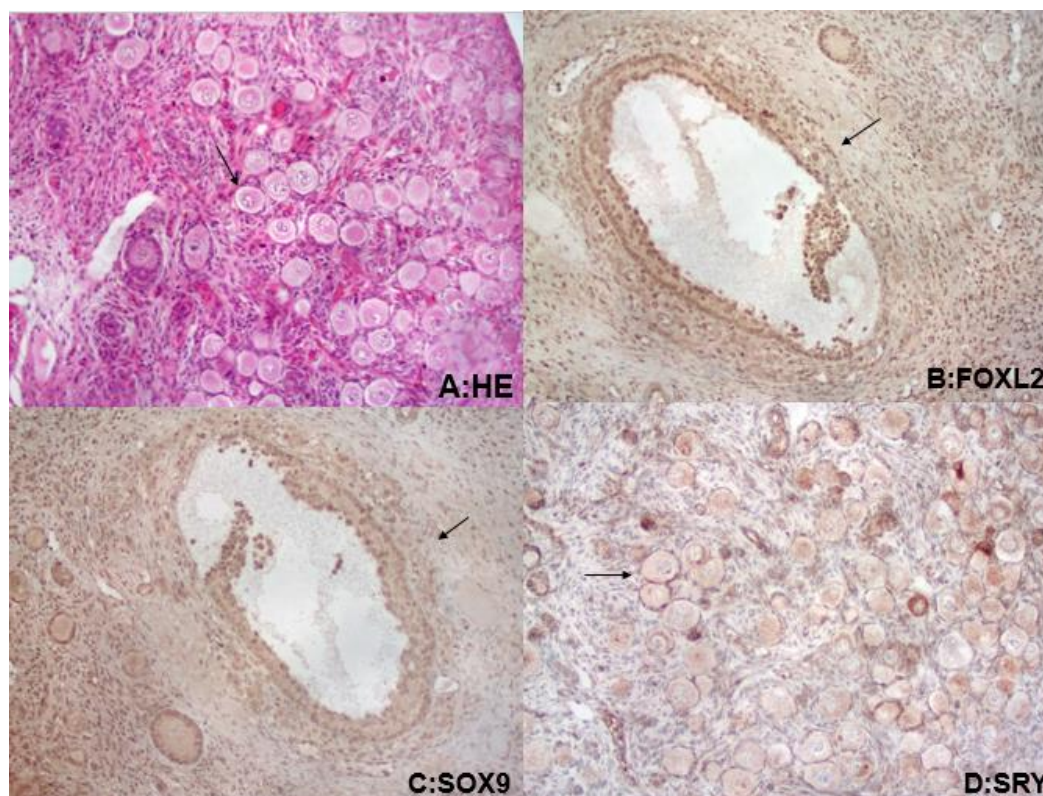
Figura 41. Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda do paciente B3, ênfase no tecido ovariano. Coloração de HE e imunoistoquímica biópsia da gônada esquerda (ovotestis) do paciente B3 (46,XX), evidenciando os folículos ovarianos.

Paciente B4 (ovotestis à direita e ovário à esquerda): Apresentou positividade de FOX L2 em folículos ovarianos e de SOX9 não só nas duas lâminas de túbulos seminíferos (figuras 37 e 40) mas também em alguns folículos ovarianos (figura 39); já o SRY foi negativo em todas as lâminas analisadas (figuras 37-40).



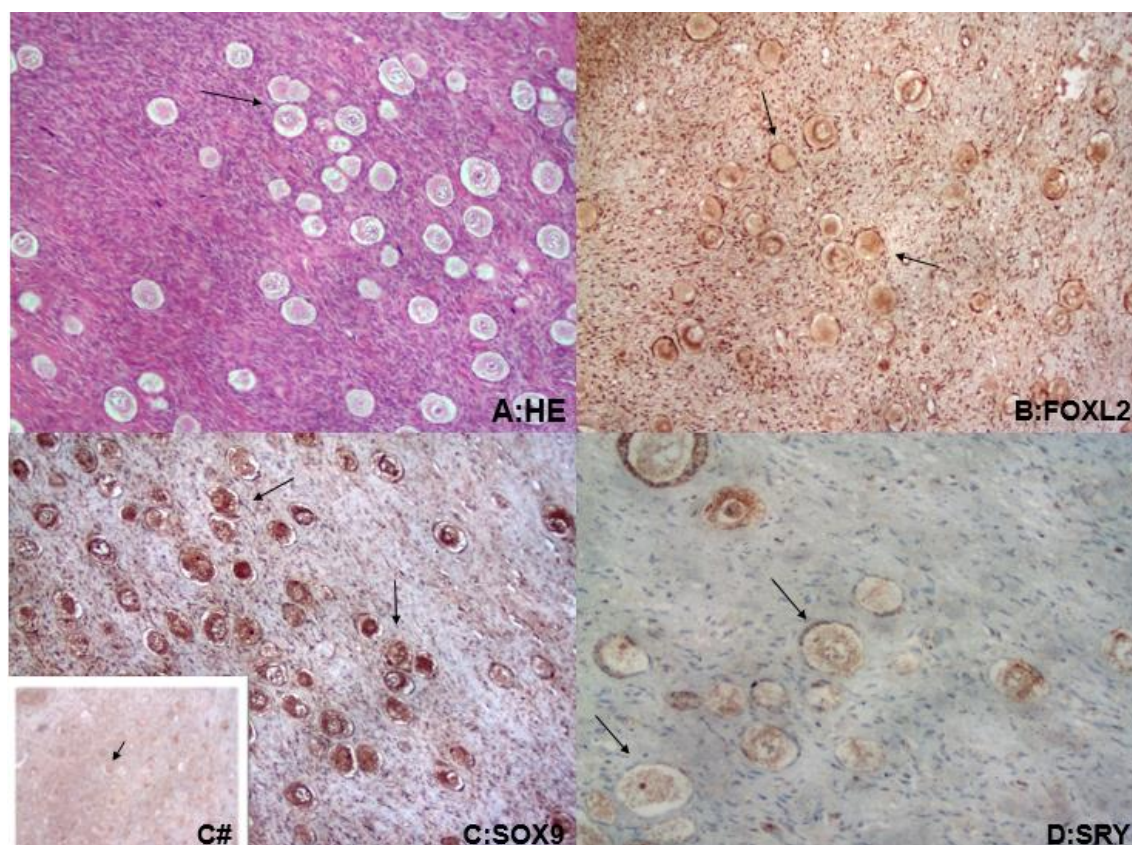
Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta. A: coloração HE. B: FOXL2 negativo. C: SOX9 positivo. D: SRY negativo. Aumento 40x.

Figura 42. Reação de imunoistoquímica da gônada direita (1ª biópsia) do paciente B4, ênfase no tecido testicular. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada direita (testículo) da primeira biópsia da paciente B4 (46,XX) evidenciando os túbulos seminíferos.



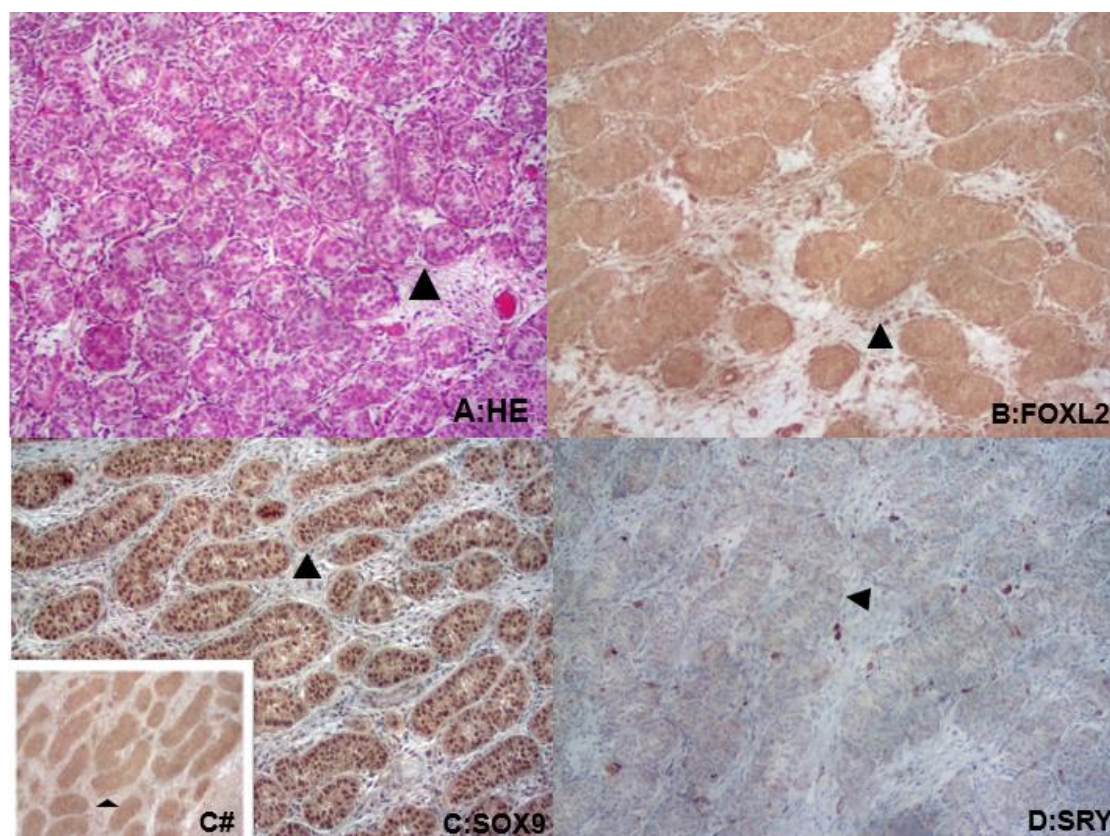
Folículos ovarianos indicados pela seta. A: coloração HE. B: FOX L2 positivo. C: SOX9 negativo. D: SRY negativo. Aumento 40x (A e D) e 20x (B e C).

Figura 43. Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (1ª biópsia) do paciente B4, ênfase no tecido ovariano. Coloração de HE e imunoistoquímica biópsia da gônada esquerda (ovário) da primeira biópsia da paciente B4 (46,XX), evidenciando os folículos ovarianos.



Folículos ovarianos indicados pela seta. A: coloração HE. B: FOX L2 positivo. C: SOX9 positivo. C# SOX9 negativo em alguns folículos ovarianos. D: SRY negativo. Aumento 20x (A, B e C) e 40x (D).

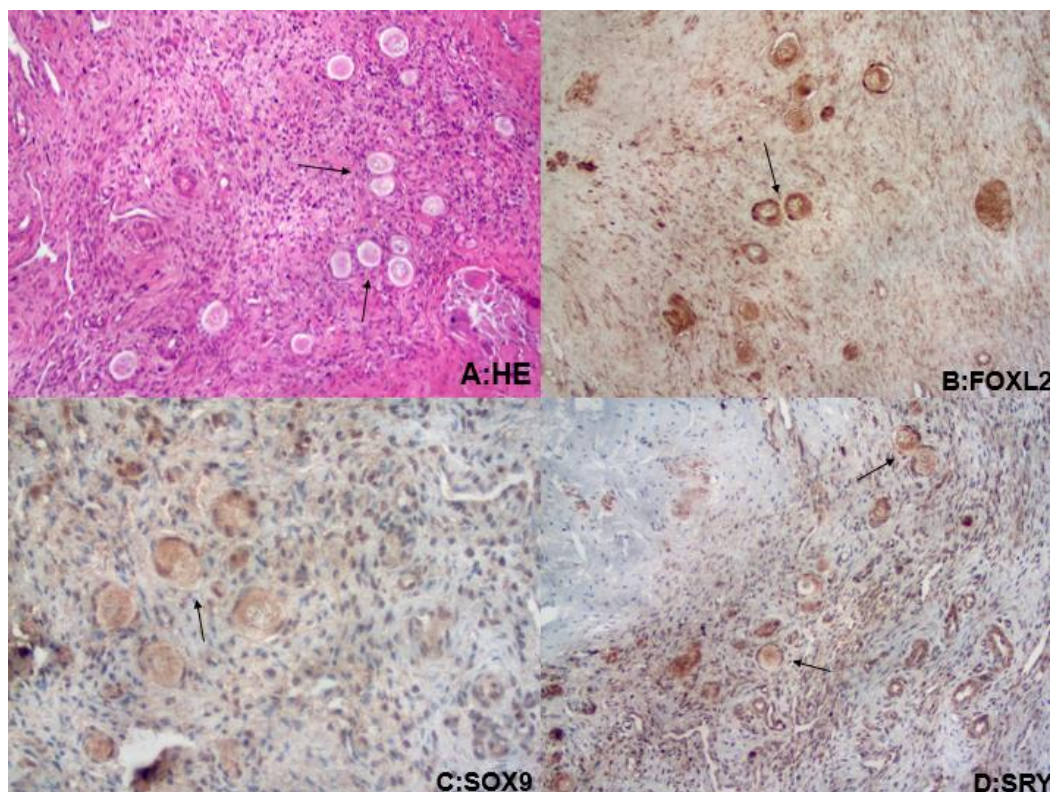
Figura 44. Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente B4, ênfase no tecido ovariano. Coloração de HE e imunoistoquímica biópsia da gônada direita (ovotestis) da segunda biópsia do paciente B4 (46,XX), evidenciando tecido ovariano.



Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta. A: coloração HE. B: FOX L2 negativo. C: SOX9 positivo. C#: SOX9 negativo em alguns túbulos seminíferos. D: SRY negativo. Aumento 40x.

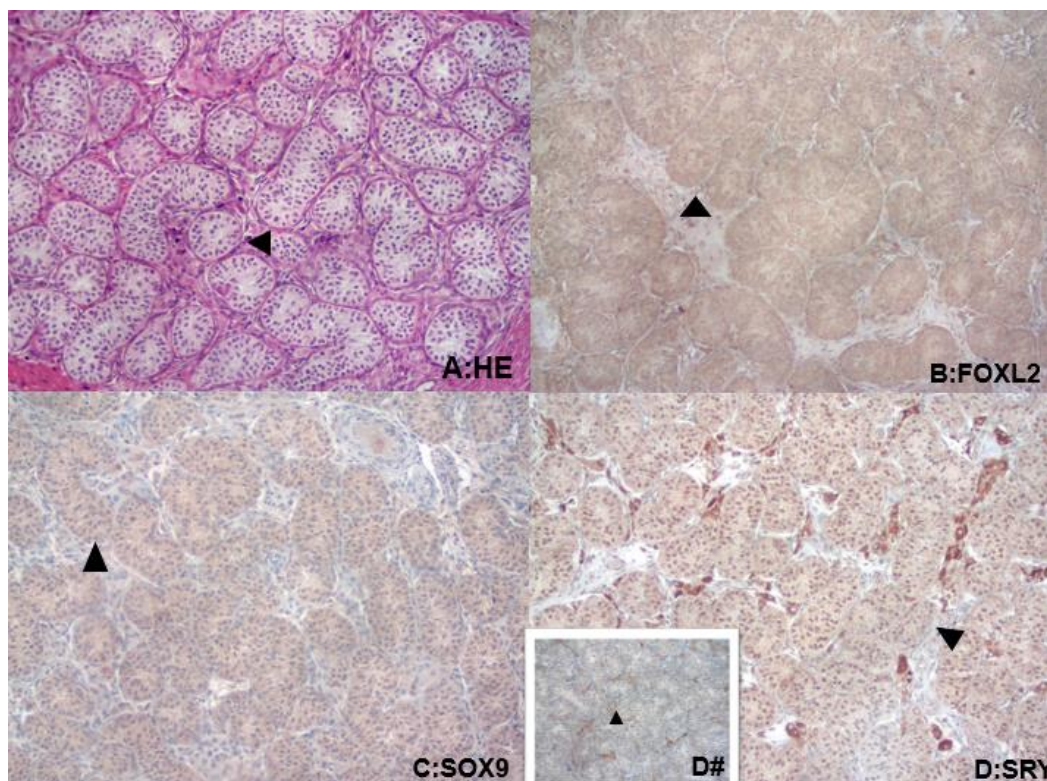
Figura 45. Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente B4, ênfase no tecido testicular. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada direita (ovotestis) da segunda biópsia do paciente B4 (46,XX) evidenciando os túbulos seminíferos.

Paciente B5 (ovotestis à direita): FOX L2 foi positivo nos folículos ovarianos e houve resultado positivo de SRY em túbulos seminíferos e fracamente positivo em folículos ovarianos, sendo que em ambos os tecidos SOX9 foi negativo (figuras 46 e 47).



Folículos ovarianos indicados pela seta. A: coloração HE. B: FOX L2 positivo. C: SOX9 negativo. D: SRY fracamente positivo. Aumento 40x.

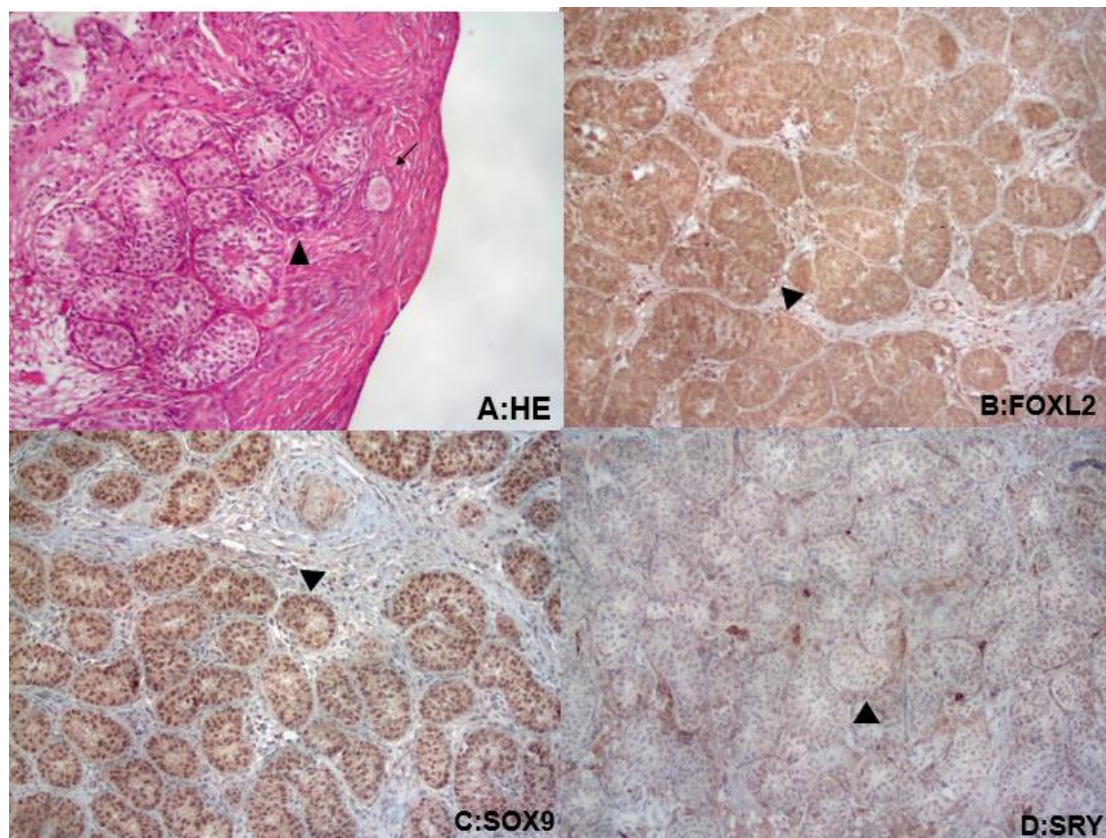
Figura 46. Reação de imunoistoquímica da gônada direita do paciente B5, ênfase no tecido ovariano. Coloração de HE e imunoistoquímica biópsia da gônada direita da paciente B5 (46,XX), evidenciando folículos ovarianos.



Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta. A: coloração HE. B: FOX L2 negativo. C: SOX9 negativo. D: SRY positivo. D#: SRY negativo em alguns túbulos seminíferos Aumento 40x.

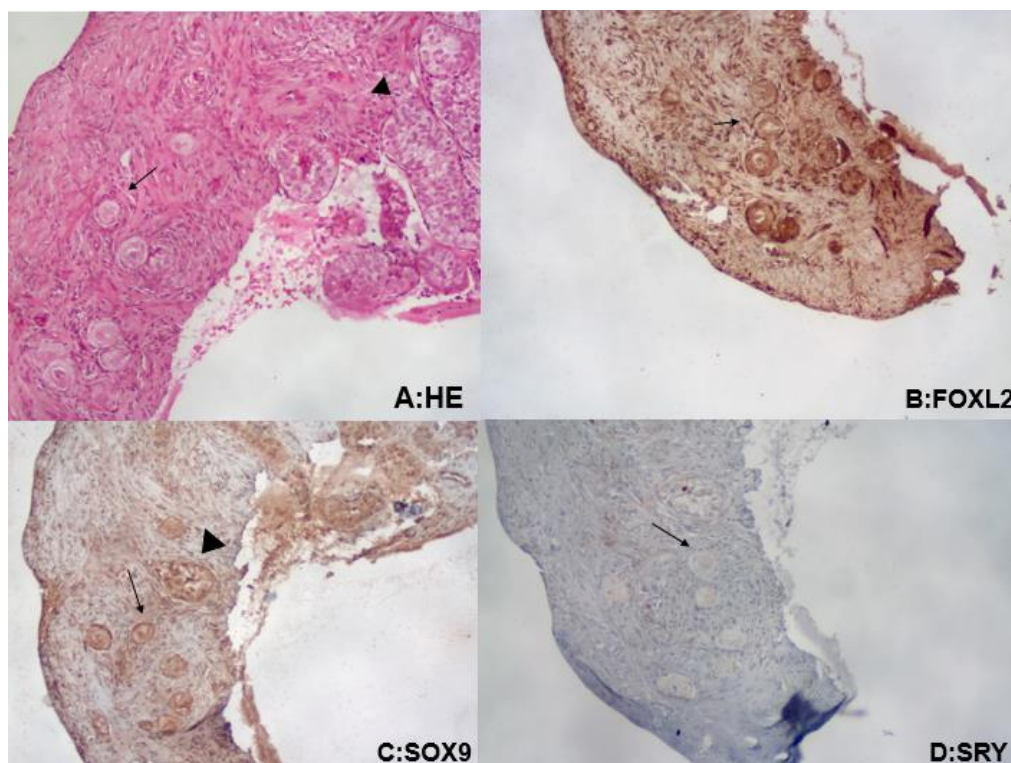
Figura 47. Reação de imunoistoquímica da gônada direita do paciente B5, ênfase no tecido testicular. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada direita (ovotestis) da paciente B5 (46,XX) evidenciando túbulos seminíferos.

Paciente B6 (ovotestis bilateralmente): FOX L2 foi positivo nos folículos ovarianos. Por sua vez, SOX9 foi positivo não só em três das quatro lâminas de túbulos seminíferos (figuras 48, 49, 50, 53 e 54), mas também fracamente positivo em folículo ovariano (figura 49) e positivo em folículo ovariano, com marcação evidente (figura 53). Neste caso chama a atenção ainda SRY positivo em folículos ovarianos na gônada direita (figura 51) da segunda biópsia, e também em túbulos seminíferos da gônada direita e esquerda (figuras 52 e 54).



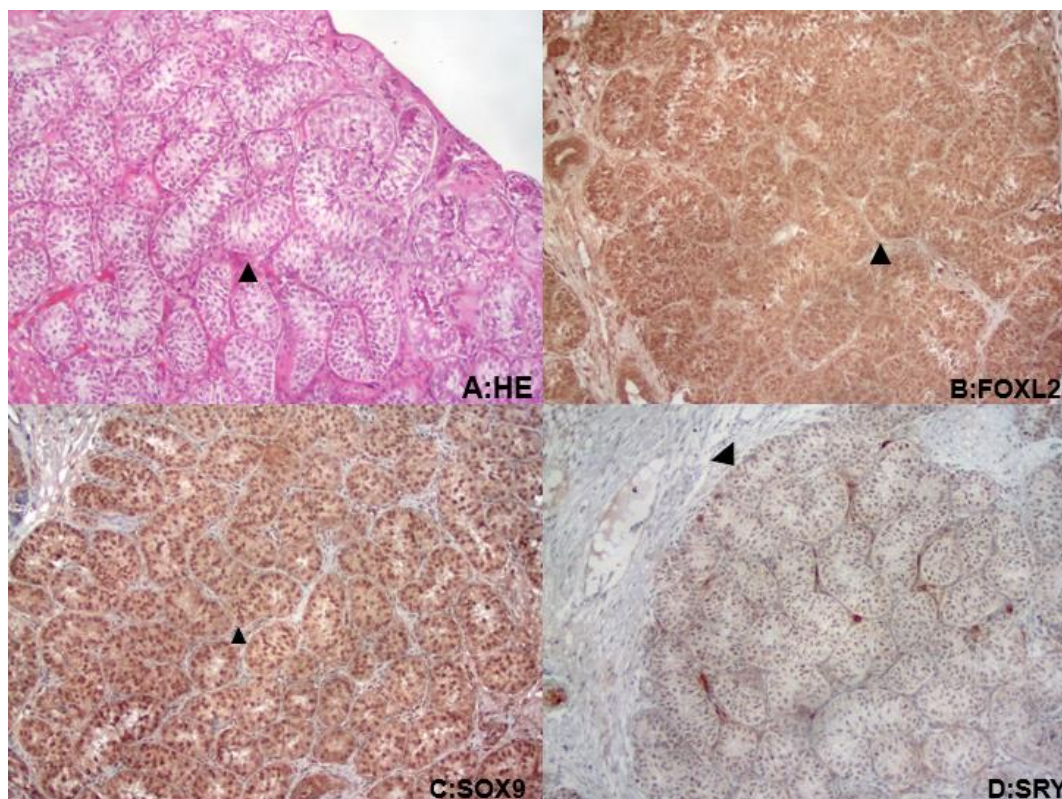
Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta e folículo ovariano indicado pela seta. A: coloração HE. B: FOX L2 negativo. C: SOX9 positivo. D: SRY negativo. Aumento 40x.

