



GEORGETTE BEATRIZ DE PAULA

**DIAGNÓSTICO DE 408 CASOS DE AMBIGUIDADE GENITAL
ACOMPANHADOS POR UMA ÚNICA EQUIPE INTERDISCIPLINAR
DURANTE 23 ANOS**

CAMPINAS

2015



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

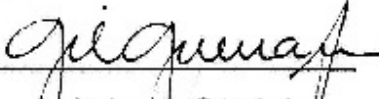
GEORGETTE BEATRIZ DE PAULA

DIAGNÓSTICO DE 408 CASOS DE AMBIGUIDADE GENITAL
ACOMPANHADOS POR UMA ÚNICA EQUIPE INTERDISCIPLINAR
DURANTE 23 ANOS

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

Orientador: Gil Guerra Júnior

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA GEORGETTE BEATRIZ DE PAULA E ORIENTADA PELO PROF. DR. GIL GUERRA JÚNIOR


Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2015

Agência de fomento: Não se aplica
Nº processo: Não se aplica

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

P281d Paula, Georgette Beatriz de, 1981-
Diagnóstico de 408 casos de ambiguidade genital acompanhados por uma
única equipe interdisciplinar durante 23 anos / Georgette Beatriz de Paula. –
Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Gil Guerra Júnior.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Transtornos do desenvolvimento sexual. 2. Diferenciação sexual. 3.
Recém-nascido. 4. Determinação do sexo. I. Guerra Júnior, Gil, 1960-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Diagnóstico de 408 casos de ambiguidade genital acompanhados
por uma única equipe interdisciplinar durante 23 anos

Palavras-chave em inglês:

Disorders of sex development

Sex differentiation

Infant, Newborn

Sex determination

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Gil Guerra Júnior [Orientador]

Angela Maria Spinola Castro

Joaquim Murray Bustorff-Silva

Data de defesa: 12-08-2015

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

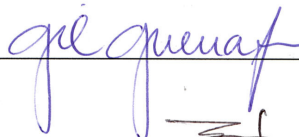
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

GEORGETTE BEATRIZ DE PAULA

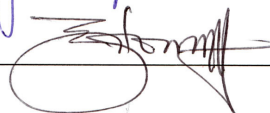
Orientador (a) PROF(A). DR(A). GIL GUERRA JÚNIOR

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). GIL GUERRA JÚNIOR



2. PROF(A). DR(A). JOAQUIM MURRAY BUSTORFF-SILVA



3. PROF(A). DR(A). ANGELA MARIA SPINOLA CASTRO



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

Data: 12 de agosto de 2015

RESUMO

Objetivo: verificar a frequência dos diagnósticos, a idade e a definição do sexo dos casos de Distúrbio da Diferenciação do Sexo (DDS) com ambiguidade genital.

Casuística e métodos: Foram incluídos todos os casos atendidos entre janeiro de 1989 e dezembro de 2011 num mesmo serviço de avaliação clínica e laboratorial. O critério de definição de ambiguidade genital foi o proposto pelo Consenso de Chicago de 2006. Foram analisados os cariótipos, diagnósticos, a idade na primeira consulta, o peso ao nascimento e a definição do sexo de criação.

Resultados: Foram 408 casos de DDS com ambiguidade genital, sendo 250 (61,3%) com cariótipo 46,XY, 124 (30,4%) 46,XX e 34 (8,3%) com aberração de cromossomos sexuais. Dos 408 casos, 189 (46,3%) foram DDS 46,XY testicular, 105 (25,7%) DDS 46,XX ovariano, 95 (23,3%) distúrbio da determinação gonadal (DDG) e 19 (4,7%) por malformações genitourinárias complexas. Dentre os DDS 46,XY testicular, destacaram-se os casos de insensibilidade androgênica, deficiência de 5 α -redutase tipo 2 e hipogonadismo hipogonadotrófico. Dentre os DDS 46,XX ovariano, a principal causa foi a hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase forma perdedora de sal. Nestes dois grupos foram observados vários casos de DDS com outras malformações associadas. Dentre os DDG, os mais frequentes foram as disgenesias gonadais parciais XY, as disgenesias gonadais mistas e os DDS ovotesticular. O peso de nascimento abaixo de 2.500 g foi observado em 42 casos de DDS 46,XY testicular. A idade média ao diagnóstico foi de 31,7 meses, sendo menor no grupo de DDS 46,XX ovariano. O sexo de criação final foi masculino em 238 casos e feminino em 170.

Conclusões: Nesta ampla casuística de DDS com ambiguidade genital acompanhados por uma única equipe durante 23 anos, o cariótipo 46,XY foi o mais observado, porém a hiperplasia adrenal congênita foi a etiologia isolada mais frequente. As malformações associadas foram frequentes em todos os grupos de DDS e o baixo peso ao nascimento esteve associado ao DDS 46,XY testicular.

Palavras-chave: ambiguidade genital. diferenciação sexual. recém-nascido. sexo de criação.

