

revisão

Genes Envolvidos na Determinação e Diferenciação do Sexo

Maricilda Palandi de Mello
Juliana de G. Assumpção
Christine Hackel

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) (MPM, JGA & CH); Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo (GIEDDS) (MPM & CH); e Departamento de Genética Médica (CH), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP.

Recebido em 01/11/04
Aceito em 17/11/04

RESUMO

O sexo cromossômico é estabelecido na fertilização pela presença de um cromossomo X ou Y. O desenvolvimento dos sexos masculino e feminino passa, num primeiro momento, pela especialização das gônadas em testículos ou ovários; os demais processos decorrem de efeitos secundários provocados pelos hormônios por elas produzidos. As etapas de determinação e diferenciação das gônadas em testículos ou em ovários e a diferenciação dos genitais externos masculinos ou femininos envolvem a expressão específica de uma cascata de genes. Esses genes, seus respectivos padrões de expressão, bem como seus envoltimentos na manifestação de patologias ligadas ao desenvolvimento gonadal e dos genitais externos serão abordados nesta revisão. (Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/1:14-25)

Descritores: Cromossomo; Diferenciação gonadal; Disgenesia gonadal; Gene; Sexo; SRY

ABSTRACT

Genes Involved in Sex Determination and Differentiation.

Chromosomal sex is established at fertilization by the presence of an X or Y chromosome. The first step of male and female development is gonadal specialization in testes or ovaries; all other processes that follow result from secondary effects produced by testis and ovary hormones. Gonadal determination and differentiation and the development of external genitalia involve time- and tissue-specific expression of genes forming a gene cascade. Those genes, their expression profile and their role in the pathological manifestations related to gonadal and external genitalia development will be discussed in this review. (Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/1:14-25)

Keywords: Chromosome; Gene; Gonadal differentiation; Gonadal dysgenesis; Sex; SRY

NOS SERES HUMANOS E NA MAIORIA DOS MAMÍFEROS, os processos de determinação e diferenciação sexuais estão intrinsecamente associados à presença ou à ausência do cromossomo Y no cariótipo (1,2). O evento pivô na determinação sexual é a especialização das gônadas; as demais diferenças entre os sexos são efeitos secundários devidos aos hormônios por elas produzidos (3). O processo como um todo é classicamente dividido em quatro etapas: a determinação do sexo cromossômico, que é estabelecida na fertilização; a diferenciação das gônadas em testículos ou em ovários; a diferenciação dos genitais internos e externos masculinos ou femininos a partir de estruturas indiferenciadas presentes no embrião, que é dependente da presença ou ausência de testículos; e a diferenciação sexual secundária, que é a resposta de vários tecidos aos hormônios produzidos pelas gônadas para completar o fenótipo sexual. Portanto, a expressão

“determinação sexual” relaciona-se principalmente aos processos que levam à função testicular geral; por outro lado, a expressão “diferenciação sexual” refere-se às ações hormonais específicas que levam ao fenótipo sexual de cada indivíduo (4). Essas contribuem para o desenvolvimento dos genitais externos e internos, bem como para a maturação sexual durante a puberdade (5-7).

Múltiplos eventos moleculares regulam as etapas de determinação e diferenciação do sexo, a saber: o desenvolvimento e a proliferação das células germinativas, a sua migração para a crista urogenital e a formação de testículos ou de ovários (8,9). Apenas dois fatores que definem o destino das células germinativas primordiais foram elucidados até o momento em camundongos: *Fragilis* e *Stella* (10). O início da expressão do gene *Fragilis* parece ocorrer no epiblasto proximal, sob a influência de BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*), e em seguida na base do alantóide, onde começa a expressão de *Stella*. Durante a migração das células germinativas para a crista genital, a expressão de *Fragilis* diminui e a de *Stella* aumenta. A inativação de BMP4 leva à inibição da expressão de *Stella* e de *Fragilis* e resulta na ausência de células germinativas, o que comprova a necessidade desses genes na sua formação. Infere-se que somente as células germinativas que atingem a região gonadal sobrevivam e se diferenciem; células que não o fazem sofrem apoptose, embora algumas possam escapar e dar origem a tumores de células germinativas (11). O conhecimento que se tem a respeito dos processos moleculares envolvidos na formação de testículos e ovários será abordado a seguir.

Biologia Molecular da Determinação do Sexo

Determinação de testículos

A determinação testicular foi inicialmente relacionada à existência de um gene no braço curto do cromossomo Y, denominado TDF (*Testis Determining Factor*) (12). A busca por esse “gene” durou cerca de 30 anos e sua descoberta mostrou que os mecanismos genéticos da determinação sexual são ainda mais complexos do que se imaginava (13-16).

O gene, denominado *SRY* (*Sex-determining Region on the Y chromosome*) foi identificado a partir do mapeamento de seqüências Y-específicas em indivíduos portadores de alterações estruturais desse cromossomo (17). O gene consiste de um único éxon e codifica uma proteína de 204 aminoácidos que exibe alta similaridade com proteínas nucleares não histônicas HMG1 e HMG2 (proteínas nucleares do grupo de

alta mobilidade) (18,19). A proteína SRY, cujo domínio HMG de ligação ao DNA (“HMG box”) é formado por 79 aminoácidos, atua como fator de regulação da transcrição que, ao se ligar ao DNA, induz neste um dobramento (17,20,21). A região promotora do gene não contém seqüências do tipo “TATA” ou “CCAAT box” (19). No entanto, encontram-se várias seqüências conservadas na porção 5’, que podem estar relacionadas com o controle da sua expressão (19,22,23). Pelo menos três fatores de transcrição estão aparentemente envolvidos na transativação do *SRY*: Sp1, SF-1 e WT1 (24-26).

Tanto o padrão de expressão de *SRY*, que se inicia e atinge um máximo em torno da sexta semana de desenvolvimento fetal coincidindo com o início da diferenciação das gônadas primordiais em testículos (27) e persistindo em quantidades baixas nas células de Sertoli e nas germinativas (28-30), como a produção de camundongos transgênicos 46,XX que desenvolveram fenótipo masculino pela introdução do gene *SRY* no seu genótipo, comprovaram o papel biológico da proteína SRY na determinação testicular (31,32). Considera-se que sua função como fator de regulação de transcrição seja acionar, direta ou indiretamente, a diferenciação das células de Sertoli (33). Desta forma, a proteína SRY deve regular a expressão de outro(s) gene(s) que participa(m) do processo de determinação do sexo.