Figura 48. Reação de imunoistoquímica da gônada direita (1ª biópsia) do paciente B6. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada direita da primeira biópsia do paciente B6 (46,XX) evidenciando tecido ovotestis.



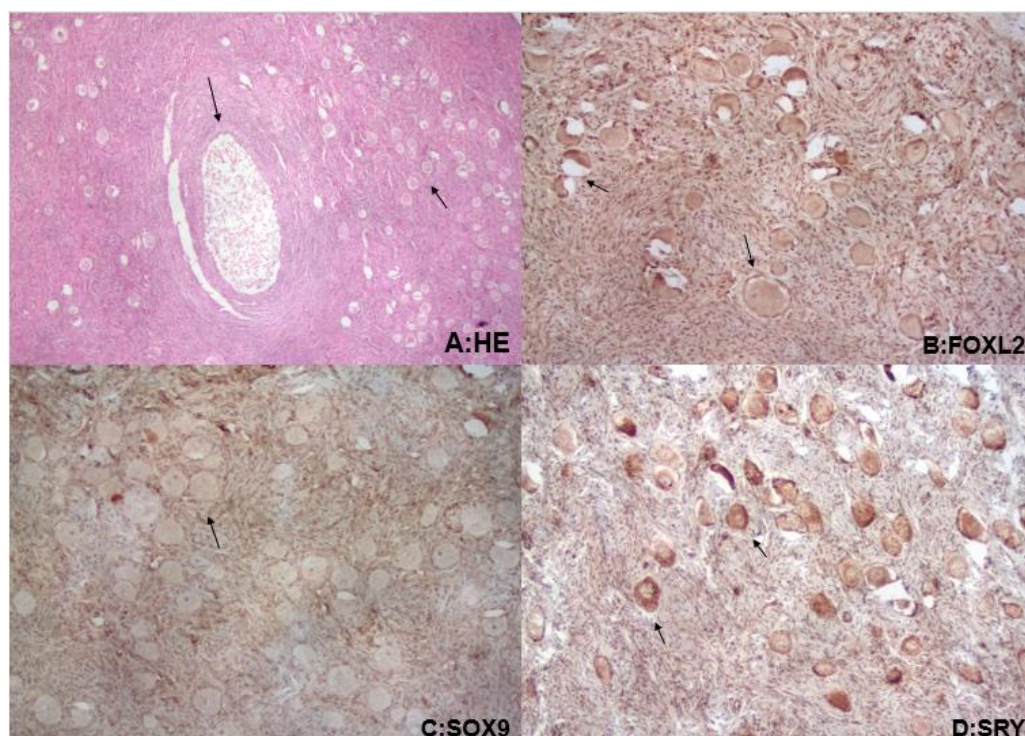
Túbulos seminífero indicados pela cabeça de seta e folículos ovarianos indicados pela seta. A: coloração HE. B: FOXL2 positivo em folículos ovarianos. C: SOX9 positivo em túbulo seminífero e em fracamente positivo em folículo ovariano. D: SRY negativo em folículos ovarianos. Aumento 40x.

Figura 49. Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (1ª biópsia) do paciente B6, ênfase no tecido ovariano. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada esquerda da primeira biópsia do paciente B6 (46,XX), evidenciando tecido ovotestis.



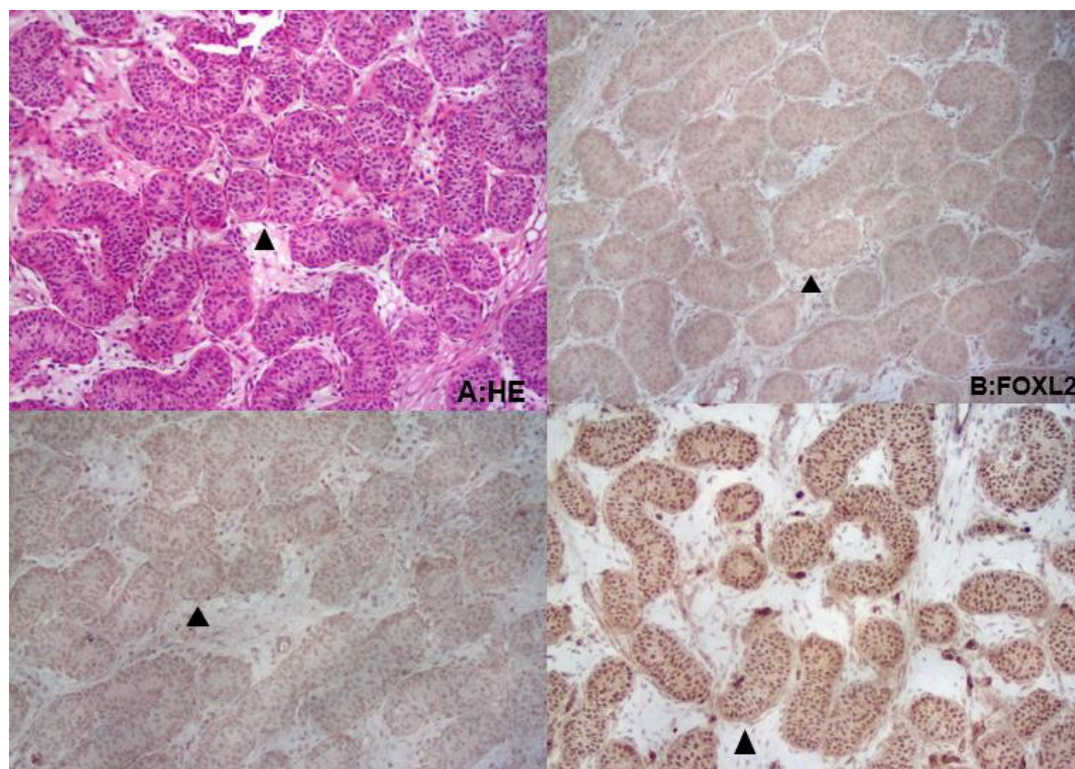
Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta. A: coloração HE. B: FOXL2 negativo. C: SOX9 positivo. D: SRY negativo. Aumento 40x.

Figura 50. Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (1ª biópsia) do paciente B6, ênfase no tecido testicular. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada esquerda da primeira biópsia do paciente B6 (46,XX) evidenciando tecido testicular.



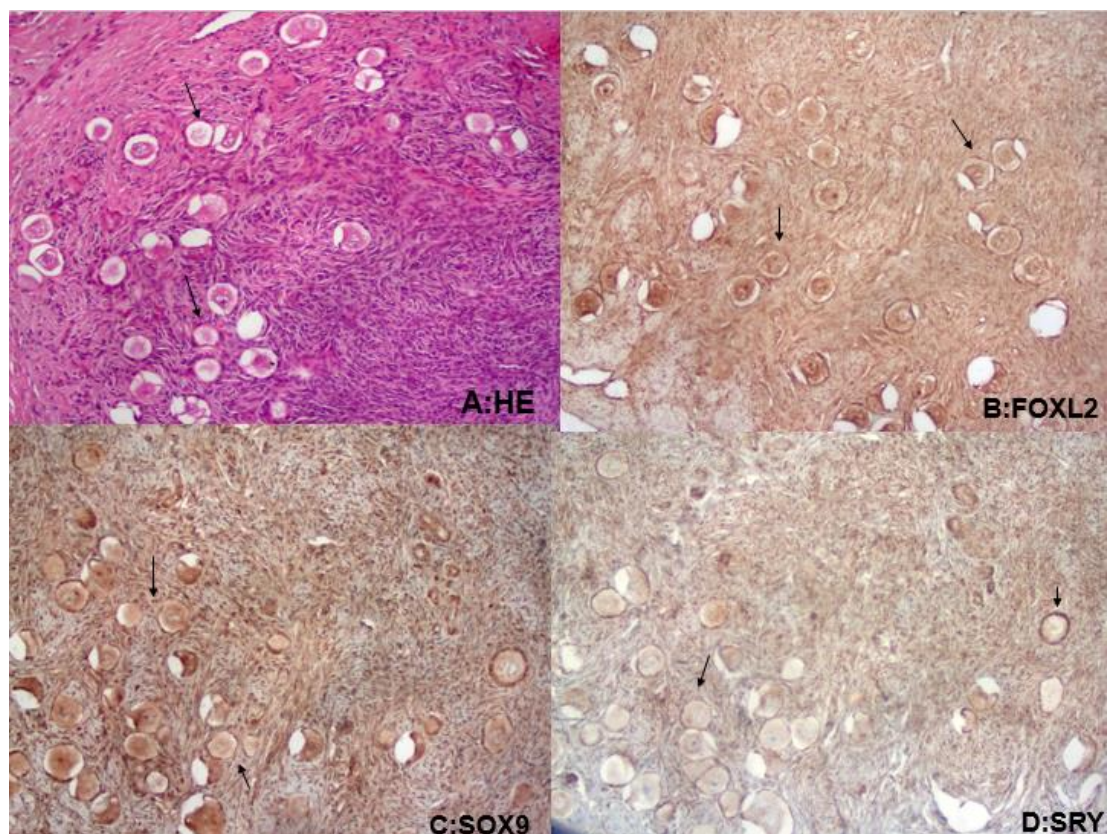
Folículos ovarianos indicados pela seta. A: coloração HE. B: FOX L2 positivo. C: SOX9 negativo. D: SRY positivo. Aumento 40x.

Figura 51. Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente B6, ênfase no tecido ovariano. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada direita da segunda biópsia do paciente B6 (46,XX), evidenciando folículos ovarianos.



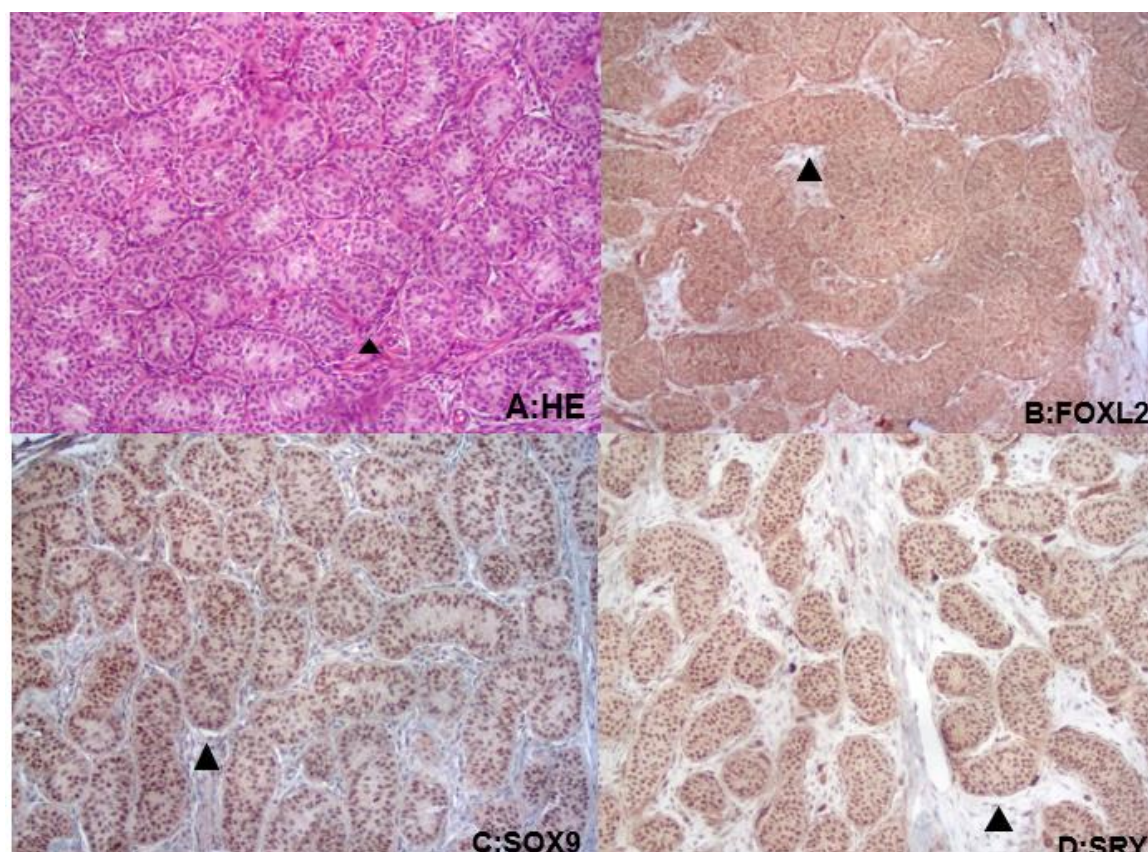
Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta. A: coloração HE. B: FOX L2 negativo. C: SOX9 negativo. D: SRY positivo. Aumento 40x.