ABSTRACT

Objective: To verify the frequency of the diagnosis, age and sex definition of Disorder of Sex Development (DSD) with ambiguous genitalia cases. **Methods:** All cases followed between January 1989 and December 2011 with the same clinical and laboratory service were included. The genital ambiguity criteria was proposed by the Chicago Consensus of 2006. The karyotype, diagnosis, age on their first visit, birth weight and gender of rearing, were analysed. **Results:** There were 408 cases of DSD with genital ambiguity, 250 (61.3%) with 46,XY karyotype, 124 (30.4%) 46,XX and 34 (8.3%) with sex chromosomes aberration. Of the 408 cases, 189 (46.3%) were 46,XY testicular DSD, 105 (25.7%) 46,XX ovarian DSD, 95 (23.3%) disorder of gonadal development (DGD) and 19 (4.7%) due to complex genitourinary malformations. Among the 46,XY testicular DSD, the cases of androgen insensitivity, 5 α -reductase type 2 deficiency and hypogonadotropic hypogonadism were highlighted. Among the 46,XX ovarian DSD, the main cause was the congenital adrenal hyperplasia due 21-hydroxylase deficiency in salt wasting form. In both groups, several cases of DSD with other associated malformations were observed. Among the DGD, the most frequent were the 46,XY partial gonadal dysgenesis, mixed gonadal dysgenesis, and the ovotesticular DSD. Birth weight less than 2,500 g was observed in 42 cases of 46,XY testicular DSD. The average age at diagnosis was 31.7 months, and lower in the 46,XX ovarian DSD group. The final social sex was male in 238 cases and female in 170. **Conclusions:** In this large sample of DSD with ambiguous genitalia accompanied by a single team for 23 years, 46,XY karyotype was the most observed, however congenital adrenal hyperplasia was the most frequently isolated etiology. The associated malformations were common in all DSD groups and low birth weight was associated with the 46,XY testicular DSD.

Keywords: genital ambiguity. sexual differentiation. newborn. gender identity.

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA	16
OBJETIVOS	18
REVISÃO DE LITERATURA	19
1. Determinação e Diferenciação Sexual Normais	19
2. Determinação Sexual (Figura 1).....	19
3. Determinação Gonadal e Diferenciação dos Genitais Internos	25
4. Diferenciação dos Genitais Externos.....	28
5. Definição de Ambiguidade Genital e Critérios de Avaliação.....	32
6. Classificação de DDS com e sem ambiguidade genital	36
CASUÍSTICA E MÉTODOS	52
RESULTADOS	55
DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS.....	68

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que me forneceram a estrutura familiar necessária, amor e segurança para que eu pudesse chegar até aqui e exercer a nobre profissão de médica.

À minha irmã, companheira incontestável, que jamais permitiu que eu esmorecesse nos momentos de dificuldade e estava sempre pronta para me incentivar a continuar.

Aos docentes da Endocrinologia Pediátrica da UNICAMP, da Genética e também da Pediatria, que me receberam de braços abertos na Universidade, sempre estimularam o aprendizado e estiveram disponíveis para sanar dúvidas e dificuldades.

AGRADECIMENTOS

Acredito que sozinho ninguém construa nada. Muitas foram as pessoas que me acompanharam, ajudaram e estiveram presentes para que este sonho se tornasse realidade. Agradeço aos colegas e preceptores do Hospital Municipal Dr. Mário Gatti e Maternidade de Campinas, pois foi nestes hospitais que “nasci” para o exercício da pediatria.

À amiga Cíntia Surur, que foi quem me incentivou a fazer endocrinologia pediátrica e sempre esteve ao meu lado, fornecendo estímulo para busca do conhecimento.

Agradeço aos meus pais Valdir de Paula e Clélia Andrade de Paula e irmã Kátia Regina de Paula pelo incentivo de sempre. Aos amigos e familiares pelas palavras de apoio e carinho, como também por compreenderem tantos momentos de ausência.

Ao meu namorado Thiago José da Silva, pelo apoio e paciência e por não ter poupado esforços para me ajudar na conclusão deste sonho.

Aos colegas de pós-graduação, Ezequiel, Juliana, Letícia e Guilherme que trilharam comigo esta trajetória, sempre emitiram palavras de estímulo e contribuíram diretamente para que este trabalho fosse possível. À residente Beatriz Amstalden Barros e ex-residente Bruna Tincani por me ajudarem na coleta dos dados.

À equipe do CBMEG, pelo aprendizado e paciência que tiveram comigo, no conhecimento do fantástico mundo da biologia molecular.

Aos pacientes do GIEDDS, pois sem eles, tal aprendizado não seria possível. Contribuíram para que eu me tornasse não apenas profissional, mas uma pessoa melhor.