Pacientes com cariótipo 46,XY e disgenesia gonadal (DG) apresentam mutações no gene *SRY*. Algumas mutações dentro do “HMG Box” são responsáveis pela reversão do sexo em mulheres XY por diminuírem a capacidade de ligação da proteína SRY ao DNA (34). Outras, por sua vez, não afetam a capacidade de ligação da proteína ao DNA, mas alteram o ângulo de dobramento que ela induz (35). Além das seqüências de ligação ao DNA há dois sítios de sinalização nuclear independentes nas extremidades do “HMG box” (36,37). Uma mutação na porção C-terminal do domínio HMG comprovadamente afeta a localização nuclear da proteína SRY apesar de não alterar sua capacidade de se ligar ao DNA e/ou de dobrá-lo (38).

Outro processo importante para a atividade de fatores de transcrição é a fosforilação. A fosforilação de um fator de transcrição pode afetar sua localização nuclear, sua capacidade de ligação ao DNA ou sua capacidade de transativação. Na porção N-terminal da proteína SRY estão localizados resíduos de serina que são fosforilados por quinases dependentes de AMPc, o que aumenta a atividade de ligação dessa proteína ao DNA (39). Dentre os pacientes com sexo reverso

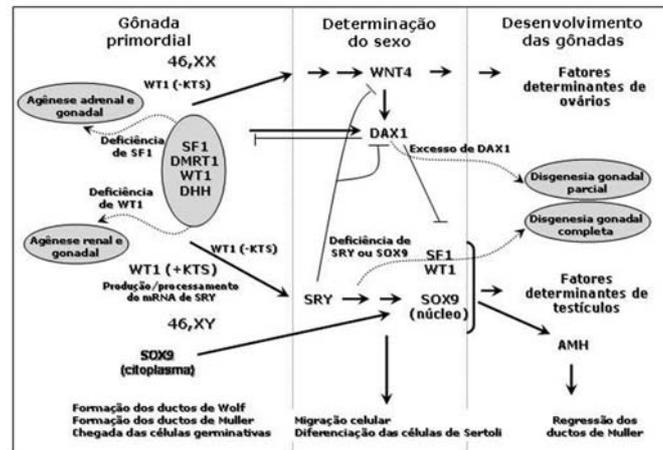


Figura 1. Patologias decorrentes de distúrbios no processo de determinação e diferenciação gonadal. Modelo da “casca-cata” de genes envolvidos na determinação do sexo (adaptada de Harley e cols. (113)). As posições dos vários genes que são considerados importantes controladores dos processos de determinação e diferenciação gonadal, são mostradas na figura e discutidas no texto.

Tabela 1. Genes envolvidos na determinação e diferenciação do sexo e sua associação com distúrbios da diferenciação sexual humana, adaptado de MacLaughlin & Donahoe (9).

Gene (loco) mutações	Proteína e possível função	Alterações fenotípicas decorrentes de
<i>WT1</i> (11p13)	Fator de transcrição	Síndromes de Frasier e de Denys-Drash com tumor de Wilm's
<i>SF-1</i> (9q33)	Fator de transcrição, receptor nuclear	Disgenesia gonadal e adrenal
<i>SOX-9</i> (17q24)	Fator de transcrição <i>high-mobility-group</i>	Displasia camptomélica, disgenesia gonadal masculina ou reversão sexual XY
<i>DHH</i> (12q12-13.1)	Proteína sinalizadora	Disgenesia gonadal
<i>DAX-1</i> (Xp21.3)	Regulador de transcrição, receptor nuclear	Disgenesia gonadal, hipoplasia adrenal congênita
<i>SRY</i> (Yp11)	Fator de transcrição <i>high-mobility-group</i>	Disgenesia gonadal
receptor tipo II de <i>AMH</i> (12q12-13)	Receptor serina-treonina quinase	Síndrome da persistência dos dutos de Müller
<i>AMH</i> (19p13)	Proteína secretada que causa regressão dos dutos de Müller; inibidor de células de Leydig	Síndrome da persistência dos dutos de Müller
<i>AR</i> (Xq11-12 ca)	Receptor de andrógenos, fator de transcrição	PHM ¹ (Síndromes de insensibilidade androgênica)
<i>HSD17B3</i> (9q22)	ligante-dependente 17β-hidroxiesteróide desidrogenase, 17-cetoesteróide redutase	PHM
<i>SRD5A2</i> (2p22-23)	5α-redutase tipo 2	PHM (com virilização na puberdade)
<i>CYP17</i> (10q24-25)	17-hidroxilase: 20-22 liase	PHM
<i>CYP21A2</i> (6q21.3)	21-hidroxilase	PHF - HCA ²
<i>HSD3B2</i> (1p13.1)	3β-hidroxiesteróide desidrogenase tipo II	PHM - HCA
<i>CYP11B1</i> (8q24)	11β-hidroxilase	PHF - HCA
<i>StAR</i> (8p11.2)	Proteína reguladora esteroidogênica aguda	Ambigüidade genital masculina - HCA

¹PHM = pseudo-hermafroditismo masculino;

²PHF-HCA = Pseudo-hermafroditismo feminino - hiperplasia congênita da adrenal

encontram-se casos nos quais as mutações no *SRY*, principalmente as localizadas fora do “HMG box”, são herdadas. Em nossos estudos encontramos duas mutações herdadas: uma localizada em um sítio de fosforilação em uma paciente com disgenesia gonadal completa, em seu pai, nos seus irmãos normais e em dois irmãos com disgenesia gonadal parcial (40);

outra, localizada na porção 5' do gene, fora da sequência codificante, exatamente no sítio de ligação da proteína Sp1 em uma paciente com disgenesia gonadal completa e em seu pai (Assumpção e cols., submetido).

A grande maioria das mutações no gene *SRY* foi encontrada em pacientes 46,XY com diagnóstico

de DG pura, mas há relatos de mutações em pacientes com DG parcial XY, hermafroditismo verdadeiro e reversão sexual com função ovariana parcial (revisado na ref. 40). Em geral, considera-se que mutações no gene *SRY* humano são responsáveis por cerca de 20% dos casos de disgenesia gonadal XY, por outro lado o *SRY* está ausente em aproximadamente 20% dos homens 46,XX. No entanto, em nossos estudos, 100% dos pacientes diagnosticados com disgenesia gonadal pura apresentaram mutações no gene *SRY* (40,41).

Apesar do *SRY* ser a principal chave na determinação testicular, há um grupo grande de evidências que indica que o controle da gonadogênese é um processo muito mais complexo, e que deve haver um número indefinido de genes autossômicos ou ligados ao X que atuam antes (*upstream genes*) e depois (*downstream genes*) da determinação testicular (figura 1), formando uma verdadeira cascata de transcrição (9,42) (tabela 1). Há no genoma humano uma série de cópias da seqüência consenso à qual a proteína SRY se liga. A maioria desses sítios de ligação não está implicada na determinação testicular, o que torna difícil a identificação dos genes regulados pela proteína SRY. Portanto, outra abordagem tem sido empregada na busca dos genes que participam da determinação sexual: a procura de *loci* envolvidos com síndromes nas quais ocorre reversão sexual.