Figura 52. Reação de imunoistoquímica da gônada direita (2ª biópsia) do paciente B6, ênfase no tecido testicular. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada direita da segunda biópsia do paciente B6 (46,XX) evidenciando tecido testicular.



Folículos ovarianos indicados pela seta. A: coloração HE. B: FOXL2 positivo. C: SOX9 positivo. D: SRY negativo. Aumento 40x.

Figura 53. Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (2ª biópsia) do paciente B6, ênfase no tecido ovariano. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada esquerda da segunda biópsia do paciente B6 (46,XX), evidenciando folículos ovarianos.



Túbulos seminíferos indicados pela cabeça de seta. A: coloração HE. B: FOXL2 negativo. C: SOX9 positivo. D: SRY positivo. Aumento 40x.

Figura 54. Reação de imunoistoquímica da gônada esquerda (2ª biópsia) do paciente B6, ênfase no tecido testicular. Coloração de HE e imunoistoquímica da gônada esquerda da segunda biópsia do paciente B6 (46,XX) evidenciando túbulos seminíferos.

A imunoistoquímica nos casos 46,XX traz também resultados interessantes a serem discutidos. Primeiramente, FOXL2 foi fortemente positivo nos folículos ovarianos de todas as lâminas em que esse tecido estava apropriado para análise, e negativo em todas as lâminas de túbulos seminíferos, sendo essa a expressão esperada em situações normais. Por outro lado, em relação a SOX9 e SRY, os resultados frequentemente diferiram do esperado para o sexo genético em sangue periférico e(ou) para o tecido gonadal analisado.

Primeiramente, chama a atenção a forte positividade (++) de SOX9 em folículos ovarianos concomitantemente à expressão de FOXL2 não só no caso A1 (46,XY), já discutido, mas também no B6 (46,XX), achado ainda não descrito na literatura. Durante o desenvolvimento normal das gônadas, FOXL2 está presente em células da granulosa e SOX9 em células de Sertoli; ambas as proteínas se localizam nos núcleos, o que é compatível com o fato de serem fatores de transcrição (116). Diferentemente do observado neste trabalho, em outros estudos com portadores de DDS-OT com gônada do tipo ovotestis SOX9 foi detectado somente em túbulos e FOXL2 somente em folículos (63, 116, 139, 155). FOXL2 chegou a ser detectado em alguns túbulos e em *clusters* de células do estroma em casos de disgenesia gonadal mista e parcial 46,XY, mas sem estarem sendo co-expressos, indicando que a expressão desses genes é tecido específica (116).

De fato, essa expressão tecido-específica parece ser independente do sexo genético. Nishina-Uchida e colaboradores (2016), por meio do uso concomitante das técnicas de FISH e imunoistoquímica em três indivíduos com cariótipo 46,XX/46,XY e DDS-OT, puderam demonstrar a existência de células de Sertoli 46,XX nos túbulos seminíferos e células da granulosa 46,XY nos folículos ovarianos. A expressão de SOX9 e FOXL2 nos tecidos foi mutuamente exclusiva, com SOX9 detectado apenas em túbulos seminíferos e FOXL2 apenas em folículos ovarianos, mesmo com a incongruência entre o complemento de cromossomos sexuais e o tecido gonadal. Os autores sugerem, portanto, que a diferenciação das células epiteliais (Sertoli e granulosa) nas gônadas depende não só dos cromossomos sexuais, mas também de fatores teciduais locais, sendo que as células com genótipo reverso assumem o fenótipo do epitélio gonadal que está ao redor (118).

Chama ainda a atenção o fato de SOX9 ter sido fortemente positivo (++) em indivíduos 46,XX na ausência do gene *SRY* em sangue periférico (B1, B2, B3, B4 e B6). Em quatro desses casos houve ainda forte marcação para *SRY* (B1, B2, B5 e B6), sugerindo mosaicismo ou quimerismo restrito às gônadas. Nos demais, porém (B3 e B4), *SRY* foi negativo ou só fracamente positivo.

Quanto à marcação de SRY, esta ocorreu, conforme esperado, nos dois indivíduos 46,XY (A1 e A2). Porém, esta foi também fortemente positiva (++) em quatro casos com cariótipo 46,XX: B1 (em folículos), B5 (em túbulos) e B2 e B6. Entre as hipóteses nesses casos estão a de mosaicismo ou quimerismo restrito às gônadas, mas não se pode descartar a hipótese de que se trate de reação cruzada com outro gene *SOX*, visto que estes compartilham com o *SRY* o *HMG box*, ou ainda um artefato de técnica (156). O achado de duplicação do *SOX3* por CMA no paciente B1 reforça essa hipótese de reação cruzada.

Salas-Cortés e colaboradores (2000) identificaram a presença da proteína SRY não só nas células de Sertoli mas também nos folículos ovarianos de dois pacientes com DDS-OT 46,XX e SRY positivo em sangue periférico e em quatro pacientes com DDS-OT 46,XX/46,XY, todos apresentando ovotestis. Os autores sugerem que SRY isoladamente não é capaz de inibir a diferenciação ovariana, e que outros fatores são necessários para completar a diferenciação testicular (157).

Também foi observado neste trabalho que a detecção de *SOX9* e SRY nos túbulos não foi consistente, como ocorreu com *FOXL2*. Em um mesmo indivíduo, algumas lâminas tiveram resultados negativos e outras resultado positivo. Esses resultados frequentemente variaram quando o material analisado era proveniente de diferentes biopsias ou material de gonadectomia, sugerindo que a não detecção dessas proteínas se deva a questões técnicas, ou seja, falsos negativos (156); não se pode descartar também, por outro lado, que em algumas lâminas tenha havido falsos positivos por reação cruzada (158). O ideal, portanto, seria buscar a validação dos resultados por outra técnica, como o já mencionado estudo do transcriptoma por RNA-seq.

4.4 Considerações finais

O diagnóstico de DDS-OT se inicia com a avaliação clínica de um paciente com ambiguidade genital e a realização do exame de cariótipo para guiar a investigação. Essa hipótese é geralmente aventada nos casos em que o cariótipo é 46,XX e há uma ou mais

gônadas palpáveis, naqueles em que o cariótipo é 46,XY e detecta-se a presença de útero, e também naqueles em que há anomalias de cromossomos sexuais, como mosaicismo 46,XX/47,XXY e quimerismo 46,XX/46,XY (159; 160).

A comprovação dessa hipótese depende, em seguida, de uma propedêutica cirúrgica diagnóstica por meio de laparoscopia, que além de avaliar a genitália interna permite a avaliação macroscópica das duas gônadas e a realização de biópsias em ambas. Naquelas de tamanho normal podem ser retirados fragmentos de vários pontos, paralelamente ao maior eixo da gônada, de modo a aumentar a probabilidade de detectar os dois tipos de tecido; naquelas de pequeno volume, a biópsia deve ser dirigida a locais com alterações macroscópicas (161).

Em seguida, os fragmentos de tecidos devem ser adequadamente manipulados e fixados (162), passando por etapas de desidratação e clarificação dos tecidos antes da impregnação pela parafina (163). A etapa seguinte é a avaliação histológica pelo patologista, que deve fazer a identificação inequívoca dos tecidos ovariano e testicular (164).

A experiência clínica é, portanto, o primeiro fator que determina o diagnóstico nesses casos, seguido da qualidade do estudo do cariótipo, tanto do ponto de vista qualitativo (que permite a detecção de alterações estruturais) quanto quantitativo (número de células analisadas para diagnóstico de mosaicismo ou quimerismo). Também é fundamental haver disponibilidade de técnicas adicionais, como FISH com sondas centroméricas de X e Y, que permite ampliar o número de células analisadas quando necessário, e CMA, que detecta microdeleções e microduplicações que não são perceptíveis ao microscópio óptico.

Com o uso da técnica de CMA foi possível detectar a deleção 9p e a duplicação 18p na paciente A2, que além de definir o diagnóstico etiológico levou à revisão histológica que trouxe questionamento quanto ao diagnóstico de DDS-OT. Essa técnica permitiu ainda detectar a duplicação do SOX3 no paciente B1, permitindo, assim, seu diagnóstico etiológico. Em dois dos 7 casos em que o exame foi realizado, portanto, a CMA teve um papel fundamental, indicando que essa técnica deveria ser empregada na investigação etiológica de todos os casos de DDS-OT não associados a anomalias de cromossomos sexuais.

Outro ponto crucial é a experiência do cirurgião responsável pela realização das biópsias. Dele depende a avaliação macroscópica durante a laparoscopia e a escolha dos locais a serem biopsiados, evitando, assim, que a hipótese de DDS-OT venha a ser descartada.

A experiência do patologista na análise histológica é também fundamental, principalmente na caracterização do tecido ovariano que, juntamente com a presença de túbulos seminíferos, permite o diagnóstico de DDS-OT; essa caracterização depende da presença de folículos (parênquima) e não somente de estroma do tipo ovariano (164). Além disso, como demonstrado na revisão em HE realizada antes da imunoistoquímica neste trabalho, o diagnóstico histológico das gônadas pode vir a ser modificado. Tudo indica, assim, que a composição de amostras para projetos retrospectivos na área de distúrbios da diferenciação gonadal, em que se inclui o DDS-OT, deva ser precedido de reavaliação histopatológica por patologista experiente na área.

Os resultados deste trabalho mostram ainda a influência do preparo dos fragmentos de tecido gonadal sobre a realização dos estudos genéticos retrospectivos. Estudos com essas características são necessários quando se trata de condições raras, como o DDS-OT, em que a obtenção de uma amostra pode levar décadas, como no presente estudo.

De fato, já foi observado em tecido testicular que na dependência do fixador utilizado pode haver resultados falso-negativos de análises imunoistoquímicas para detecção de tumores (165). Pode-se questionar, assim, se características da etapa de fixação seriam uma das causas dos resultados variáveis da expressão de FOXL2, SOX9 e SRY neste trabalho (positivos em algumas lâminas e negativos em outras no mesmo paciente). Além disso, como mostrado na figura 7, há variações na qualidade da inclusão do tecido em parafina.

De todo modo, este trabalho demonstrou a dificuldade em realizar estudos retrospectivos de citogenética molecular (FISH) e PCR a partir de tecido incluído em parafina, o que impediu que se testasse a hipótese mosaicismo ou quimerismo oculto. Em relação aos estudos moleculares, uma outra questão é a possibilidade de contaminação do tecido gonadal com DNA dos profissionais de saúde e técnicos que manipulam esse material, o que possivelmente

explique a amplificação de sequências específicas do cromossomo Y em controles de tecido ovariano, como observado nas tabelas 2 e 3.

Assim, uma interação próxima com os serviços de patologia é fundamental não só para a condução dos casos de DDS, mas também para a realização de estudos genéticos em busca do diagnóstico etiológico de condições de origem ainda desconhecida. Na verdade, a interdisciplinaridade deve se dar entre diversas áreas, incluindo a clínica, a cirúrgica, a citogenética e a genética molecular, entre outras (166).

Quanto à imunoistoquímica, os achados de co-expressão de SOX9 e FOXL2 em folículos e a forte marcação de SRY em vários dos pacientes 46,XX precisam ser validados em outras amostras de DDS-OT; o emprego de outras técnicas, como a da análise do transcriptoma, é necessário na interpretação desses resultados.

Em suma, a partir da suspeita clínica de DDS-OT e da comprovação histológica dessa hipótese, este trabalho mostra a importância da CMA na investigação etiológica. Mostra, também, a necessidade de estabelecer protocolos de pesquisa que permitam o armazenamento de tecido gonadal em condições ideais para estudos genéticos de forma prospectiva que permitam investigar a etiologia dessa condição. Finalmente, indica que a expressão dos genes pró-testiculares e pró-ovarianos nos tecidos gonadais desses pacientes necessita de avaliação mais aprofundada.

5. CONCLUSÕES

A presença de outras linhagens celulares no tecido gonadal (mosaicismo ou quimerismo oculto) não pôde ser investigada nesta amostra devido a problemas técnicos relacionados à qualidade do tecido gonadal armazenado ao longo de décadas, o que é um fator limitante para a realização de estudos retrospectivos.