Agradecimento especial ao orientador Prof. Dr. Gil Guerra Junior, que jamais permitiu que eu esmorecesse nas situações adversas, que acreditou e confiou em meu potencial para que este trabalho fosse concluído.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Genes participantes da determinação gonadal [modificado de Eggers & Sinclair, 2012 (6)].	20
Figura 2: Classificação de Prader [adaptado de Prader, 1954 (18)].....	34
Figura 3: Classificação da gravidade da ambiguidade genital para insensibilidade androgênica [adaptado de Quigley e cols., 1995 (19)].	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pontuação dos sinais de virilização da genitália externa (EMS) [adaptado de Ahmed e cols., 2000 (20)].	36
Tabela 2: Classificação de DDS segundo o cariótipo [adaptado de Lee e cols., 2006 (2)].	38
Tabela 3: Classificação dos DDS com base no cariótipo e tecido gonadal [adaptado de Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010 (24)].	39
Tabela 4: Características clínicas das principais causas de DDS com ambiguidade genital.....	41
Tabela 5: Frequência de diagnóstico etiológico de 408 casos consecutivos de DDS com ambiguidade genital atendidos no GIEDDS – UNICAMP entre janeiro de 1989 e dezembro de 2011.	57
Tabela 6: Frequência de sexo inicial e sexo final de 408 casos consecutivos de DDS com ambiguidade genital atendidos no GIEDDS – UNICAMP entre janeiro de 1989 e dezembro de 2011.	58
Tabela 7: Frequência de sexo inicial e sexo final por diagnóstico etiológico de 193 casos consecutivos de DDS com idade abaixo de 6 meses com ambiguidade genital atendidos no GIEDDS - UNICAMP entre janeiro de 1989 e dezembro de 2011.	60
Tabela 8: Idade (em meses) à primeira consulta de 408 casos consecutivos de distúrbios da diferenciação do sexo (DDS) com ambiguidade genital atendidos no GIEDDS - UNICAMP entre janeiro de 1989 e dezembro de 2011.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ATRX</i>	<i>Alpha Thalassemia, mental Retardation syndrome, X-linked</i>
<i>BMP15</i>	<i>Bone Morphogenetic Protein 15</i>
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
CBX2	<i>Chromobox Homolog 2</i>
<i>DAX1</i>	<i>DSS adrenal hypoplasia critical region on X, gene 1</i>
DDS	Distúrbio da Diferenciação do Sexo
DHEA	Desidroepiandrosterona
<i>DHH</i>	<i>Desert Hedgehog</i>
DHT	Dihidrotestosterona
<i>DMRT</i>	<i>Doublesex and MAB3 Related Transcription</i>
<i>DSS</i>	<i>Dosage Sensitive Sex reversal</i>
EMS	<i>External Masculinization Score</i>
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
<i>FGF9</i>	<i>fibroblast growth factor 9</i>
<i>FIGLA</i>	<i>Factor In the Germline Alfa</i>
<i>FOG2</i>	<i>Friend of Gata family 2</i>
<i>FOXL2</i>	<i>FOXL2 Forkhead transcription factor 2</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
<i>FST</i>	<i>Follistatin</i>
<i>GATA4</i>	<i>GATA-binding protein 4</i>
<i>GDF9</i>	<i>Growth Differentiation Factor 9</i>
GIEDDS	Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e

	Diferenciação do Sexo
HAC	Hiperplasia Adrenal Congênita
HAM	Hormônio Anti-Mulleriano
HC	Hospital das Clínicas
hCG	gonadotrofina coriônica humana
<i>HOXA</i>	<i>HOmeoboX A10</i>
HV	Hermafroditismo verdadeiro
INSL3	peptídeo semelhante à insulina
LH	hormônio luteinizante
<i>NOBOX</i>	<i>Newborn Ovary homeoBOX-encoding</i>
<i>NR0B1</i>	<i>Nuclear Receptor subfamily 0, group B, member 1</i>
<i>NR5A1</i>	<i>Nuclear Receptor subfamily 5</i>
PHF	pseudo-hermafroditismo feminino
PHM	pseudo-hermafroditismo masculino
<i>Ptch1</i>	<i>Ptch1</i>
<i>RSPO1</i>	<i>R-Spondin Family, member 1</i>
<i>SF1</i>	<i>Steroidogenic Factor 1</i>
<i>SNF</i>	<i>Sucrose NonFermenting</i>
<i>SOX9</i>	<i>SRY-related HMG-Box gene 9</i>
<i>SRY</i>	<i>sex-determining region on the Y chromosome</i>
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
<i>WNT4</i>	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 4</i>
<i>WT1</i>	<i>Wilm's tumor 1</i>

JUSTIFICATIVA

Em 1998 foi criado o Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo (GIEDDS) no Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Essa iniciativa partiu de profissionais médicos, nas áreas de pediatria, genética médica, endocrinologia e cirurgia pediátrica, interessados em centralizar as atividades de assistência e de pesquisa dos Distúrbios da Diferenciação do Sexo (DDS) (1).

Seus objetivos foram os de agilizar o atendimento de pacientes nascidos e/ou encaminhados ao HC-UNICAMP, padronizar condutas gerais e específicas para as diversas doenças da área, dar orientação médica e psicológica, bem como assessoria médica e legal aos pacientes e respectivas famílias, oferecer treinamento profissionalizante aos residentes, estagiários e pós-graduandos, criar e manter arquivo nosológico e de atualização científica, desenvolver pesquisas na área e aprimorar os cursos de graduação e residência médica nas diversas áreas. Para tanto, aos profissionais que tomaram a iniciativa de sua criação aliaram-se outros das áreas de psicologia, serviço social, radiologia, anatomia patológica, medicina legal, e recentemente, pesquisadores da área de biologia molecular. Hoje o serviço é um dos responsáveis pelo atendimento de uma região com mais de seis milhões de habitantes (1).

O trabalho conjunto realizado nestes 27 anos resultou direta ou indiretamente na formação de muitos profissionais médicos (pediatras, endocrinologistas pediátricos, endocrinologistas, geneticistas e cirurgiões) na área, além da orientação de alunos de mestrado ou doutorado, assim como alunos de iniciação científica. Pode-se considerar hoje, que os objetivos do GIEDDS vêm sendo cumpridos integralmente, aliando a assistência ao ensino e à pesquisa, e fazendo com que esses últimos revertam constantemente em benefício da primeira (1).

Desde sua criação o GIEDDS – UNICAMP contou com uma mesma equipe (pediatra, endocrinologista, geneticista e psicólogo) no atendimento e identificação da etiologia dos casos de DDS com e sem ambiguidade genital. A

investigação laboratorial, tanto hormonal como citogenética, molecular, de imagem e anatomopatológica sempre foram realizadas em serviços do HC e da UNICAMP.