Na cascata coordenada de eventos que conduzem à diferenciação sexual, um gene autossômico, o *WT-1* (*Wilms Tumor suppressor locus - gene 1*, localizado em 11p13), é essencial para o desenvolvimento gonadal e renal em mamíferos (figura 1). Esse gene se expressa nas saliências das gônadas bipotenciais antes de sua diferenciação, portanto, antes da expressão do gene *SRY* e de genes determinantes de ovários. Seus RNA mensageiros são detectáveis a partir da 6ª semana de gestação nos embriões humanos (43). A proteína WT1 é capaz de ativar a transcrição do gene *SRY in vitro* (26), havendo evidências de que atue sinergicamente com a proteína SRY ativando promotores contendo sítios de ligação para esta última (44). Por outro lado, estudos *in vitro* indicam que WT1 e outros fatores de regulação de transcrição podem de forma cooperativa ativar a transcrição do gene *AMH* (*Anti-Müllerian Hormone*) (45,46), uma vez que após a diferenciação testicular o *WT-1* continua sendo transcrito nas células de Sertoli do testículo fetal. No entanto, sua expressão não é limitada ao testículo: no ovário fetal, é detectada nas células epiteliais e na camada granulosa; no rim fetal, se expressa no mesênquima, na vesícula renal e nos podócitos em desenvolvimento.

Mutações nesse gene são encontradas em

quatro afecções humanas diferentes: tumor de Wilms, síndrome WAGR (tumor de Wilms, aniridia, malformação genitourinária e retardo mental), síndrome de Frasier e síndrome de Denys-Drash (47-49). Embora os fenótipos associados às síndromes mencionadas variem, são freqüentes alterações renais e reversão sexual XY. Além disso, através de experimentos envolvendo o *knockout* desse gene, verificou-se que camundongos homozigotos para deleções no gene *WT-1* não desenvolvem testículos nem rins (50).

A proteína WT1 contém 4 motivos protéicos do tipo *zinc-finger* (dedos de zinco) e sua atuação é um reflexo de sua complexidade molecular, pois a combinação de sítios alternativos de início de tradução, de *splicing*, e a edição de RNA podem resultar em até 24 isoformas diferentes (51). De maneira geral, elas podem ser agrupadas em duas categorias funcionais, relacionadas à presença (+KTS) ou ausência (-KTS) de três aminoácidos (KTS = prolina, treonina, serina), em decorrência de um *splicing* alternativo localizado entre as regiões que codificam o 3º e o 4º dedos de zinco. A razão entre as formas WT1(+KTS) e WT1(-KTS) é aproximadamente constante em todos os tipos celulares, considerando-se que as formas -KTS teriam predominantemente um papel regulador de transcrição, enquanto que as +KTS atuariam no processamento de RNA (51).

Linhagens de camundongo com deficiências de variantes WT1(+KTS) representam um modelo animal para a Síndrome de Frasier (52). Desse modo, as implicações clínicas das mutações do gene *WT-1* preconizam que pacientes de sexo fenotípico feminino com esclerose glomerular focal ou síndrome nefrótica sejam avaliadas quanto à possibilidade de reversão sexual XY e que pacientes de sexo fenotípico masculino com virilização deficiente (hipospádia + criptorquidia) e proteinúria sejam averiguados quanto às manifestações relacionadas à síndrome de Denys-Drash, tais como nefropatia e/ou tumor de Wilms (53). Na prática, pacientes com disgenesia gonadal 46,XY parcial não apresentam mutações no gene *WT-1* quando na ausência de anormalidades renais ou manifestações de tumor de Wilms (54). No entanto, a análise genética do gene *WT-1* deve ser feita nestes pacientes devido ao risco do desenvolvimento mais tardio de tumor de Wilms, nefropatia ou gonadoblastoma.

Outro gene autossômico importante que se expressa na gônada indiferenciada em mamíferos é o do receptor nuclear único SF-1 (*Steroidogenic Factor-1*) (figura 1). A proteína SF-1 é um membro da família de receptores nucleares órfãos, sendo considerada o principal regulador das enzimas envolvidas na esteroidogê-

nese adrenal e gonadal. A expressão do gene que a codifica, denominado *NR5A1* (*Nuclear Receptor subfamily 5, group A, member 1*) e mapeado em 9q33, é necessária em três momentos ao longo da determinação e diferenciação testicular: em primeiro lugar, na formação da gônada bipotente, depois nas células de Sertoli para regular a expressão do gene do AMH, e mais tarde nas células de Leydig, para regular a expressão de uma série de hormônios esteróides (55-58), o que indica que esse receptor nuclear atua como mediador da expressão de genes específicos para o sexo masculino.

A homozigose de mutações que inativam a SF-1 em camundongos manifesta-se pela total ausência de desenvolvimento gonadal e adrenal, pela ausência de gonadotrofinas hipofisárias e por alterações estruturais na região ventral e mediana do hipotálamo (59). O seqüenciamento desse gene em uma mulher XY revelou uma mutação de troca de sentido/*missense* (G35E) que, mesmo em heterozigose, causou reversão sexual completa, além da falha adrenal (60). No entanto, dois trabalhos recentes demonstraram um efeito de haploinsuficiência por heterozigose de mutações inativadoras no gene *NR5A1* em casos 46,XY com sexo reverso que não apresentavam deficiência adrenal (61,62).

O gene *SOX9* [*SRY-related high-mobility group (HMG) box 9*], localizado em 17q24.1-25.1, codifica um fator de transcrição que também participa diretamente na transformação das gônadas bipotenciais em testículos em embriões de sexo genético masculino e regula a expressão do AMH (figura 1) (45). No entanto, o gene *SOX9* é também um ativador do gene do colágeno tipo II, que é essencial para a formação da matriz extracelular da cartilagem. Portanto, os defeitos nesse gene levam à reversão sexual em indivíduos 46,XY que está sempre associada às malformações esqueléticas conhecidas como displasia camptomélica (63,64).

Há relatos de outras regiões autossômicas envolvidas na diferenciação sexual: as regiões 9p24 e 10q26.1, relacionadas a sexo reverso em indivíduos XY (65,66). Nestes, a haploinsuficiência da região autossômica 9p24-3 pode interferir na transformação da gônada bissexual, levando a diferentes graus de defeito na formação testicular (de agonadismo a testículo disgenético, passando por gônada "em fita") e, nas mulheres afetadas, pode comprometer a função ovariana, como demonstraram Muroya e cols. (67). Dentro dessa região cromossômica estão localizados os genes *DMRT1* e *2* (*Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor 1 and 2*). Embora os dois genes

apresentem o domínio de regulação gênica DM, apenas o gene *DMRT1* tem sido considerado como candidato ao gene responsável pelo desenvolvimento testicular anormal no cromossomo 9 com base no seu padrão de expressão embrionária e localização cromossômica (figura 1) (68).