A expressão de FOXL2 ocorreu, conforme esperado, apenas em folículos ovarianos. Já, a expressão de SOX9 ocorreu em túbulos seminíferos, conforme esperado, mas em alguns casos 46,XX e 46,XY houve co-expressão com FOXL2 em folículos ovarianos, achado anômalo que depende de outros estudos para ser confirmado.

A expressão de SRY foi detectada nos túbulos seminíferos nos casos 46,XY, conforme esperado, mas também em túbulos seminíferos e folículos ovarianos nos casos 46,XX, achado anômalo que pode se dever a mosaicismo ou quimerismo oculto, reação cruzada com outro gene SOX ou artefato de técnica.

Em dois dos sete casos (aproximadamente 29% dos casos) em que foi possível realizar a CMA, havia CNVs patogênicas, indicando que esse exame deve fazer parte da investigação de rotina em DDS-OT.

6. REFERÊNCIAS

1. Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 2004;5:509-521.
2. Biason-Lauber A. Control of sex development. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010;24:163–186.
3. Koopman P. The curious world of gonadal development in mammals. *Current Topics in Developmental Biology* 2016;116:537-545.
4. Acién P, Acién M. Disorders of sex development: classification, review, and impact on fertility. *J Clin Med* 2020;9:3555.
5. Estermann MA, Smith CA. Applying single-cell analysis to gonadogenesis and DSDs (Disorders/Differences of Sex Development). *Int J Mol Sci* 2020;21:6614.
6. Barrionuevo FJ, Burgos M, Scherer G, Jiménez R. Genes promoting and disturbing testis development. *Histol Histopathol* 2012;27:1361-1383.
7. Wassim E, Biason-Lauber A. Why Boys Will Be Boys and Girls Will Be Girls: Human Sex Development and Its Defects. *Birth Defects Research (Part C)* 2016; 108:365-379.
8. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Sistema Urogenital. In: *Embriologia Básica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. p. 161-188.
9. Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, Bard J, Buckler A, Pelletier J, Housman D, van Heyningen V, Hastie N. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 1990;346:194-197.
10. Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene *WT1* in embryonic and adult tissues. *Development* 1993;119:1329-1341.
11. She ZY, Yang WX. Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *Journal of Molecular Endocrinology* 2014; 53: R21–R37.
12. Lucas-Heralda AK, Bashamboo A. Gonadal Development. In: Hiort O, Ahmed SF (eds): *Understanding Differences and Disorders of Sex Development (DSD)*. Endocr Dev. Basel, Karger 2014, vol 27, p 1–16.
13. Baetens D, Verdin H, de Baere E, Cools M. Update on the genetics of differences of sex development (DSD). *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2019;33:101271.
14. Gutiérrez DR, Biason-Lauber A. Pluripotent cell models for gonadal research. *Int J Mol Sci* 2019;20:5495.

15. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990;346:240–244.
16. Gubbay, J. Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1990;346:245–250.
17. Lovell-Badge R, Robertson E. XY female mice resulting from a heritable mutation in the murine primary testis determining gene, *Tdy*. *Development* 1990; 109:635–646.
18. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 1991;351:117–121.
19. Hoyle C, Narvaez V, Alldus G, Lovell-Badge R, Swain A. *Dax1* expression is dependent on steroidogenic factor 1 in the developing gonad. *Mol Endocrinol* 2002;16:747–756.
20. Mäkelä JA, Koskenniemi JJ, Virtanen HE, Toppari T. Testis Development. *Endocrine Reviews* 2019;40:857–905.
21. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of *SRY* and *SF1* on a specific *Sox9* enhancer. *Nature* 2008;453:930-934.
22. Bhandari RK, Haque MM, Skinner MK. Global Genome Analysis of the Downstream Binding Targets of Testis Determining Factor *SRY* and *SOX9*. *Plos One* 2012;7:1-17.
23. Jakob S, Lovell-Badge R. Sex determination and the control of *SOX9* expression in mammals. *FEBS Journal* 2011;278(2): 1002-1009.
24. Eggers S, Ohnesorg T, Sinclair A. Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:673–683.
25. She ZY, Yang WX. Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *Journal of Molecular Endocrinology* 2014;53:R21–R37.
26. Wilhelm D, Washburn LL, Truong V, Fellous M, Eicher EM, Koopman P. Antagonism of the testis- and ovary-determining pathways during ovotestis development in mice. *Mech Dev* 2009;126:324–336
27. Georg I, Barrionuevo F, Wiech T, Scherer G. *Sox9* and *Sox8* are required for basal lamina integrity of testis cords and for suppression of *FOXL2* during embryonic testis development in mice. *Biol Reprod* 2012;87:1-11.
28. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of *SRY* and *SF1* on a specific *Sox9* enhancer. *Nature* 2008;453(7197):930-4.
29. Miyamoto Y, Taniguchi H, Hamel F, Silversides DW, Viger RS. A *GATA4/WT1* cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol Biol* 2008;9:1-18.

30. Nef S, Vassalli JD. Complementary pathways in mammalian female sex determination. *Journal of Biology* 2009;8:74-74.3.
31. Biason-Lauber A, Chaboissier MC. Ovarian development and disease: The known and the unexpected. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2015;45: 59-67.
32. Bakker J. The Sexual Differentiation of the Human Brain: Role of Sex Hormones Versus Sex Chromosomes. *Curr Top Behav Neurosci* 2019;43:45-67.
33. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA. Consensus Statement on Management of Intersex Disorders. *Pediatrics* 2006;118:e488-e500.
34. Hiort O, Birnbaum W, Marshall L, Wünsch L, Werner R, Schröder T, Döhnert U, Holterhus PM. Management of disorders of sex development. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:520-529.
35. Lee PA, Nordenström A, Houk CP, Ahmed SF, Auchus R, Baratz A, Baratz Dalke K, Liao LM, Lin-Su K, Looijenga LH 3rd, Mazur T, Meyer-Bahlburg HF, Mouriquand P, Quigley CA, Sandberg DE, Vilain E, Witchel S. Global Disorders of Sex Development Update since 2006: Perceptions, Approach and Care. *Horm Res Paediatr* 2016;85:158–180.
36. Cools M, Nordenström A, Robeva R, Hall J, Westerveld P, Flück C, Köhler B, Berra M, Springer A, Schweizer K, Pasterski V. Caring for individuals with a difference of sex development (DSD): a consensus statement. *Nat Rev Endocrinol* 2018;14:415 429.
37. Camats N, Flück CE, Audí L. Oligogenic origin of differences of sex development in humans. *Int J Mol Sci* 2020;21:1809.
38. Délot EC, Vilain E. Towards improved genetic diagnosis of human differences of sex development. *Nat Rev Genet* 2021;22(9):588-602.
39. Sax L. How common is intersex? A response to Anne Fausto-Sterling. *J Sex Res* 2002;39:174–178.
40. Thyen U, Lanz K, Holterhus PM, Hiort O. Epidemiology and initial management of ambiguous genitalia at birth in Germany. *Horm Res* 2006;66:195–203.
41. Mazen I, Hiort O, Bassiouny R, El Gammal M. Differential diagnosis of disorders of sex development in Egypt. *Horm Res* 2008;70:118–123.
42. Bashamboo A, McElreavey K. Consanguinity and disorders of sex development. *Hum Hered* 2014;77:108–117.
43. Bashamboo A, McElreavey K. Human sex-determination and disorders of sex-development (DSD). *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2015;45:77–83.
44. Bashamboo A, McElreavey K. Mechanism of Sex Determination in Humans: Insights from Disorders of Sex Development. *Sex Dev* 2016;10:313–325.

45. McCann-Crosby, V. Reid Sutton. Disorders of Sexual Development. *Clin Perinatol* 2015;42:395–412.
46. Ahmed SF, Khwaja O, Hughes IA. The role of a clinical score in the assessment of ambiguous genitalia. *BJU Int.* 2000;85:120–124
47. Thankamony A, Lek N, Carroll D, Williams M, Dunger DB, Acerini CL, Ong KK, Hughes IA. Anogenital distance and penile length in infants with hypospadias or cryptorchidism: comparison with normative data. *Environ. Health Perspect* 2014;122, 207–211.
48. Ogilvy-Stuart AL, Brain CE. Early assessment of ambiguous genitalia. *Arch. Dis. Child* 2004;89:401–407.
49. Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA, Group LC. Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child* 2006;91:554–563.
50. Andrade JGR, Andradre LALA, Guerra-Júnior G, Maciel-Guerra AT. 45,X/46,XY ovotesticular disorder of sex development revisited: undifferentiated gonadal tissue may be mistaken as ovarian tissue. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2017;30:899–904.
51. Soardi FC, Coeli FB, Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G, Mello MP. Complete XY gonadal dysgenesis due to p.D293N homozygous mutation in the NR5A1 gene: a case study. *J Appl Genet* 2010;51:223–224.
52. Rocha VB, Guerra-Júnior G, Marques-de-Faria AP, de Mello MP, Maciel-Guerra AT. Complete gonadal dysgenesis in clinical practice: the 46,XY karyotype accounts for more than one third of cases. *Fertil Steril* 2011;96:1431–1434.
53. Andrade JGR, Fabbri-Scallet H, Dos Santos AP, et al. Clinical Findings and Follow-Up of 46,XY and 45,X/46,XY Testicular Dysgenesis. *Sex Dev* 2019:1-10.
54. Parivesh A, Barseghyan H, Delot E, Vilain E. Translating genomics to the clinical diagnosis of disorders/differences of sex development. *Curr Top Dev Biol.* 2019; 134: 317–75.
55. Migale R, Neumann M, Lovell-Badge R. Long-range regulation of key sex determination genes. *Sex Dev* 2021;15:360–380.
56. Ramsay M, Pfaffenzeller W, Kotze E, Bhengu L, Essop F, de Ravel T. Chimerism in black southern African patients with true hermaphroditism 46,XX/47XY,+21 and 46,XX/46,XY. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1151:68-76.
57. Délot EC, Vilain EJ. Nonsyndromic 46,XX Testicular Disorders/Differences of Sex Development. 2003 Oct 30 [Updated 2022 May 26]. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022.

58. Schimmer BP, White PC. Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease. *Mol Endocrinol*. 2010;24:1322–37.
59. Sekido R, Lovell-Badge R. Genetic control of testis development. *Sex Dev*. 2013;7:21–32.
60. Lin L, Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex Dev* 2008;2:200–209.
61. Ferraz-de-Souza B, Lin L, Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;336:198-205.
62. Fabbri-Scallet H, de Sousa LM, Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G, de Mello MP. Mutation update for the NR5A1 gene involved in DSD and infertility. *Human Mutation* 2019;41:1–11.
63. Baetens Stoop H, Peelman F, Todeschini AL, Rosseel T, Coppieters F, Veitia RA, Looijenga LH, De Baere E, Cools M. NR5A1 is a novel disease gene for 46,XX testicular and ovotesticular disorders of sex development. *Genetics in medicine* 2017;19:367-376.
64. Bashamboo A, Donohoue PA, Vilain E, Rojo S, Calvel P, Seneviratne SN, et al. A recurrent p.Arg92Trp variant in steroidogenic factor-1 (NR5A1) can act as a molecular switch in human sex development. *Hum Mol Genet* 2016;25(23):5286.
65. Igarashi M, Takasawa K, Hakoda A, Kanno J, Takada S, Miyado M, et al. Identical NR5A1 Missense Mutations in Two Unrelated 46,XX Individuals with Testicular Tissues. *Hum Mutat* 2017;38(1):39-42.
66. Knarston IM, Robevska G, van den Bergen JA, Eggers S, Croft B, Yates J, et al. NR5A1 gene variants repress the ovarian-specific WNT signaling pathway in 46,XX disorders of sex development patients. *Hum Mutat* 2019;40(2):207-216.
67. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, Weissenbach J, Mansour S, Young D, Goodfellow PN. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 1994; 372:525–30.
68. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, et al. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 1994;79:1111–20.
69. Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. Autosomal XX Sex Reversal Caused by Duplication of SOX9. *American Journal of Medical Genetics* 1999;87:349–353.
70. Xiao B, Ji X, Xing Y, Chen YW, Tao J. A rare case of 46, XX SRY-negative male with approximately 74-kb duplication in a region upstream of SOX9. *Eur J Med Genet* 2013;56(12):695-8.
71. Li TF, Wu QY, Zhang C, Li WW, Zhou Q, Jiang WJ, Cui YX, Xia XY, Shi YC. 46,XX testicular disorder of sexual development with SRY-negative caused by some unidentified mechanisms: a case report and review of the literature. *BMC Urol* 2014;14:104.