Portanto, a partir desta uniforme experiência e ampla casuística, verificamos a frequência dos diagnósticos etiológicos de DDS com ambiguidade genital, a idade de avaliação e definição do sexo de criação.

OBJETIVOS

1. Descrever a frequência de cada uma das causas de DDS com ambiguidade genital.
2. Verificar a idade de encaminhamento dos casos de DDS com ambiguidade.
3. Verificar a definição do sexo social antes e após a avaliação dos casos de DDS com ambiguidade genital em crianças abaixo de um ano de idade.

REVISÃO DE LITERATURA

No Consenso de Chicago de 2006 foi proposto o termo DDS para englobar toda doença congênita na qual a constituição cromossômica, gonadal, sexual ou anatômica fosse atípica (2). Os DDS podem se manifestar com ambiguidade genital logo ao nascimento, no adolescente com puberdade ausente, incompleta ou atípica, no adulto jovem com falência gonadal precoce, ou ainda com infertilidade (2).

1. Determinação e Diferenciação Sexual Normais

Para que sejam compreendidos os distúrbios que levam às alterações genitais é necessário conhecer a diferenciação sexual normal (3). Entende-se como determinação sexual os processos moleculares que levam as gônadas indiferenciadas a seguirem o caminho testicular ou ovariano e a diferenciação sexual como as ações hormonais específicas que determinam o fenótipo sexual a cada indivíduo (3). O desenvolvimento normal da genitália interna e externa requer tempo preciso de determinação gonadal e exposição a concentrações adequadas de hormônios específicos durante períodos críticos do desenvolvimento sexual (3).

Qualquer alteração genética ou ambiental que cause atraso na diferenciação testicular ou interrupção da síntese de hormônios específicos, como a testosterona, dihidrotestosterona (DHT) e hormônio anti-mulleriano (HAM), pode comprometer o processo de desenvolvimento (3).

A complexidade da diferenciação sexual e a necessidade de ambas as vias hormonais e morfológica do desenvolvimento serem normais e corretamente integradas, explica o aparecimento de anomalias genitais em recém-nascidos que apresentam outras malformações, já que os mesmos genes podem possuir outros papéis na embriogênese, além do desenvolvimento genital (4).

2. Determinação Sexual (Figura 1)

O desenvolvimento sexual é um processo complexo, envolvendo um grande número de genes que atuam em rede. Durante o desenvolvimento

gonadal, fatores de transcrição podem funcionar diretamente ou serem efetores de vias de transdução e interagir como agonistas ou antagonistas (5,6).

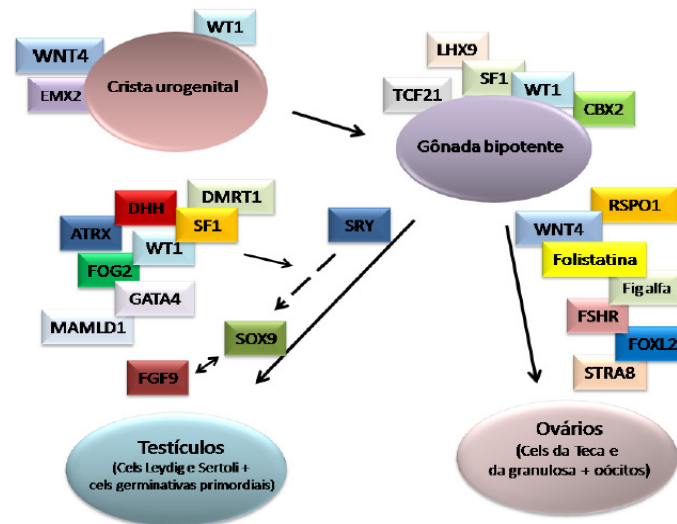


Figura 1: Genes participantes da determinação gonadal [modificado de Eggers & Sinclair, 2012 (6)].

Na maioria dos mamíferos, o sexo genético é determinado pela constituição cromossômica, sendo machos XY e fêmeas XX (4-6).

O papel do cromossomo Y como determinante da masculinidade é conhecido desde 1950, com o estudo do cariótipo humano. Dois genes participam diretamente na transformação das gônadas bipotenciais em testículos, em embriões do sexo masculino, o *SRY* (*Sex determining Region on Y*, localizado em Yp11.3) e o *SOX9* (*SRY-related HMG-Box gene 9*, localizado em 17q24.3). O *SRY* é conservado apenas em mamíferos, enquanto o *SOX9* pode atuar como um gene fundamental na diferenciação testicular em todos os vertebrados. Ambos são fatores de transcrição que se expressam no testículo, mas não no ovário e são especificamente expressos nas células pré-Sertoli no desenvolvimento das gônadas XY (5-7).