O gene *Dhh* (*Desert hedgehog*) expressa-se nas células de Sertoli e segue o padrão de expressão do gene *Sry* nos testículos embrionários de camundongos, não sendo detectado nos ovários fetais (69). Em humanos, o gene *DHH* está localizado em 12q12-q13.1 e é constituído por três exons que codificam uma proteína de 396 aminoácidos, um membro da família *hedgehog* de proteínas sinalizadoras. Os achados em camundongos sugeriram um papel significativo deste gene no desenvolvimento masculino. Umehara e cols. (70) descreveram a primeira mutação nesse gene em um paciente com disgenesia gonadal parcial associada à neuropatia minifascicular. Esses autores sugerem que a proteína DHH deva ser uma molécula-chave que atua tanto na diferenciação gonadal masculina como na formação dos nervos periféricos (figura 1). Mutações em homozigose no gene *DHH* foram descritas recentemente em pacientes 46,XY com disgenesia gonadal completa ressaltando sua importância no processo de desenvolvimento testicular (71).

Em indivíduos 46,XY a duplicação de uma região no braço curto do cromossomo X chamada *DSS* (*Dosage Sensitive Sex reversal*, localizado em Xp21) causa disgenesia gonadal e sexo reverso independentemente da presença do *SRY*, enquanto que a deleção desse *locus* não afeta a diferenciação testicular (72-76). Por outro lado, a duplicação da região *DSS* em um dos cromossomos X de mulheres 46,XX não afeta a diferenciação ovariana.

Dentro da região *DSS* foi descrito o gene *DAX-1* (*DSS - congenital Adrenal hypoplasia, em uma região crítica do cromossomo X, gene 1*), também chamado de *NR0B1* (*Nuclear Receptor subfamily 0, group B, member 1*), que se expressa nas glândulas supra-renais e testículos e não foge à inativação do X (77,78). Desta forma, sua deficiência apresenta um padrão típico de herança ligada ao X, isto é, indivíduos 46,XY manifestam o fenótipo ao passo que os 46,XX são normais. A proteína *DAX-1* é composta por 470 aminoácidos, exibindo dois domínios protéicos: a região N-terminal contém 3,5 repetições de um trecho de 65 a 67 aminoácidos, contendo dois sítios putativos do tipo *zinc-finger*, enquanto que a região C-terminal exibe um domínio de ligação característico da família de receptores nucleares de hormônios (79). Os portadores de hipoplasia adrenal congênita e hipogonadis-

mo hipogonadotrófico, doenças de herança ligada ao cromossomo X, apresentam deleções ou mutações deste gene (80). No entanto, indivíduos com a duplicação desse gene apresentam disgenesia gonadal 46,XY, e por esse fato o gene *DAX-1* foi chamado por alguns autores de gene “anti-testículos” e foi até inicialmente considerado como determinante de ovários (81).

Recentemente, demonstrou-se que a *DAX-1* é efetivamente necessária para a diferenciação testicular, pois em camundongos XY com *Dax-1* inativado observa-se a reversão sexual, com ausência de marcadores celulares de células de Sertoli e de Leydig, e presença de estágios completos de desenvolvimento folicular/ovariano (82). O mecanismo de ação molecular de *DAX-1* permanece elusivo, mas é possível que sua atividade seja fundamental em um período definido como janela durante a diferenciação gonadal (figura 1), onde efeitos de dosagem abaixo ou acima de um determinado limiar venham a interferir com a formação do testículo (79).

Determinação de ovários

Tem sido um fato indiscutível que o sexo constitutivo do desenvolvimento fetal de mamíferos é o feminino. Além disso, um ovário funcional não é requerido para o fenótipo feminino, enquanto que a presença de um testículo é obrigatória para o desenvolvimento masculino. No entanto, a gonadogênese feminina parece depender não só da ausência de expressão do gene

SRY, mas também da expressão de *DAX-1* e de *WNT4* (*Wingless-Type MMTV integration site family, member 4*). Localizado em 1p31-p35, *WNT4* codifica um membro da família de fatores de crescimento envolvidos na sinalização intracelular (83). Estudos realizados em embriões de camundongo demonstraram que o produto do gene *Wnt-4* é essencial na sinalização da nefrogênese no rim metanéfrico, expressando-se também no mesonefro, onde participa da formação das gônadas e dos ductos de Müller (84). A duplicação de 1p31-p35 produz a super expressão de *WNT4* que, por sua vez, induz a expressão de *DAX1* e pode causar reversão do sexo pelo mesmo mecanismo que a duplicação de Xp21 (85).

Por outro lado, em modelo animal, o desenvolvimento sexual em indivíduos do sexo masculino com uma mutação no gene *WNT-4* é normal, ao passo que os do sexo feminino apresentam masculinização, isto é, observa-se ausência dos ductos de Müller e presença dos ductos de Wolff normais, embora em ambos os sexos detectam-se defeitos no desenvolvimento dos rins (figura 1) (85). Recentemente, descreveu-se uma mutação em heterozigose no gene *WNT4* em uma paciente com a Síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser, que se caracteriza pela ausência de útero e vagina em mulheres com amenorréia primária. Portanto, este gene se mostra importante no desenvolvimento e manutenção do fenótipo feminino por regular a formação dos ductos de Müller e por contro-

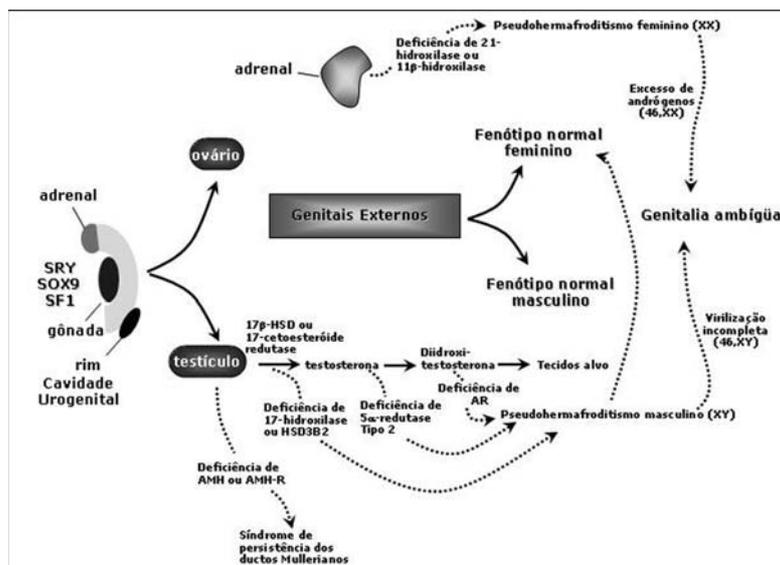


Figura 2. Patologias decorrentes de distúrbios na síntese e na ação dos hormônios (adaptada de MacLaughlin & Donahoe (9)). Após a formação das gônadas, uma redução na atividade hormonal ou uma anomalia na sinalização de receptores específicos podem levar a distúrbios funcionais incluindo a Síndrome de Persistência de Ductos Müllerianos e pseudo-hermafroditismo masculino. Após o desenvolvimento da adrenal, uma redução de atividade enzimática principalmente das CYP21A2 e CYP11B1 produzem pseudo-hermafroditismo feminino.

lar a esteroidogênese nos ovários (86).