72. Vetro A, Dehghani MR, Kraoua L, et al. Testis development in the absence of SRY: chromosomal rearrangements at SOX9 and SOX3. *European Journal of Human Genetics* 2015;23(8):1025–1032.
73. Pinti E, Piko H, Lengyel A, Luczay A, Karcagi V, Fekete G, Haltrich I. Similar Cause, Different Phenotype: SOX9 Enhancer Duplication in a Family. *Horm Res Paediatr*. 2019;29:1-5.
74. Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC, Grünfeld JP, Jaubert F, Kuttann F, Fékété CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavey K. Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* 1997;17(4):467-70.
75. Tsuji Y, Yamamura T, Nagano C, Horinouchi T, Sakakibara N, Ishiko S, Aoto Y, Rossanti R, Okada E, Tanaka E, Tsugawa K, Okamoto T, Sawai T, Araki Y, Shima Y, Nakanishi K, Nagase H, Matsuo M, Iijima K, Nozu K. Systematic review of genotype-phenotype correlations in Frasier Syndrome. *Kidney Int Rep* 2021;6(10):2585-2593.
76. Hoefele J, Kemper MJ, Schoenermarck U, Mueller S, Klein HG, Lemke A. Truncating *Wilms Tumor Suppressor Gene 1* Mutation in an XX Female with Adult-Onset Focal Segmental Glomerulosclerosis and Streak Ovaries: A Case Report. *Nephron* 2017;135:72–76.
77. Gomes NL, de Paula LCP, Silva JM, Silva TE, Lerário AM, Nishi MY, Batista RL, Faria Júnior JAD, Moraes D, Costa EMF, Hemesath TP, Guaragna-Filho G, Leite JCL, Carvalho CG, Domenice S, Costa EC, Mendonça BB. A 46,XX testicular disorder of sex development caused by a Wilms' tumour Factor-1 (WT1) pathogenic variant. *Clin Genet* 2019;95(1):172-176.
78. Eozenou C, Gonen N, Touzon MS, Jorgensen A, Yatsenko SA, Fusee L, Kamel AK, Gellen B, Guercio G, Singh P, Witchel S, Berman AJ, Mainpal R, Totonchi M, Meybodi AM, Askari M, Merel-Chali T, Bignon-Topalovic J, Migale R, Costanzo M, Marino R, Ramirez P, Garrido NP, Berenshtein E, Mekawy MK, Schimenti JC, Bertalan R, Mazen I, McElreavey K, Belgorosky A, Lovell-Badge R, Rajkovic A, Bashamboo A. Testis formation in XX individuals resulting from novel pathogenic variants in Wilms' tumor 1 (WT1) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117(24):13680-13688.
79. Jordan BK, Mohammed M, Ching ST et al. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *American Journal of Human Genetics* 2001;68(5):1102–1109.
80. Mandel H, Shemer R, Borochoy ZU, Okopnik M, Knopf C, Indelman M, Drugan A, Tiosano D, Gershoni-Baruch R, Choder M, Sprecher E. SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *Am J Hum Genet* 2008;82(1):39-47.
81. Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi MS, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A., Pilia G. The putative

- forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 2001;27:159-166.
82. Androutsos G. Hermaphroditism in Greek and Roman antiquity. *Hormones* 2006;5:214-217.
 83. Martin E. *Histoire des monstres depuis l'antiquité jusqu'à nos jours*. Paris, Reinwald: Paris; 1880. p. 2-9.
 84. Syryn H, Vijver KVD, Cools M. Ovotesticular difference of sex development: genetic background, histological features, and clinical management. *Horm Res Paediatr* 2021;275-284.
 85. Verkauskas G, Jaubert F, Lortat-Jacob S, Malan V, Thibaud E, Nihoul-Fékété C. The long-term followup of 33 cases of true hermaphroditism: a 40-year experience with conservative gonadal surgery. *J Urol* 2007;177: 726–73.
 86. Ganie Y, Aldous C, Balakrishna Y, Wiersma R. The Spectrum of Ovotesticular Disorders of Sex Development in South Africa: A Single-Centre Experience. *Horm Res Paediatr* 2017;87:307–314.
 87. Krob G, Braun A, Kuhnle U. True hermaphroditism: geographical distribution, clinical findings, chromosomes and gonadal histology. *Eur J Pediatr* 1994;153:2-10.
 88. Damiani D, Guedes DR, Setian N, Maciel-Guerra AT, Mello MP, Guerra-Júnior G. True hermaphroditism: experience with 36 patients. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005;49:71-80.
 89. Walker AM, Walker JL, Adams S, Shi E, McGlynn M, Verge CF. True Hermaphroditism. *J Paediatr Child Health* 2000;36:69-73.
 90. Guerra-Júnior G. DDS Ovário-testicular - Hermafroditismo Verdadeiro. In: Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G, editores. *Menino ou menina? Distúrbios da diferenciação do sexo*. 2. ed. São Paulo: Rubio Ltda; 2002. p.118-122.
 91. Maciel-Guerra AT, de Mello MP, Coeli FB, Ribeiro ML, Miranda ML, Marques-de-Faria AP, Baptista MT, Moraes SG, Guerra-Júnior G. XX maleness and XX true hermaphroditism in SRY-negative monozygotic twins: additional evidence for a common origin. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:339–343.
 92. Ergun-Longmire B, Vinci G, Alonso L, Matthew S, Tansi S, Lin-Su K, McElreavey K, New MI. Clinical, hormonal and cytogenetic evaluation of 46,XX male and review of the literature. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2005;18:739-48.
 93. Vorona E, Zitsmann M, Gromoll J, Schüring N, Nieschlag E. Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46,XX male syndrome, compared with 47,XXY Klinefelter patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3458-3465.
 94. Braun A, Kammerer S, Cleve H, Lohrs U, Schwarz HP, Kuhnle U. True hermaphroditism in a 46,XY individual, caused by a postzygotic somatic point mutation in the male

- gonadal sex-determining locus (SRY): molecular genetics and histological findings in a sporadic case. *Am J Hum Genet* 1993;52:578-85.
95. Torres L, López M, Méndez JP, Canto P, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson RP, Kofman-Alfaro S. Molecular analysis in true hermaphrodites with different karyotypes and similar phenotypes. *Am J Med Genet* 1996;63:348-55.
 96. Damiani D, Fellous M, McElreavey K, Barbaux S, Barreto ESA, Dichtchekian V, et al. True hermaphroditism: clinical aspects and molecular studies in 16 cases. *Eur J Endocrinol* 1997;136:201-204.
 97. Guerra-Júnior G, Mello MP, Assumpção JG, Morcillo AM, Marini SHVL, Baptista MTM, Paiva e Silva RB, Marqués-de-Faria AP, Maciel-Guerra AT. True hermaphrodites in southeastern region of Brazil: a different cytogenetic and gonadal profile. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1998;11:519-524.
 98. Domenice S, Nishi MY, Billerbeck AEC, Carvalho FM, Frade EMC, Latronico AC, et al. Molecular analysis of SRY gene in Brazilian 46,XX sex reversed patients: absence of SRY sequences in gonadal tissue. *Med Sci Monit* 2001;7:238-41.
 99. Queipo G, Zenteno JC, Peña R, Nieto K, Radillo A, Dorantes LM, Eraña L, Lieberman E, Söderlund D, Jiménez AL, Ramón G, Kofman-Alfaro S. Molecular analysis in true hermaphroditism: demonstration of low-level hidden mosaicism for Y-derived sequences in 46,XX cases. *Hum Genet* 2002;111:278-283.
 100. Dorsey FY, Hsieh MH, Roth DR. 46,XX SRY-Negative True Hermaphrodite Siblings. *Urology* 2009;73: 529-531.
 101. Carvalheira G, Malinverni AM, Moysés-Oliveira M, Ueta R, Cardili L, Monteagudo P, Mathez ALG, Verreschi IT, Maluf MA, Shida MEF, Leite MTC, Mazzotti D, Melaragno MI, Dias-da-Silva MR. The natural history of a man with ovotesticular 46,XX DSD caused by a novel 3-Mb 15q26.2 deletion containing NR2F2 gene. *J Endocr Soc.* 2019;3(11):2107-2113.
 102. Vetro A, Dehghani MR, Kraoua L, Giorda R, Beri S, Cardarelli L, Merico M, Manolakos E, Parada-Bustamante A, Castro A, Radi O, Camerino G, Brusco A, Sabaghian M, Sofocleous C, Forzano F, Palumbo P, Palumbo O, Calvano S, Zelante L, Grammatico P, Giglio S, Basly M, Chaabouni M, Carella M, Russo G, Bonaglia MC, Zuffardi O. Testis development in the absence of SRY: chromosomal rearrangements at SOX9 and SOX3. *European Journal of Human Genetics* 2015;23:1025–1032.
 103. Ledig S, Hiort O, Wünsch L, Wieacker P. Partial deletion of DMRT1 causes 46,XY ovotesticular disorder of sexual development. *European Journal of Endocrinology* 2012;167: 119–124.
 104. Grinspon RP, Nevado J, Mori Alvarez Mde L, Del Rey G, Castera R, Venara M, Chiesa A, Podestá M, Lapunzina P, Rey RA6,7. 46,XX ovotesticular DSD associated

with a SOX3 gene duplication in a SRY-negative boy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2016;85:673-675.

105. Ohnesorg T, van den Bergen JA, Belluoccio D, Shankara-Narayana N, Kean AM, Vasilaras A, Ewans L, Ayers KL, Sinclair AH. A duplication in a patient with 46,XX ovotesticular disorder of sex development refines the SOX9 testis-specific regulatory region to 24 kb. *Clin Genet.* 2017;92:347-349.

106. Baetens Stoop H, Peelman F, Todeschini AL, Rosseel T, Coppieters F, Veitia RA, Looijenga LH, De Baere E, Cools M. NR5A1 is a novel disease gene for 46,XX testicular and ovotesticular disorders of sex development. *Genetics in medicine* 2017;19:367-376.

107. López-Hernández B, Méndez JP, Coral-Vázquez RM, Benítez-Granados J, Zenteno JC, Villegas-Ruiz V, Calzada-León R, Soderlund D, Canto P. Duplication of SOX9 associated with 46,XX ovotesticular disorder of sex development. *Reproductive Biomedicine Online* 2018;37:107–112.

108. Tomaselli S, Megiorni F, De Bernardo C, Felici A, Marrocco G, Maggiulli G, Grammatico B, Remotti D, Saccucci P, Valentini F, Mazzilli MC, Majore S, Grammatico P. Syndromic true hermaphroditism due to an R-spondin1 (RSPO1) homozygous mutation. *Hum Mutat* 2008;29:220-226.

109. Hadjiahnassiou CG, Brauner R, Lortat-Jacob S, Nivolt S, Jaubert F, Fellous M, et al. True hermaphroditism: genetic variants and clinical management. *J Pediatr* 1994;125:738-744.

110. Ortenberg J, Oddoux C, Craver R, McElreavey K, Salas-Cortes L, Guillen-Navarro E, et al. SRY gene expression in the ovotestes of XX true hermaphrodites. *J Urol* 2002;167:1828-1831.

111. Kearney, L. Molecular cytogenetics. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2001;14:645-668.

112. Nishina-Uchida N, Fukuzawa R, Hasegawa Y, Morison IM. Identification of X Monosomy Cells From a Gonad of Mixed Gonadal Dysgenesis With a 46,XY Karyotype. *Medicine* 2015;94:1-5.

113. Berger-Zaslav, AL, Mehta, L, Jacob, J, Mercado, T, Gadi, I, Tepperber, JH, Palmer LS. Ovotesticular Disorder of Sexual Development (True Hermaphroditism). *Urology* 2009;73:293-296.

114. Xin-Yi X, Wei-Ping W, Tian-Fu L, Wei-Wei L, Qiu-Yue W, Na L, Zhang C, Gao HL, Li XJ, Cui XY. A parthenogenetic maternal and double paternal contribution to an ovotesticular disorder of sex development. *Molecular Cytogenetics* 2014;7:1-6.

115. Ortenber, J, Oddoux, C, McElreavey, K, Salas-Cortes, L, Guillen-Navarro, E, Ostrer, H, et al. SRY gene expression in the ovotestes of XX true hermaphrodites. *J Urol* 2002;167:1828–1831.