Na cascata de eventos da determinação sexual, o gene *WT1* (*Wilms Tumor suppressor locus gene 1*, localizado em 11p13) é essencial para o

desenvolvimento gonadal e renal em mamíferos. O gene *WT1* espessa-se nas saliências das gônadas bipotenciais antes de sua diferenciação, sendo primariamente expresso em tecidos de origem mesodérmica, incluindo seio urogenital e mesonefros. Seus RNAs mensageiros são detectáveis a partir da sexta semana de gestação em embriões humanos. Após a diferenciação testicular, o *WT1* continua sendo transcrito nas células de Sertoli do testículo fetal, juntamente com o gene *AMH* (*Anti-Mullerian Hormone*, localizado em 19p13.3). No ovário fetal, ele se expressa nas células epiteliais e na camada de células da granulosa, no rim fetal, no mesênquima, na vesícula renal e nos podócitos em desenvolvimento. O gene *WT1* atua antes do *SRY* e de genes determinantes de ovários. O *WT1* ativa o promotor do gene *SRY* humano, mas essa ativação é limitada à forma de *splicing* alternativo *WT1(-KTS)*. Nos experimentos em camundongos, a deleção do *WT1(-KTS)* está associada à apoptose celular, ao passo que a redução da expressão do *SRY* foi observada quando a variante *WT1(+KTS)* estava deletada (5-7).

Estudos *in vitro* mostraram que ambas as variantes podem interagir com o *GATA4* (*GATA-binding protein 4*, localizado em 8p23.1) e ativar sinergicamente o promotor do *SRY* em roedores, suínos e humanos. Além da interação entre *GATA4* e *WT1* para controlar a expressão do *SRY*, outros fatores devem participar desse mecanismo de expressão espaço-temporal do *SRY*, como *SOX9*, *NR5A1* (*Nuclear Receptor subfamily 5, group A, member 1*, localizado em 9q33.3) e *FOG2* (*Friend Of Gata, family 2*, localizado em 8p23.1) (6).

Dentro da região 9p24 estão localizados os genes *DMRT 1 e 2* (*Doublesex and MAB3 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 desenvolvimento testicular no cromossomo 9 com base no seu padrão de expressão embrionária e localização cromossômica (5,6).

Outro gene a ser destacado é o *NR5A1* que expressa a proteína SF1 (*Steroidogenic Factor 1*), principal reguladora das enzimas envolvidas na esteroidogênese adrenal e gonadal e que se expressa nas gônadas

indiferenciadas. Além de expressar na gônada indiferenciada em ambos os sexos, também regula a síntese de HAM e testosterona (5-7).

Dentro da região DSS (*Dosage Sensitive Sex reversal*, localizado em Xp21) foi descrito o gene *NR0B1* (*Nuclear Receptor subfamily 0, group B, member 1* – anteriormente denominado *DAX1 = DSS adrenal hypoplasia critical region on X, gene 1*), que se expressa nas glândulas adrenais e nos testículos e ovários em desenvolvimento, mas sua expressão é suprimida nos testículos e mantida nos ovários. Em camundongos, o *Nr0b1* é expresso durante o desenvolvimento hipotalâmico, adrenal e gonadal. Indivíduos com a duplicação neste gene apresentam disgenesia gonadal 46,XY e por este fato, tal gene foi chamado de anti-testículos (5-7).

Ainda, entre os genes envolvidos na determinação gonadal encontra-se o *CBX2* (*Chromobox Homolog 2*, localizado em 17q25.3), homólogo ao gene *m33* de camundongos. A ausência deste gene em camundongos está associada à alteração de desenvolvimento da crista genital em embriões XX e XY (6,8).

O gene *DHH* (*Desert Hedgehog*, localizado em 12q12) é expresso nas células de Schwann, endotélio vascular, endocárdio e epitélio dos túbulos seminíferos do embrião de camundongos. No testículo fetal de camundongos, a expressão do *Dhh* é iniciada em 11,5 dias após a concepção, em precursores das células de Sertoli, pouco após o início da expressão do *Sry*. Em contrapartida nenhuma expressão é encontrada em ovários fetais. Em humanos, mutação em homozigose no *DHH* está associada à disgenesia gonadal parcial ou completa XY. *DHH* é a única proteína *hedgehog* expressa no desenvolvimento das células de Sertoli. O receptor *hedgehog*, *patched 1* (*Ptch1*), é expresso em células intersticiais. Camundongos *Dhh*^{-/-} apresentam redução na expressão do *Ptch1*. É sugerido que *Dhh/Ptch1* seja o gatilho de sinalização para a diferenciação das células de Leydig e favoreça a expressão do *Nr5a1* e *Cyp11a1* em precursores de células intersticiais. A diferenciação das células mióides peritubulares e consequente formação dos cordões testiculares, também dependem da expressão do *Dhh* em camundongos (3,8,9).

O gene *ATRX* (*Alpha Thalassemia, mental Retardation syndrome, X-linked*, localizado em Xq21.1) é um membro do subgrupo da superfamília *SNF-2-like* (*Sucrose Non Fermenting*) que contém genes envolvidos na recombinação, reparo e regulação da transcrição do DNA. O *ATRX* promove a ligação entre o remodelamento de cromatina, a metilação do DNA e a expressão dos genes envolvidos no processo de desenvolvimento. Mutações no gene *ATRX* causa alfa-talassemia, grave atraso neuropsicomotor, microcefalia, baixa estatura e anormalidades cardíaca, esquelética e urogenital. O papel preciso do *ATRX* no desenvolvimento gonadal de mamíferos não parece claro. Em camundongos, a ausência do *Atrx* em células de Sertoli é responsável pelo desenvolvimento de testículos pequenos, devido à apoptose de proliferação de células de Sertoli durante a vida fetal (6-8).