A manutenção ovariana é dependente da presença de dois cromossomos X íntegros, caso contrário os folículos ovarianos degeneram e a gônada torna-se *disgenética*. Várias regiões do cromossomo X contêm genes importantes para essa função, tais como a Xp11 (deleções de Xp11.2-11.4 são acompanhadas de amenorréia primária, secundária ou infertilidade) e a Xq13 (genes *POF-2* = gene 2 da falência ovariana prematura e *XIST* = gene da inativação específica da transcrição do cromossomo X, localizados em Xq13-q21.1). No entanto, a partir do estudo de pacientes com falência ovariana prematura, outros genes localizados ao longo do cromossomo X têm sido investigados (87).

Biologia Molecular da Diferenciação do Sexo

Um passo essencial na diferenciação do sexo é a manutenção dos ductos de Müller no sexo feminino e a sua regressão no sexo masculino. Nos testículos, as proteínas WT1 e SF1 ligam-se cooperativamente ao promotor do gene *AMH* e ativam sua transcrição (88). Nos ovários, a proteína DAX-1 liga-se a SF1, inibindo a trans-ativação mediada por WT1/SF1 e suprimindo a indução da expressão do hormônio anti-Mülleriano. Nas células de Leydig, SF1 regula a expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de esteróides e a testosterona pode ser convertida em um andrógeno mais potente, a diidrotestosterona, por meio da enzima 5 α -redutase tipo 2 (figura 2). Para desempenharem suas funções fisiológicas, ambos os hormônios ligam-se aos receptores de andrógenos nas células-alvo, conduzindo à diferenciação dos ductos de Wolff e dos genitais externos no sexo masculino (89).

Assim, após a formação do testículo, falhas no processo de diferenciação sexual que resultam em virilização deficiente da genitália externa e, eventualmente, interna em indivíduos do sexo genético masculino conduzem ao pseudo-hermafroditismo masculino (PHM). Na sua origem, situam-se, em sua maioria, defeitos envolvendo a síntese de hormônios testiculares ou hipofisários, a ligação destes hormônios aos receptores nas células-alvo, ou ainda no seu metabolismo (90).

Entre as principais causas de PHM, as síndromes de insensibilidade aos andrógenos (parcial ou completa) são anomalias com padrão de herança recessivo ligado ao X, decorrentes de mutações no gene do receptor de andrógenos (*AR* – *Androgen Receptor*) (91). Este gene localiza-se na região Xq11-12 e seu derivado protéico pode ser dividido em três domínios funcionais: a região N-terminal (exon 1), essencial para

a ativação da regulação transcricional; a região central (exons 2 e 3) que consiste em dois *zinc-fingers* responsáveis pela ligação ao DNA em regiões promotoras de genes-alvo e a região C-terminal (exons 4 a 8) responsável pela ligação à testosterona (T) e à diidrotestosterona (DHT) (92). Cerca de trezentas mutações diferentes no gene *AR* já foram relatadas na literatura, achando-se relacionadas em um banco de dados acessível pela internet (93). Mutações que interrompem ou alteram substancialmente a seqüência primária da proteína estão invariavelmente associadas à forma completa (SICA) por perda de função do receptor. Mutações que levam à substituição de aminoácidos isolados podem resultar no amplo espectro fenotípico da insensibilidade androgênica em decorrência de alterações que abolem/diminuem a capacidade de ligação do hormônio ao receptor, que afetam a estabilidade dessa interação ou ainda que abolem/diminuem a capacidade de reconhecimento das seqüências alvo de genes que têm sua transcrição regulada pelo complexo hormônio-receptor (94).

Quanto ao metabolismo dos hormônios androgênicos, a conversão de testosterona em 5 α -dihidrotestosterona mediada pela enzima 5 α -redutase tipo 2 (gene *SRD5A2*) é um fenômeno essencial para a correta diferenciação da genitália externa masculina durante a vida fetal (figura 2). Sob a ação do hormônio DHT diferenciam-se o pênis, a uretra e o escroto a partir dos rudimentos genitais externos (tubérculo genital, pregas genitais e saliências labioescrotais), sendo também imprescindível no desenvolvimento da próstata e outros tecidos genitais como epidídimo e vesícula seminal (95). A enzima 5 α -redutase tipo 2 é codificada pelo gene autossômico *SRD5A2* (*Steroid Reductase 5 Alpha type 2*) mapeado em 2p22 → p23 e sua deficiência pode levar à ambigüidade genital em fetos de sexo masculino. Mais de 40 mutações diferentes já foram descritas (95,96), levando à perda total ou parcial da atividade enzimática, abolindo ou afetando os domínios de ligação ao cofator NADPH ou à testosterona (97,98). Em decorrência da diversidade de mutações observadas, as manifestações fenotípicas podem ser bastante heterogêneas, visto que, ao nascimento, os indivíduos podem apresentar desde genitália externa quase feminina com gônadas palpáveis ou não, passando pelos mais variados graus de ambigüidade (freqüentemente com hipospadias graves e seio urogenital) até um fenótipo masculino quase normal com criptorquidia (99 e artigo por Hackel e cols. neste suplemento).

Mais raramente, ainda no sexo masculino, encontram-se distúrbios caracterizados pela persistên-

cia dos ductos de Müller, geralmente causados por mutações que levam à perda de função de proteínas expressas pelo testículo, tais como o hormônio anti-Mülleriano (gene *AMH* localizado em 19p13) ou seu receptor (*AMH-R*, mapeado em 12q13) (9). Além desses, outros genes portadores de mutações inativadoras podem também causar ambigüidade genital em indivíduos 46,XY. Tanto na deficiência da enzima 3 β -hidroxiesteróide-desidrogenase/isomerase, que atua tanto na adrenal quanto nas gônadas e é provocada por mutações no gene *HSD3B2*, quanto na deficiência de 17 α -hidroxilase, causada por mutações no gene *CYP17*, observa-se ambigüidade genital em indivíduos do sexo masculino (figura 2) (100).