116. Hersmus R, Kalfa N, de Leeuw B, Stoop H, Oosterhuis JW, de Krijger R, Wolffenbuttel KP, Drop SL, Veitia RA, Fellous M, Jaubert F, Looijenga LH. FOXL2 and SOX9 as parameters of female and male gonadal differentiation in patients with various forms of disorders of sex development (DSD). *J Pathol* 2008;215:31-38.
117. Salas-Cortés L, Jaubert F, Bono MR, Fellous M, Roseblatt M. Expression of the human SRY protein during development in normal male gonadal and sex-reversed tissues. *J Exp Zool* 2001;290(6):607-15.
118. Nishina-Uchida N, Fukuzawa R, Ishii T, Anaka MR, Hasegawa T, Hasegawa Y. The Distribution and Cellular Lineages of XX and XY Cells in Gonads Associated with Ovotesticular Disorder of Sexual Development. *Sex Dev* 2016;10:185-190.
119. De Paula GB, Barros BA, Carpiní S, Tincani BJ, Mazzola TN, Sanches Guaragna M, Piveta CS, de Oliveira LC, Andrade JG, Guaragna-Filho G, Barbieri PP, Ferreira NM, Miranda ML, Gonçalves EM, Morcillo AM, Viguetti-Campos NL, Lemos-Marini SH, Silva RB, Marques-de-Faria AP, De Mello MP, Maciel-Guerra AT, Guerra-Junior G. 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.
120. Shao L, Akkari Y, Cooley LD, Miller DT, Seifert BA, Wolff DJ, Mikhail FM, ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Chromosomal microarray analysis, including constitutional and neoplastic disease applications, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine* 2021;23:1818–1829.
121. Amarillo IE, Nievera I, Hagan A, Huchthagowder V, Heeley J, Hollander A, Koenig J, Austin P, Wang T. Integrated small copy number variations and epigenome maps of disorders of sex development. *Hum Genome Var* 2016;3:16012.
122. Smyk M, Berg JS, Pursley A, Curtis FK, Fernandez BA, Bien-Willner GA, et al. Male-to-female sex reversal associated with an approximately 250 kb deletion upstream of NR0B1 (DAX1). *Hum Genet* 2007;122:63–70.
123. Sutton E, Hughes J, White S, Sekido R, Tan J, Arboleda V, et al. Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J Clin Invest* 2011;121:328–41.
124. Harrison SM, Granberg CF, Keays M, Hill M, Grimsby GM, Baker LA. DNA copy number variations in patients with 46,XY disorders of sex development. *J Urol* 2014;192:1801–6.
125. Benko S, Gordon CT, Mallet D, Sreenivasan R, Thauvin-Robinet C, Brendehaug A, Thomas S, Bruland O, David M, Nicolino M, Labalme A, Sanlaville D, Callier P, Malan V, Huet F, Molven A, Dijoud F, Munnich A, Faivre L, Amiel J, Harley V, Houge G, Morel Y, Lyonnet S. Disruption of a long distance regulatory region upstream of SOX9 in isolated disorders of sex development. *J Med Genet* 2011;48:825-830.

126. Mengen E, Kayhan G, Kocaay P, Uçaktürk SA. A Duplication upstream of *SOX9* associated with *SRY* negative 46,XX ovotesticular disorder of sex development: a case report. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2020;12(3):308-314.
127. Eser M, Ayaz A. Haploinsufficiency of the *DMRT* Gene Cluster in a Case with 46,XY Ovotesticular Disorder of Sexual Development. *Balkan Med J* 2018;35(3):272-274.
128. De Paula GB, Barros BA, Carpiní S, Tincani BJ, Mazzola TN, Sanches Guaragna M, Piveta CS, de Oliveira LC, Andrade JG, Guaragna-Filho G, Barbieri PP, Ferreira NM, Miranda ML, Gonçalves EM, Morcillo AM, Viguetti-Campos NL, Lemos-Marini SH, Silva RB, Marques-de-Faria AP, De Mello MP, Maciel-Guerra AT, Guerra-Junior G. 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.
129. Gijsbers AC, Schoumans J, Ruivenkamp CA. Interpretation of array comparative genome hybridization data: a major challenge. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135(3-4):222-7.
130. de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Simons A, Geurts van Kessel A, Smeets DF, Faas BH, Pfundt R. SNP array analysis in constitutional and cancer genome diagnostics--copy number variants, genotyping and quality control. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135(3-4):212-21.
131. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST; Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* 2011;13(7):680-5.
132. de Leeuw N, Dijkhuizen T, Hehir-Kwa JY, Carter NP, Feuk L, Firth HV, et al. Diagnostic interpretation of array data using public databases and internet sources. *Hum Mutat.* 2012;33(6):930-40.
133. Vermeesch JR, Brady PD, Sanlaville D, Kok K, Hastings RJ. Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Hum Mutat.* 2012;33(6):906-15.
134. Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin Genet.* 2013;84(5):415-21.
135. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet.* 2015;16(3):172-83.
136. Kearney HM, Kearney JB, Conlin LK. Diagnostic implications of excessive homozygosity detected by SNP-based microarrays: consanguinity, uniparental disomy, and recessive single-gene mutations. *Clin Lab Med.* 2011;31(4):595-613.

137. Sund KL, Zimmerman SL, Thomas C, Mitchell AL, Prada CE, Grote L, et al. Regions of homozygosity identified by SNP microarray analysis aid in the diagnosis of autosomal recessive disease and incidentally detect parental blood relationships. *Genet Med*. 2013;15(1):70-8.
138. Strain L, Warner JP, Johnston T, Bonthron DT: A human parthenogenetic chimaera. *Nat Genet* 1995;11:164–169.
139. van Bever Y, Wolffenbutte KPI, Brüggewirth HT, Blom E, de Klein A, Eussen BHJ, van der Windt F, Hannema SE, Dessens AB, Dorssers LCJ, Biermann K, Hersmus R, de Rijke YB, Looijenga LHJ. Multiparameter Investigation of a 46,XX/46,XY Tetragametic Chimeric Phenotypical Male Patient with Bilateral Scrotal Ootestes and Ovulatory Activity. *Sex Dev* 2018;12:145–154.
140. Kamel AK, El-Ghany HMA, Mekawy MK, Makhoul MM, Mazen IM, Dessouky NE. Mahmoud W, Kader SAAE. Sex Chromosome Mosaicism in the Gonads of DSD Patients: A Karyotype/Phenotype Correlation. *Sex Dev* 2015;9:279–288.
141. Green AJ, Barton DE, Jenks P, Pearson J, Yates JRW. Chimaerism shown by cytogenetics and DNA polymorphism analysis. *J Med Genet* 1994;31:816–817.
142. Giltay JC, Brunt T, Beemer FA, Wit JM, van Amstel HK, Pearson PL, Wijmenga C. Polymorphic Detection of a Parthenogenetic Maternal and Double Paternal Contribution to a 46,XX/46,XY Hermaphrodite. *Am. J. Hum. Genet* 1998;62:937–940.
143. Niu DM, Pan CC, Lin CY, Hwang B, Chung MY: Mosaic or chimera? Revisiting an old hypothesis about the cause of the 46,XX/46,XY hermaphrodite. *J Pediatr* 2002;140:732–735.
144. Alvarez-Nava F, Soto M, Martínez MC, Prieto M, Alvarez Z. FISH and PCR analyses in three patients with 45,X/46,X,idic(Y) karyotype: clinical and pathologic spectrum. *Ann Gene* 2003;46:443–448.
145. Gole LA, Lim J, Crolla JA, Loke KY: Gonadal mosaicism 45,X/46,X,psu dic(Y)(q11.2) resulting in a Turner phenotype with mixed gonadal dysgenesis. *Singapore Med J* 2008;49:349–351.
146. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009;10(1):57–63.
147. Winge SB, Dalgaard MD, Belling KG, Jensen JM, Nielsen JE, Aksglaede L, et al. Transcriptome analysis of the adult human Klinefelter testis and cellularity-matched controls reveals disturbed differentiation of Sertoli- and Leydig cells article. *Cell Death Dis* 2018;9(6):586.
148. Winge SB, Dalgaard MD, Jensen JM, Graem N, Schierup MH, Juul A, et al. Transcriptome profiling of fetal Klinefelter testis tissue reveals a possible involvement of long non-coding RNAs in gonocyte maturation. *Hum Mol Genet* 2018;27(3):430–9.

149. Ledig S, Hiort O, Scherer G, Hoffmann M, Wolff G, Morlot S, Kuechler A, Wieacker P. Array-CGH analysis in patients with syndromic and non-syndromic XY gonadal dysgenesis: evaluation of array-CGH as diagnostic tool and search for new candidate loci. *Human Reproduction* 2010;25:2637–2646.
150. Sutton, E., Hughes, J., White, S., et al. Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J Clin Invest* 2011;121(1),328-341.
151. Moalem S, Babul-Hirji R, Stavropolous DJ et al. XX male sex reversal with genital abnormalities associated with a *de novo* SOX3 gene duplication. *Am J Med Genet A* 2012;158A(7):1759-1764.
152. Grinspon, R.P., Rey, R.A. Disorders of Sex Development with Testicular Differentiation in SRY-Negative 46,XX Individuals: Clinical and Genetic Aspects. *Sex Dev* 2016;10(1):1-11.
153. Tasic V, Mitrotti A, Riepe, FG, Kulle AE, Laban N, Polenakovic M, Plaseka-Karanfilska D, Sanna-Cherchi S, Kostovski M, Gucev Z. Duplication of SOX3 gene in an SRY-negative 46,XX male with associated congenital anomalies of kidneys and the urinary tract: case report and review of the literature. *BJMG* 2019; 22(1):81-88.
154. Zhuang J, Chen C, Li J, et al. The 46, XX ovotesticular disorder of sex development with Xq27.1q27.2 duplication involving the SOX3 gene: a rare case report and literature review. *Front Pediatr* 2021;9,682846.
155. Spoor JA, Oosterhuis JW, Hersmus R, Biermann K, Wolffenbuttel KP, Cools M, Kazmi Z, Ahmed SF, Looijenga LHJ. Histological Assessment of Gonads in DSD: Relevance for Clinical Management. *Sex Dev* 2018;12:106-122.
156. Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, Lovell-Badge R. A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* 1996;122:509-520.
157. Salas-Cortés L, Jaubert F, Nihoul-Feketé C, Brauner R, Roseblatt M, Fellousa M. SRY protein is expressed in ovotestis and streak gonads from human sex-reversal. *Cytogenet Cell Genet* 2000;91:212–216.
158. Bradford ST, Wilhelm D, Koopman P. Comparative analysis of anti-mouse SRY antibodies. *Sex Dev* 2007;1:305–310.
159. Guerra-Junior G, Maciel-Guerra, AT. Definição do Sexo de Criação. In: Andréa Trevas Maciel-Guerra; Gil Guerra-Junior. (Org.). *Menino ou Menina? Os Distúrbios da Diferenciação do Sexo*. 3ed.Curitiba: Appris, 2019, v. 2, p. 113-116.
160. Santos AP, Maciel-Guerra AT. Diagnóstico dos Distúrbios da Diferenciação do Sexo - Avaliação Citogenética e Citogenômica. In: Andréa Trevas Maciel-Guerra; Gil Guerra-Junior. (Org.). *Menino ou Menina? Os Distúrbios da Diferenciação do Sexo*. 3ed.Curitiba: Appris, 2019, v. 2, p. 33-48.
161. Miranda ML. Diagnóstico dos Distúrbios da Diferenciação do Sexo – Propedêutica cirúrgica diagnóstica. In: Andréa Trevas Maciel-Guerra; Gil Guerra-Junior. (Org.).

Menino ou Menina? Os Distúrbios da Diferenciação do Sexo. 3ed.Curitiba: Appris, 2019, v. 2, p. 89-93.

162. Dohle GR, Elzanaty S, van Casteren NJ. Testicular biopsy: clinical practice and interpretation. Asian J Androl 2012;14(1):88-93.

163. Caputo GFL, Gitirana BL, Manso APP. Técnicas Histológicas. In: MOLINARIO M.E ; CAPUTO G.F.L ; AMENDOEIRA M.R.R ; Ed. FIOCRUZ, Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010,p. 90-185.

164. Andrade JGR, de Angelo LA. Avaliação Histopatológica. In: Andrea Trevas Maciel Guerra; Gil Guerra Junior. (Org.). Menino ou Menina? Os Distúrbios da Diferenciação do Sexo. 3ed.Curitiba: Appris. 2019;2:95-112.

165. Oosterhuis JW, Stoop H, Dohle G, Boellaard W, van Casteren N, Wolffenbuttel K, Looijenga LH. A pathologist's view on the testis biopsy. Int J Androl 2011;34(4):e14-9.

166. Guerra-Junior G, Ceschini M, Marques-de-Faria AP, Silva RBP, Maciel-Guerra AT. A importância da interdisciplinaridade no atendimento dos distúrbios da diferenciação do sexo em hospital universitário. In: Andréa Trevas Maciel-Guerra; Gil Guerra-Junior. (Org.). Menino ou Menina? Os Distúrbios da Diferenciação do Sexo. 3ed.Curitiba: Appris, 2019;2:205-207.