A gonadogênese feminina depende não apenas da ausência da expressão do gene *SRY*, mas também da expressão de genes específicos, entre eles o *NR0B1*, que codifica uma proteína que contém repetições de um trecho de 65 a 67 aminoácidos, rico em resíduos de glicina e alanina. Acredita-se que essa proteína poderia atuar como um repressor da transcrição de genes da cascata de diferenciação masculina, por interferir na função dos produtos dos genes *NR5A1*, *WT1* e em especial, o *SOX9*, sendo esse efeito sensível à dose. Já no sexo masculino, parece ocorrer um predomínio de dose do *SOX9* em relação ao *NR0B1* (6,8,9).

Outro gene, o *WNT4* (*Wingless-type MMTV integration site family, member 4*, localizado em 1p36.1) é essencial como sinalizador não somente para a nefrogênese no rim metanéfrico, como também se expressa no mesonefro, participando da formação da gônada e dos dutos de Muller. O sinal é necessário nos dois sexos para a formação desses dutos. Nos camundongos, o *Wnt4* ativa a expressão de *Nr0b1* nas células de Sertoli e Leydig, o qual por sua vez é um antagonista do gene *Sry*, ou seja o *Wnt4* provoca a supressão do desenvolvimento de células de Leydig no ovário e a manutenção de células germinativas (7,8).

Estudos em camundongos mostraram que outro gene desta mesma família, o *Wnt7*, parece ser importante na diferenciação sexual feminina, por estar

relacionado à manutenção dos dutos de Muller. Propõe-se que o *Wnt4* e o *Fgf9* (*fibroblast growth factor 9*) atuem como sinais antagonistas na regulação da determinação sexual em camundongos. O *FGF9* é um dos fatores de crescimento envolvido durante processo de proliferação celular, migração e diferenciação durante o desenvolvimento embriológico. Em camundongos, na ausência do *Fgf9*, a expressão do *Sox9* não é mantida, a diferenciação das células de Sertoli não ocorre, o desenvolvimento testicular entra em falência e são expressos genes que contribuem para o desenvolvimento ovariano. Ainda na mesma região cromossômica do gene *WNT4* foi identificado outro gene associado à reversão sexual, o *RSPO1* (*R-Spondin Family, member 1*, localizado em 1p34.3), que, quando portador de uma mutação deletéria, causa a diferenciação testicular em indivíduos XX, provavelmente por perda de interação com o gene *WNT4* (6,8,9).

O gene *FOXL2* (*Forkhead transcription factor 2*, localizado em 3q22.32), outro gene associado à repressão da via de diferenciação masculina, é expresso exclusivamente nos ovários a partir de 12,5 dias pós concepção. A expressão do *FOXL2*, juntamente com a betacatenina, durante o estágio embrionário é requerida para manutenção da repressão do *SOX9* gerando o desenvolvimento ovariano normal. Para estabilizar a betacatenina, é necessária uma interação entre *WNT4* e *RSPO1*, indicando que o gene betacatenina é um importante determinador ovariano (6-8).

Enquanto o desenvolvimento testicular ocorre na ausência de células germinativas, o desenvolvimento ovariano depende destas para ser iniciado. No desenvolvimento ovariano, os genes *WNT4* e *FST* (*Follistatin*, localizado em 5q11.2) mantêm a viabilidade do ovócito, uma vez que as células germinativas tenham alcançado como destino final as gônadas. Além do *WNT4*, dois fatores de transcrição oócito-específicos desempenham importante papel na sobrevivência do oócito, o *FIGLA* ou *FIG-alfa* (*Factor In the Germline Alfa*, localizado em 2p13.3) e o *NOBOX* (*Newborn Ovary homeoBOX-encoding gene*, localizado em 7q35). A ausência desses genes resulta na morte do ovócito e na não formação dos folículos primordiais subsequentes. Depois da ativação de *FIGLA* nos oócitos, outro fator de transcrição, o *FOXL2*, regula a diferenciação das células granulosas

somáticas para foliculogênese. Além desses, o *BMP15* (*Bone Morphogenetic Protein 15*, localizado em Xp11.22) e o *GDF9* (*Growth Differentiation Factor 9*, localizado em 5q31.1) são cruciais para a fisiologia do folículo ovariano (6,8,9).

Para a manutenção ovariana é necessária a presença de dois cromossomos X íntegros, para que os folículos ovarianos não se degenerem e a gônada não se torne constituída de tecido conjuntivo, sem elementos de linhagem germinativa (gônada disgenética). O cromossomo X tem várias regiões necessárias para a manutenção ovariana, nas quais as mais importantes são a Xp11 e a Xq13, além das Xp21 e Xq25-qter (9,10).

Embora muitos acontecimentos genéticos, celulares e morfológicos no início do desenvolvimento gonadal tenham sido caracterizados, alguns dos mecanismos moleculares envolvidos na determinação do sexo humano ainda são mal compreendidos. Alguns motivos citados para que isso aconteça são o fato de não existirem modelos celulares adequados de determinação do sexo, nenhuma linha celular foi estabelecida com todas as propriedades de células de Sertoli e estas primariamente imaturas ou maduras, perdem suas características durante cultura prolongada. Casos familiares com distúrbios na determinação do sexo em mulheres XY ou homens XX são muito raros, dificultando estudos genéticos clássicos para identificar os genes envolvidos no processo (9-11).