No sexo feminino, distúrbios no processo de diferenciação sexual que conduzem à virilização parcial ou total da genitália externa são, em sua grande maioria, decorrentes de deficiências enzimáticas na via de síntese de corticosteróides na adrenal (101). A esteroidogênese se inicia através do transporte do colesterol da membrana externa para a membrana interna da mitocôndria por intermédio da ação da proteína StAR (*Steroidogenesis Acute Regulatory protein*) (81). Esse é considerado hoje o passo limitante do controle preciso da esteroidogênese. O cortisol é, então, sintetizado a partir do colesterol na zona fasciculada do córtex adrenal. Este processo requer a ação de 5 enzimas: a *CYP11A1* (colesterol desmolase), a *HSD3B2* (3 β -hidroxiesteróide-desidrogenase/isomerase), a *CYP17* (17-hidroxilase), *CYP21A2* (21-hidroxilase) e a *CYP11B1* (11 β -hidroxilase) (101).

As deficiências enzimáticas adrenais descritas acima conduzem a níveis cronicamente elevados de ACTH, ao aumento do estímulo e conseqüente hiperplasia do córtex adrenal. As deficiências de *CYP21A2* e de *CYP11B1* provocadas por mutações nos seus respectivos genes são as causas mais freqüentes de virilização de indivíduos do sexo feminino por acúmulo de andrógenos (figura 2) (102). Vários trabalhos descrevem o perfil de mutações em pacientes no Brasil (103-112).

REFERÊNCIAS

- Jacobs PA, Baikie AG, Court Brown WN, Forrest H, Roy JR, Stewart JS, et al. Chromosomal sex in the syndrome of testicular feminization. **Lancet** 1959;2:591-2.
- Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). **Lancet** 1959;1:711-3.
- Jost A, Vigier B, Prepin J, Perchellet JP. Studies on sex differentiation in mammals. **Rec Progr Horm Res** 1973;29:1-41.
- Goodfellow PN, Darling SM. Genetics of sex determination. **Development** 1988;102:251-8.
- Grumbach MM, Ducharme JR. The effects of androgens on fetal sexual development: androgen-induced female pseudohermaphroditism. **Fertil Steril** 1960;11:157-80.
- Josso N. Hormonal regulation of sexual differentiation. **Semin Perinatol** 1992;16:279-88.
- Hackel C, de Mello MP, Guerra Jr G. Determinação e diferenciação sexuais normais: genes envolvidos. In: Maciel-Guerra AT, Guerra Jr G, editors. **Menino ou Menina? Os distúrbios da diferenciação do sexo**. São Paulo:Editora Manole Ltda.; 2002.p.18-26.
- Brennan J, Chapel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. **Nat Rev Genet** 2004;5:509-21.
- MacLaughlin DT, Donahoe PK. Mechanisms of disease: Sex determination and differentiation. **N Engl J Med** 2004;350:367-78.
- Saitou M, Barton SC, Surani MA. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. **Nature** 2002;418:293-300.
- Talerman A. Germ cell tumours. **Ann Pathol** 1985;5:145-575.
- Wachtel SS, Koo S, Boyse EA. Evolutionary conservation of H-Y antigen. **Nature** 1975;254:270-2.
- Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EMC, Mardon G, Pollack J, et al. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. **Cell** 1987;51:1091-104.
- Schneider-Gadicke A, Beer-Romero P, Brown LG. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. **Cell** 1989;57:1247-58.
- Sinclair AH, Poster JW, Spencer JA. Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials. **Nature** 1988;336:780-3.
- Palmer MS, Sinclair AH, Berta P, Ellis A, Goodfellow PN, Abbas NE, et al. Genetic evidence that ZFY is not the Testis-Determining Factor. **Nature** 1989;342:937-9.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature** 1990;346:2404.
- Behlke MA, Borgan JS, Beer-Romero P, Page DC. Evidence that the SRY protein is encoded by a single exon on the human Y chromosome. **Genomics** 1993;17:736-9.
- Su H, Lau YFC. Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. **Am J Hum Genet** 1993;52:24-38.

20. Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. **Eur J Mol Biol** **1998**;11:794-802.
21. Giese K, Cox J, Grosschedl R. The HMG domain of the lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. **Cell** **1992**;69:185-95.
22. Vilain E, Fellous M, McElreavey K. Characterization and sequence of the 5' flanking region of the human testis-determining factor SRY. **Meth Mol Cell Biol** **1992**;3:128-34.
23. Veitia RA, Fellous M, McElreavey K. Conservation of Y chromosome-specific sequences immediately 5' to the testis determining gene in primates. **Gene** **1997**;199:63-70.
24. Desclozeaux M, Poulat F, de Santa Barbara P, Soullier S, Jay P, Berta P, et al. Characterization of two Sp1 binding sites of the human sex determining SRY promoter. **Biochem Biophys Acta** **1998**;1397:247-52.
25. de Santa Barbara P, Méjean C, Moniot B, Malclès M-H, Berta P, Boizet-Bonhoure B. Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. **Biol Reprod** **2001**;64:775-83.
26. Hossain A, Saunders GF. The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. **J Biol Chem** **2001**;276:16817-23.
27. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. **Nature** **1990**;346:245-50.
28. Salas-Cortés L, Jaubert F, Bono MR, Fellous M, Rosenblatt M. Expression of the human SRY protein during development in normal male gonadal and sex-reversed tissues. **J Exp Zool** **2001**;290:607-15.
29. McElreavey K, Fellous M. Sex determination and the Y chromosome. **Am J Med Genet** **1999**;89:176-85.
30. Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortés L, et al. SRY, SOX9 and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. **Mech Dev** **2000**;91:402-7.
31. Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, et al. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. **Nature** **1990**;348:448-50.
32. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. **Nature** **1991**;351:117-21.
33. Rossi P, Dolci S, Albanesi C, Grimaldi P, Geremia R. Direct evidence that the mouse sex-determining gene Sry is expressed in somatic cells of male fetal gonads and in the germ cell line in the adult testis. **Mol Reprod Dev** **1993**;34:369-73.
34. Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD, Sockanathan S, et al. DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. **Science** **1992**;255:453-6.
35. Pontiggia A, Rimini R, Harley VR, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. **EMBO J** **1994**;13:6115-24.
36. Poulat F, Girard F, Chevron MP, Gozé C, Rebillard X, Calas B, et al. Nuclear localization of the testis determining gene product SRY. **J Cell Biol** **1995**;128:737-48.
37. Südbek P, Scherer G. Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. **J Biol Chem** **1997**;272:27848-52.
38. Li B, Zhang W, Chan G, Jancso-Radeck A, Liu S, Weiss MA. Human sex reversal due to impaired nuclear localization of SRY. **J Biol Chem** **2001**;76:46480-4.
39. Desclozeaux M, Poulat F, de Santa Barbara P, Capony JP, Turowski P, Jay P, et al. Phosphorylation of an N-terminal motif enhances DNA-binding activity of the human SRY protein. **J Biol Chem** **1998**;273:7988-95.
40. Assumpção JG, Maciel-Guerra AT, Marques-de-Faria AP, Guerra G Jr, Scolfaro MR, de Mello MP. An inherited deletion in a Sp1 binding site in the 5' non-coding region of SRY gene is associated with the sex reversal. **J Mol Med** **2002**;80:782-90.
41. Assumpção JG, Maciel-Guerra AT, de Mello MP. A recurrent nonsense mutation in the conserved domain of SRY in a Brazilian patient with 46,XY gonadal dysgenesis. **J Pediatr Endocrinol Metab** **1999**;13:455-7.
42. McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. **Proc Natl Acad Sci USA** **1993**;90:3368-72.
43. Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, et al. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. **Nature** **1990**;346:194-7.
44. Matsuzawa-Watanabe Y, Inoue J, Semba K. Transcriptional activity of testis-determining factor SRY is modulated by the Wilms' tumor 1 gene product, WT1. **Oncogene** **2003**;22:5956-60.
45. de Santa Barbara P, Moniot B, Poulat F, Berta P. Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. **Dev Dyn** **2000**;217:293-8.
46. Hossain A, Saunders GF. Role of Wilms' tumor 1 (WT1) in the transcriptional regulation of the Müllerian-inhibiting substance promoter. **Biol Reprod** **2003**;69:1808-14.
47. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. Homozygous deletions in Wilms' tumors of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. **Nature** **1990**;343:774-8.
48. Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, et al. Germ-line mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. **Cell**