7. ANEXOS

7.1. Variações realizadas nos variados protocolos de FISH utilizados neste trabalho

Desparafinização:

- Lâmina incubada a 60°C overnight e posteriormente a 80°C durante 1 hora e 30 minutos. Seguida de 3 lavagens em xilol durante 10 minutos cada em TA e duas lavagens em etanol 100% durante 5 minutos cada em TA;
- Lâmina incubada durante 8 horas em estufa a 80°C, seguida de 3 lavagens em xilol durante 10 minutos cada e duas lavagens em etanol 100% durante 5 minutos;
- Lâmina incubada a 80°C overnight. Posteriormente 3 lavagens em xilol (10 minutos cada) e duas lavagens em etanol 100% (5 minutos cada);
- Lâmina incubada durante 8 horas a 50°C e posteriormente incubada a 80°C *overnigh*t. Seguida de 3 lavagens em xilol durante 10 minutos cada em TA e duas lavagens em etanol 100% durante 5 minutos cada em TA;

Problemas observados: presença de parafina.

Tempo na pepsina e enzima do kit Cytocell:

- A variação no tempo de incubação em Pepsina foi 8, 10, 12, 13, 15, e 20 minutos. Todas as tentativas foram feitas em Pepsina a 37°C.
- O tempo de incubação utilizando a enzima do kit Cytocell variou entre 10, 20, 25, 30 e 45 minutos.

*Problemas observados: núcleos destruídos, núcleos faltando pedaços, núcleos íntegros, mas sem marcações após a co-denaturação e hibridação.

Tempo e temperatura antes de co-denaturar:

- Lâmina incubada a 45°C durante 5 minutos;
- Lâmina incubada com a sonda a 37°C durante 10 minutos.

Tempo e temperatura de co-denaturação:

- 73°C durante 15 minutos
- 73°C durante 10 minutos
- 83°C durante 10 minutos

*Problema observado: não foram vistas marcações nos núcleos.

Diluição da sonda:Sonda Cytocell

- 14 µl de sonda: 7 µl de sonda + 7 µl buffer
- 10 µl de sonda: 5 µl de sonda + 5 µl buffer
- 8 µl de sonda: 4 µl de sonda + 4 µl buffer
- 6 µl de sonda: 3 µl de sonda + 3 µl buffer
- Apenas a sonda, sem o tampão
- 5 µl apenas da sonda

Sonda Vysis:

- 7 µl de buffer + 2 µl de H₂O + 1 µl de sonda

*Problema observado: não foram observadas marcações nos núcleos.

Hibridação:

- Variação no tempo: overnight e 24 horas a 37°C

*Problema observado: não foram observadas marcações nos núcleos.

7.2. Parecer consubstanciado do CEP (65249316.0.0000.5404).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de mosaicismos ou quimerismo oculto e expressão das proteínas SRY, FOXL2 e SOX9 em tecido gonadal de pacientes 46, XX ou 46, XY com Distúrbio da Diferenciação do Sexo Ovário-Testicular

Pesquisador: FLAVIA MARCORIN DE OLIVEIRA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 65249316.0.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.057.756

Apresentação do Projeto:

O distúrbio da diferenciação do sexo ovário-testicular (DDS OT) é uma condição rara caracterizada pela presença de tecido ovariano e testicular no mesmo indivíduo, em gônadas separadas ou na mesma gônada (ovotestis). O cariótipo pode ser 46,XX (o mais frequente), 46,XY, ou conter anomalias de cromossomos sexuais. A diferenciação testicular depende normalmente da expressão do gene SRY, presente em Yp, que ativa o gene SOX9; este, por sua vez, regula a cascata de genes envolvidos na diferenciação testicular. A diferenciação ovariana depende da ausência do gene SRY e da expressão de genes pró-ovarianos, como FOXL2, que inibem a expressão do SOX9. A etiologia do DDS-OT em indivíduos com cariótipo 46,XX ou 46,XY ainda é desconhecida na maioria dos casos. Poucos estudos buscaram detectar mosaicismos ou quimerismo oculto nas gônadas desses pacientes. Ademais, é escasso o conhecimento sobre a expressão dos genes SRY, SOX9 e FOXL2 no tecido gonadal nesses casos. Assim, este trabalho tem por objetivo investigar a presença de outras linhagens celulares (mosaicismos ou quimerismo oculto) em tecido gonadal de pacientes com DDS-OT 46,XX ou 46,XY e analisar a expressão e localização das proteínas SRY, SOX9 e FOXL2 nos tecidos testicular e ovariano desses pacientes.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.057.756

Número de indivíduos previsto: 9 participantes, sendo 6 apresentando cariótipo 46, XX e 3 com cariótipo 46,XY. O estudo será retrospectivo, realizado a partir de biópsias gonadais arquivadas no Departamento de anatomia Patológica da instituição proponente.

O estudo não será multicêntrico.

Período de coleta de dados: entre 04/2017 e 02/2019.

Orçamento: 18033,63.

Financiamento do estudo: não informado.

Há solicitação de dispensa de apresentação de Termo de consentimento livre e Esclarecido (TCLE), com justificativa adequada. Há previsão de garantia de anonimato dos participantes e declaração de que não serão colhidos exames adicionais dos mesmos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1- Apresentar carta de ciência e concordância em transferir material do Banco de biópsias para o biorrepositório do estudo ora apresentado, assinada pelo profissional responsável pelo respectivo setor do departamento de Anatomia Patológica.

RESPOSTA: Pesquisadores incluíram ofício de ciência e concordância com o estudo, assinado pelos profissionais responsáveis pertencentes ao Departamento de anatomia Patológica.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

2- Sobre biorrepositório: sugerimos que a guarda e autorização de uso das biópsias sob estudo estejam sob responsabilidade direta de um ou ambos orientadores, ou ainda de um profissional com vínculo NÃO temporário com a instituição proponente. PENDÊNCIA RESPONDIDA.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo de pesquisa Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.057.756

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

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

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.057.756

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_820870.pdf	04/05/2017 22:53:13		Aceito
Outros	Oficio_de_ciencia_e_concordancia_Departamento_de_Anatomia_Patologica.pdf	04/05/2017 22:51:21	FLAVIA MARCORIN DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio_atualizado_Flavia.pdf	04/05/2017 22:49:00	FLAVIA MARCORIN DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Atestado_matricula_Flavia.pdf	20/02/2017 11:57:38	FLAVIA MARCORIN DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Flavia.pdf	19/02/2017 08:38:34	FLAVIA MARCORIN DE OLIVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	09/11/2016 08:18:39	FLAVIA MARCORIN DE OLIVEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 11 de Maio de 2017

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
 (Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

7.3. Parecer consubstanciado do CEP (65478617.2.0000.5404).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DO GENE NR5A1 E APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO DO EXOMA PARA IDENTIFICAR MUTAÇÕES PATOGENICAS EM INDIVÍDUOS COM DISTÚRBIO DA DIFERENCIAÇÃO DO SEXO OVÁRIO-TESTICULAR 46,XX

Pesquisador: BEATRIZ AMSTALDEN BARROS

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 6

CAAE: 65478617.2.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.981.739

Apresentação do Projeto:

Esta versão trata-se de uma emenda que visa inserir a pesquisadora e assistente de pesquisa Flávia Marcorin de Oliveira como membro da equipe de pesquisa e introduzir uma nova técnica genômica complementar às já previstas (estudo do exoma e do genoma). Portanto, trata-se de um aprofundamento da sensibilidade da técnica inicialmente prevista, com os mesmos objetivos.

Objetivo da Pesquisa:

Mantidos em relação ao projeto original.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Mantidos em relação ao projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo com as informações do pesquisador responsável contempladas no documento anexado "Emenda_CEP_array.docx" 19/08/2021 14:08:29":

"Ao Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp,

Vcomo mencionado no ofício anterior, solicito ao CEP autorização para introdução de nova técnica genômica complementar às já previstas (estudo do exoma e do genoma) no projeto "Análise do

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.981.739

gene NR5A1 e aplicação da técnica de sequenciamento do exoma para identificar mutações patogênicas em indivíduos com distúrbio da diferenciação do sexo ovário-testicular 46,XX" (CAAE 65478617.2.0000.5404). A técnica a ser acrescentada é a da análise cromossômica por microarray, cuja descrição já se encontra em destaque no corpo do projeto.

O desenho do estudo, as hipóteses e o objetivo permanecem os mesmos. Busca-se investigar a origem do distúrbio da diferenciação do sexo ovário-testicular (DDS-OT) 46,XX em sete pacientes com essa condição e ausência do gene SRY, em busca de mutações no gene NR5A1 ou de variantes raras que permitam identificar genes candidatos envolvidos na origem dessa afecção. Para isto, o gene NR5A1 de todos os pacientes foi triado por sequenciamento de Sanger, e, em dois deles, que apresentam recorrência familiar, foi realizado o estudo do exoma, que detecta mutações pontuais em regiões codificantes; porém, não foram detectadas variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas nos sujeitos da pesquisa.

No decorrer do estudo tornou-se disponível em nosso meio a realização do sequenciamento do genoma (WGS), em que são analisados, além dos éxons, também regiões não codificantes; a emenda para inclusão dessa técnica, o WGS, já foi aprovada pelo CEP no segundo semestre de 2019.

Os resultados obtidos por WGS podem ser validados por estudo citogenômico, a análise cromossômica em microarrays. A combinação dessas duas técnicas permite detectar com ainda maior precisão rearranjos envolvendo genes reconhecidamente associados à diferenciação gonadal. Para isso, poderá ser utilizado o DNA já extraído com o consentimento dos pacientes. Trata-se, portanto, de um aprofundamento da sensibilidade da técnica inicialmente prevista, com os mesmos objetivos. A descrição da técnica a ser empregada encontra-se em anexo.

Finalmente, aproveito a oportunidade para acrescentar como pesquisadora e assistente de pesquisa Flávia Marcorin de Oliveira, CPF 402.945.308-27, que deverá realizar a técnica em questão.

Atenciosamente,

Beatriz Amstalden Barros"

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo abaixo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.981.739

Recomendações:

A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep), do Conselho Nacional de Saúde (CNS) orienta a adoção das diretrizes do Ministério da Saúde (MS) decorrentes da pandemia causada pelo Coronavírus SARS-CoV-2 (Covid-19), com o objetivo de minimizar os potenciais riscos à saúde e a integridade dos participantes de pesquisas e pesquisadores.

De acordo com carta circular da CONEP intitulada "ORIENTAÇÕES PARA CONDUÇÃO DE PESQUISAS E ATIVIDADE DOS CEP DURANTE A PANDEMIA PROVOCADA PELO CORONAVÍRUS SARS-COV-2 (COVID-19)" publicada em 09/05/2020, referente ao item II. "Orientações para Pesquisadores":

- Aconselha-se a adoção de medidas para a prevenção e gerenciamento de todas as atividades de pesquisa, garantindo-se as ações primordiais à saúde, minimizando prejuízos e potenciais riscos, além de prover cuidado e preservar a integridade e assistência dos participantes e da equipe de pesquisa.
- Em observância às dificuldades operacionais decorrentes de todas as medidas impostas pela pandemia do SARS-CoV-2 (COVID-19), é necessário zelar pelo melhor interesse do participante da pesquisa, mantendo-o informado sobre as modificações do protocolo de pesquisa que possam afetá-lo, principalmente se houver ajuste na condução do estudo, cronograma ou plano de trabalho.
- Caso sejam necessários a suspensão, interrupção ou o cancelamento da pesquisa, em decorrência dos riscos imprevisíveis aos participantes da pesquisa, por causas diretas ou indiretas, caberá aos investigadores a submissão de notificação para apreciação do Sistema CEP/Conep.
- Nos casos de ensaios clínicos, é permitida, excepcionalmente, a tramitação de emendas concomitantes à implementação de modificações/alterações no protocolo de pesquisa, visando à segurança do participante da pesquisa, assim como dos demais envolvidos no contexto da pesquisa, evitando-se, ainda, quando aplicável, a interrupção no tratamento dos participantes da pesquisa. Eventualmente, na necessidade de modificar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o pesquisador deverá proceder com o novo consentimento, o mais breve possível.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos na emenda proposta.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.981.739

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.
- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.981.739

-O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_180244_4_E2.pdf	19/08/2021 14:22:55		Aceito
Outros	Emenda_CEP_array.docx	19/08/2021 14:08:29	BEATRIZ AMSTALDEN BARROS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP2021.docx	19/08/2021 14:05:26	BEATRIZ AMSTALDEN BARROS	Aceito
Outros	EmendaCEP2021.docx	02/08/2021 13:26:05	BEATRIZ AMSTALDEN BARROS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_beatrizPDF.pdf	27/01/2020 15:33:28	BEATRIZ AMSTALDEN BARROS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP2020.pdf	27/01/2020 15:30:40	BEATRIZ AMSTALDEN BARROS	Aceito
Outros	Emenda.docx	18/11/2019 20:37:46	BEATRIZ AMSTALDEN BARROS	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorrepositorio_beatriz.pdf	18/02/2017 09:34:29	BEATRIZ AMSTALDEN BARROS	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto_beatriz.pdf	18/02/2017 09:31:45	BEATRIZ AMSTALDEN BARROS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.981.739

Não

CAMPINAS, 17 de Setembro de 2021

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br