3. Determinação Gonadal e Diferenciação dos Genitais Internos

Até cerca de seis semanas após a fertilização, o embrião humano é um organismo bissexual, equipado com primórdios gonadais e genitais idênticos nos dois sexos. Não é possível fazer a distinção macro ou microscópica entre embriões, com predestinação masculina ou feminina. Até essa época, o que existe são rudimentos gonadais (gônadas bipotenciais ou indiferenciadas), primórdios dos condutos genitais internos masculinos e femininos (representados por dois sistemas de canais bilaterais, os dutos de Wolff ou mesonefros e os dutos de Muller ou paramesonefros, respectivamente) e rudimentos genitais externos (3,12,13).

O estado sexualmente neutro ou indiferenciado inicia-se na quarta semana após a fertilização, durante o dobramento lateral do corpo do embrião, com o surgimento de duas projeções do mesênquima à direita e à esquerda da aorta dorsal, são as cristas urogenitais. Na quinta semana, ocorre nestas cristas, o espessamento de mesênquima originando as saliências gonadais posicionadas ventromediais às saliências mesonéfricas. Esse processo é induzido pela migração, para as regiões das saliências gonadais, das células germinativas primordiais, que se originam entre o endoderma que reveste a parede do saco vitelino, próximo ao alantóide (3,12,13).

Em torno da sexta semana, as células do epitélio celômico invadem o mesênquima formando agregados celulares, os cordões sexuais primários, que cercam as células germinativas e distribuem-se em uma região cortical e outra medular (3,12,13).

Os dutos de Wolff ou dutos mesonéfricos, primórdios da genitália interna masculina, são originalmente dutos de excreção dos rins medianos (mesonefros), sendo incorporados ao sistema genital quando a função renal passa a ser realizada pelos metanefros (rins definitivos). Estes desembocam inicialmente na cloaca após a divisão desta pelo septo urorretal. O local de abertura dos dutos de Wolff passa a ser denominado seio urogenital. Os dutos de Muller ou dutos paramesonéfricos surgem de cada lado entre a saliência gonadal e o mesonefro por meio de invaginações do epitélio celômico. Suas extremidades cranianas, em forma de funil, abrem-se na cavidade peritoneal, correm então paralelamente aos dutos de Wolff no sentido caudal e cruzam-no ventralmente para fundir-se na linha média, formando um canal uterovaginal em forma de Y. Esse canal penetra na parede do seio urogenital, formando uma saliência no interior dessa cavidade (tubérculo mulleriano) (3,12,13).

Em presença do *SRY* e outros genes envolvidos na formação testicular, os cordões sexuais primitivos continuam seu desenvolvimento em direção à medula da gônada, formando os cordões testiculares que no seu trajeto envolvem algumas células germinativas as quais serão convertidas em células de Sertoli. Tais células agrupam-se formando cordões que englobam as células germinativas

primordiais, tornando-se, assim, espermatogônias. Estes cordões testiculares desenvolvem-se para formar túbulos seminíferos, túbulos retos e rede testis. A túnica albugínea surge sob o epitélio como uma espessa cápsula fibrosa (3,12-14).

Por volta de sete semanas e meia, as células de Sertoli passam a secretar o HAM, uma glicoproteína de alto peso molecular que induz por ação parácrina a regressão dos dutos de Muller. As células intersticiais (de Leydig) secretam testosterona a partir da oitava ou nona semana, atingindo altas concentrações nas células dos dutos de Wolff e por ação parácrina promovem sua diferenciação para epidídimo, dutos deferentes, vesículas seminais e dutos ejaculatórios. A próstata surge por volta da 10^a semana, a partir de evaginações endodérmicas do seio urogenital, na altura do tubérculo mulleriano e sua maturação é acompanhada pelo desenvolvimento do utrículo prostático (3,12-15).

No sexo feminino, na ausência do *SRY*, na presença de dois cromossomos XX e de genes envolvidos na formação ovariana, as gônadas permanecem no estágio indiferenciado até o final da 10^a semana, quando se inicia a diferenciação ovariana, portanto cerca de duas a três semanas mais tardia que a testicular. Em seguida, formam-se os cordões sexuais secundários ou corticais e ainda há uma diferenciação das células mesenquimatosas em células foliculares, que envolvem as células germinativas primordiais, as quais se tornarão as ovogônias. Por volta da 16^a semana são observados folículos primordiais, que consistem em uma ovogônia envolta por uma camada de células epiteliais achatadas. A formação máxima de folículos primordiais ocorre entre a 20^a e 25^a semanas de gestação o que coincide com o pico de produção de hormônio folículo estimulante (FSH) fetal. As células epiteliais circundantes darão origem às células foliculares (3,12,13).

No sexo feminino, o ovário é capaz de produzir estradiol desde a nona semana, ou seja, ao mesmo tempo em que o testículo começa a produzir testosterona. Nessa fase as células da granulosa não estão totalmente formadas e o estradiol parece ser produzido por células intersticiais. Não há receptores de gonadotrofinas entre oito e 16 semanas do desenvolvimento e o ovário fetal torna-

se sensível às gonadotrofinas entre 16 e 20 semanas do desenvolvimento, o que é importante para o posterior desenvolvimento e manutenção do folículo ovariano. As ovogônias multiplicam-se exponencialmente e chegam a sete milhões em torno de 20 semanas de gestação, dando origem aos ovócitos primários. Esses, ao se encontrarem rodeados por uma camada de células foliculares cúbicas, passam a ser denominados folículos primários envolvidos por um estroma derivado do mesênquima. A meiose inicia-se a partir da 11ª semana e é interrompida no estágio de diplóteno na prófase da primeira divisão meiótica. Entre a vida fetal e a vida adulta há um processo de degeneração acentuada dos folículos, de modo que 99% deles sofrem atresia, que se supõe seja decorrente de apoptose. Para a manutenção ovariana é necessária a presença de dois cromossomos X íntegros e vários outros genes; caso contrário, há uma aceleração do processo de degeneração dos folículos ovarianos e a gônada torna-se disgenética, ou seja, constituída somente de tecido conjuntivo, sem elementos da linhagem germinativa (3,12,13).