- 1991;67:437-47.
49. Barbeaux S, Niaudet P, Gubler MC, Grunfeld JP, Jaubert F, Kuffenn F, et al. Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. **Nat Genet** 1997;17:467-70.
50. Kreiberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, et al. WT1 is required for early kidney development. **Cell** 1993;74:679-91.
51. Wagner KD, Wagner N, Schedl A. The complex life of WT1. **J Cell Sci** 2003;116:1653-8.
52. Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Ziegler U, et al. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. **Cell** 2001;106:319-29.
53. Auber F, Lortat-Jacob S, Sarnacki S, Jaubert F, Salomon R, Thibaud E, et al. Surgical management and genotype/phenotype correlations in WT1 gene-related diseases (Drash, Frasier syndromes). **J Pediatr Surg** 2003;38:124-9.
54. Tagliarini EB, Assumpção JG, Scolfaro MR, de Mello MP, Maciel-Guerra AT, Guerra Jr G, et al. Mutation in *SRY* and *WT-1* genes required for gonadal development are not responsible for XY partial gonadal dysgenesis. **Braz J Med Biol Res** 2004 (in press).
55. Shen WH, Moore CCD, Ikeda Y, Parker KL, Holly AI. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. **Cell** 1994;77:651-61.
56. Sugawara T, Holt JA, Kiriadkidou M, Strauss III JF. Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. **Biochemistry** 1996;35:9052-9.
57. Giulli G, Shen WH, Ingraham HA. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Müllerian inhibiting substance, *in vivo*. **Development** 1997;124:1799-807.
58. Crawford PA, Dorn C, Sadovsky Y, Milbrandt J. Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. **Mol Cell Biol** 1998;18:2949-56.
59. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. **Cell** 1994;77:481-90.
60. Achermann JC, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. **Nat Genet** 1999;22:125-6.
61. Correa RV, Domenice S, Bingham NC, Billerbeck AEC, Rainey WE, Parker KL, et al. A microdeletion in the ligand binding domain of human Steroidogenic Factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 2004;89:1767-72.
62. Mallet D, Bretones P, Michel-Calemard L, Dijoud F, David M, Morel Y. Gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46, XY patient heterozygous for the nonsense C16X mutation: a case of SF1 haploinsufficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 2004;89:4829-32.
63. Foster JW, Graves JAM. An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994;91:1927-31.
64. 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.
65. Vialard F, Ottolenghi C, Gonzales M, Choiselet A, Girard S, Siffroi JP, et al. Deletion of 9p associated with gonadal dysfunction in 46,XY but not in 46,XX human fetuses. **J Med Genet** 2002;39:514-8.
66. Wilkie AOM, Campbell FM, Daubeney P, Grant DB, Daniels RJ, Mullarkey M, et al. Complete and partial XY sex reversal associated with terminal deletion of 10q: report of 2 cases and literature review. **Am J Med Genet** 1993;46:597-600.
67. Muroya K, Okuyama T, Goishi K, Ogiso Y, Fukuda S, Kameyama J, et al. Sex-determining gene(s) on distal 9p: clinical and molecular studies in six cases. **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85:3094-100.
68. Pask AJ, Behringer RR, Renfree MB. Expression of DMRT1 in the mammalian ovary and testis - from marsupials to mice. **Cytogenet Genome Res** 2003;101:229-36.
69. Bitgood MJ, MacMahon AP. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. **Dev Biol** 1995;172:126-38.
70. Umehara F, Tate G, Itoh K, Yamaguchi N, Douchi T, Mitsui T, et al. A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46,XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy. **Am J Hum Genet** 2000;67:1302-5.
71. Canto P, Soderlund D, Reyes E, Mendez JP. Mutations in the desert hedgehog (DHH) gene in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis. **J Clin Endocrinol Metab** 2004;89:4480-3.
72. Bernstein R, Koo GC, Wachtel SS. Abnormality of the X chromosome in human 46,XY female siblings with dysgenetic ovaries. **Science** 1980;207:768-9.
73. Ogata T, Hawkins JR, Taylor A, Matsuo N, Hata J, Goodfellow PN. Sex reversal in a child with a 46,X,Yp+ karyotype: support for the existence of a gene(s), located in distal Xp, involved in testis formation. **J Med Genet** 1992;29:226-30.
74. Bardoni B, Floridia G, Guioli S, Peverali G, Anichini C, Cisternino M, et al. Functional disomy of Xp22-pter in three males carrying a portion of Xp translocated to Yq. **Hum Genet** 1993;91:333-8.
75. Arn P, Chen H, Tuck-Müller CM, Mankinen C, Wachtel G, Li S, et al. SRVX, a sex reversing locus in Xp21.2 → p22.11. **Med Genet** 1994;93:389-93.
76. Bajalica S, Blennow E, Tsezou A, Galla-Voumvouraki A, Alevizaki M, Sinaniotis C, et al. Partial disomy of Xp and the presence of SRY in a phenotypic female. **J Med Genet** 1995;32:987-90.

77. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley KC, Tonini G, et al. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. **Nature Genet** **1994**;7:497-501.
78. Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, et al. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. **Nature** **1994**;372:635-41.
79. Ludbrook L, Harley VR. Sex determination: a window of DAX-1 activity. **Trends Endocrinol Metab** **2004**;15:116-22.
80. Fujieda K, Okuhara K, Abe S, Tajima T, Mukai T, Nakae J. Molecular pathogenesis of lipoid adrenal hyperplasia and adrenal hypoplasia congenita. **J Steroid Biochem Mol Biol** **2003**;85:483-9.
81. Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R. Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. **Nature** **1998**;391:761-7.
82. Meeks JJ, Weiss J, Jameson JL. Dax-1 is required for testis determination. **Nat Genet** **2003**;34:32-3.
83. Dale TC. Signal transduction by the Wnt family of ligands. **Biochem J** **1998**;329:209-23.
84. Jordan A, Mohammed M, Saunders TC, Délot E, Chen X-N, Dewing P, et al. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage sensitive sex reversal in humans. **Am J Hum Genet** **2001**;68:1102-9.
85. Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signaling. **Nature** **1999**;397:405-9.
86. Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle EJ. A WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. **N Engl J Med** **2004**;351:792-8.
87. Santoro N. Mechanisms of premature ovarian failure. **Ann Endocrinol (Paris)** **2003**;64:87-92.
88. Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarras P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. **Mol Cell Endocrinol** **2003**;211:21-31.
89. Parker KL, Schimmer BP, Schedel A. Genes essential for early events in gonadal development. **Cell Mol Life Sci** **1999**;55:831-8.
90. Guerra Jr G, Ferraz LFC, Hackel C. Deficiência de 5 α -redutase tipo II. In: Maciel-Guerra AT, Guerra Jr G, editores. **Menino ou Menina? Os distúrbios da diferenciação do sexo**. São Paulo:Editora Manole Ltda.; **2002**.p.128-39.
91. Brinkmann AO. Molecular basis of androgen insensitivity. **Mol Cell Endocrinol** **2001**;179:105-9.
92. Pinsky L, Beitel LK, Kazemi-Esfarjani P, Lumbroso R, Marie Vasiliou D, Shkolny D, et al. Lessons from androgen receptor gene mutations that cause androgen resistance in humans. In: Hughes IA, editor. **Frontiers in Endocrinology**. Roma:Serono Symposia; **1996**.p.95-114.
93. The Androgen Receptor Gene Mutations Database World Wide Web Server. <http://ww2.mcgill.ca/androgendb>. Accessed August 18, **2004**.
94. MacPhaul MJ, Griffin JE. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of the human androgen receptor. **J Clin Endocrinol Metab** **1999**;84:3435-41.
95. Imperato-McGinley J, Zhu Y-S. Androgens and male physiology: the syndrome of 5 α -reductase-2 deficiency. **Mol Cell Endocrinol** **2002**;198:51-9.
96. Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW. Deletion of steroid 5 α -reductase-2 gene in male pseudohermaphroditism. **Nature** **1991**;354:159-61.
97. Russell DW, Wilson JD. Steroids 5 α -reductases: two genes/two enzymes. **Ann Rev Biochem** **1994**;63:25-61.
98. Wigley WC, Prihoda JS, Mowszowicz I, Mendonça BB, New MI, Wilson JD, et al. Natural mutagenesis study of the human steroid 5 α -reductase 2 isozyme. **Biochemistry** **1994**;33:1265-70.
99. Sinnecker GHG, Hiert O, Dibbelt L, Albers N, Dorr HG, Hauss H, et al. Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 α -reductase 2 deficiency. **Am J Med Genet** **1996**;63:223-30.
100. New MI. Inborn errors of adrenal steroidogenesis. **Mol Cell Endocrinol** **2003**;211:75-83.
101. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. **N Engl J Med**. **2003**;349:776-88.
102. De Mello MP, Bachega TASS, Da Costa-Santos M, Mermejo LM, Castro M. Bases moleculares da Hiperplasia Adrenal Congênita. **Arq Bras Endocrinol Metab** **2002**;46:457-77.
103. De Araújo M, Sanches MR, Suzuki LA, Guerra Jr G, Farah SB, De Mello MP. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical congenital adrenal hyperplasia. **Braz J Med Biol Res** **1996**;29:1-13.
104. Paulino LC, Araujo M, Guerra G Jr, Marini SH, De Mello MP. Mutation distribution and CYP21/C4 locus variability in Brazilian families with the classical form of the 21-hydroxylase deficiency. **Acta Paediatr** **1999**;88:275-83.
105. Lau IF, Soardi FC, Lemos-Marini SH, Guerra Jr G Jr, Baptista MT, De Mello MP. H28+C insertion in the CYP21 gene: a novel frameshift mutation in a Brazilian patient with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **2001**;86:5877-80.
106. Torres N, Mello MP, Germano CM, Elias LL, Moreira AC, Castro M. Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the CYP21A1P to the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. **Braz J Med Biol Res** **2003**;36:1311-8.
107. De Carvalho CE, Penachioni JY, Castro M, Moreira AC, De Mello MP. CYP11B1 intragenic polymorphisms give evidences for a different Q356X allele in an African-Brazilian patient. **J Endocr Genet** **1999**;1:79-86.
108. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, et al. Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **1998**;83:4416-9.

-
109. Billerbeck AE, Bachega TA, Frazatto ET, Nishi MY, Goldberg AC, Marin ML, et al. A novel missense mutation, GLY424SER, in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **1999**;84:2870-2.
110. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Arnhold IJ, Medeiros MA, Marcondes JA, et al. Low frequency of CYP2B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **Hum Hered** **1999**;49:9-14.
111. Billerbeck AE, Mendonca BB, Pinto EM, Madureira G, Arnhold IJ, Bachega TA. Three novel mutations in CYP21 gene in Brazilian patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency due to a founder effect. **J Clin Endocrinol Metab** **2002**;87:4314-7.
112. Witchel SF, Smith R, Crivellaro CE, Della Manna T, Dichtchekian V, Setian N, et al. CYP21 mutations in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. **Hum Genet** **2000**;106:414-9.
113. Harley VR, Clarkson MJ, Argentaro A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 (SRY-related high-mobility group (HMG) box 9). **Endocr Rev** **2003**;24:466-87.

Endereço para correspondência:

Maricilda Palandi de Mello
CBMEG-UNICAMP
Caixa Postal 6010
13083-875 Campinas, SP
E-mail: mmello@unicamp.br