No sexo feminino, como não há a produção de HAM, os dutos de Muller desenvolvem-se nas trompas, no útero e no terço superior da vagina. Com 18 semanas completa-se o desenvolvimento da cavidade vaginal, individualizando-se em relação ao útero. O colo ocupa dois terços do útero fetal. O endométrio em formação caracteriza-se por adquirir um epitélio colunar no qual as glândulas e as células vacuoladas aparecem à medida que a gestação avança. As trompas desenvolvem fímbrias e as pregas na região ampular, as quais se abrem na cavidade peritoneal adquirindo cílios e capacidade secretora no epitélio colunar. A não produção de andrógenos determina, por sua vez, a fragmentação dos dutos de Wolff que persistem como vestígios embrionários (epoóforo, paraóforo, dutos de Gartner) (3,12,13).

4. Diferenciação dos Genitais Externos

Os rudimentos genitais externos compreendem um tubérculo genital que se desenvolve no início da quarta semana, logo seguido de saliências labioescrotais e pregas urogenitais as quais ladeiam a membrana cloacal. Ao final

da sexta semana, essa membrana é dividida pelo septo urorretal, surgindo a membrana urogenital que logo se rompe para formar a abertura do seio urogenital. O tubérculo genital alonga-se e é denominado falo. Um sulco coronário delimita sua haste do primórdio da glândula do futuro pênis ou clitóris e um sulco uretral, revestido por endoderme surge na superfície ventral do falo e é contínuo com a abertura do seio urogenital (3,12,13).

A genitália externa desenvolve-se para o padrão masculino graças à ação sistêmica da testosterona, convertida em DHT pela enzima 5 α -redutase tipo 2, cujo gene *SRD5A2* está localizado no cromossomo 2p23. O período crítico de atuação é entre nove e 12 semanas de vida intrauterina. Até a 14^a semana de vida intrauterina, o tamanho do pênis é igual ao do clitóris iniciando-se, a partir dessa época, um crescimento acelerado do pênis que leva consigo as pregas genitais, formando um sulco profundo na base do qual prolifera a lâmina uretral. O orifício uretral externo desloca-se progressivamente em direção à glândula, onde uma invaginação ectodérmica dá origem a um novo sulco, contínuo ao sulco uretral do pênis. O fechamento desse sulco dará origem à porção peniana da uretra, o que ocorre até o final do terceiro mês de gestação. Nessa época, inicia-se a formação do prepúcio a partir de outra invaginação do ectoderma, envolvendo quase por completo a glândula em torno da 14^a semana. A partir do epitélio da glândula ocorre uma invaginação em forma de tubo maciço em direção à uretra peniana. Até o final do 4^o mês esse tubo se canaliza e toda a uretra, peniana e balânica, estará formada (3,11-13).

A migração dos testículos da cavidade pélvica para a bolsa escrotal inicia-se por volta da 28^a semana, completando-se, em geral, em torno da 32^a semana. A gonadotrofina coriônica humana (hCG), produzida pelo sincitiotrofoblasto, estimula a secreção de testosterona pelas células de Leydig durante o período crítico da diferenciação sexual masculina, ou seja, nas primeiras 12 a 14 semanas de gestação. As células de Leydig são capazes de produzir andrógenos e o peptídeo semelhante à insulina (INSL3), envolvidos no desenvolvimento sexual fetal masculino. O fator INSL3, conhecido como fator semelhante à relaxina, é uma proteína da superfamília dos hormônios

insulina/relaxina, secretado pelas células de Leydig desde a vida fetal. Tal como os andrógenos, sua produção aumenta no período imediato após o nascimento (entre 30 e 100 dias de vida), depois diminui na infância e volta a aumentar na puberdade. Sua síntese é estimulada pelo hCG e pelo hormônio luteinizante (LH). O INSL3 e seu receptor também participam, como a testosterona, em humanos na descida testicular durante a embriogênese (3,11-14).

A gônada masculina desce desde sua origem abdominal pararenal até localizar-se no escroto em mais de 95% dos recém-nascidos. Desse modo, o testículo permanece em um meio cuja temperatura é dois a três graus abaixo da temperatura do resto do corpo, adequada para a espermatogênese. A descida testicular se produz em duas fases: transabdominal e inguinoescrotal. O ligamento gubernáculo estende-se entre o pólo caudal do testículo e o local do ducto inguinal, onde se funde com a superfície interna da saliência labioescrotal. Na fase transabdominal, o gubernáculo é mais grosso, mas não aumenta no comprimento, sustentando firmemente e tracionando a gônada para a região inguinal na 12^a semana. Com o crescimento do feto, produz-se uma descida relativa do testículo. O desenvolvimento do gubernáculo independe da ação da testosterona, depende de fatores como HOXA 10 (*HOMeoboX A10*) e INSL3. Por outro lado, o ligamento suspensório cranial desaparece por ação da testosterona. No sexo feminino, o gubernáculo se mantém comprido e fino, formando o ligamento ovariano na sua parte cranial e o ligamento redondo na sua parte caudal (3,11-14,16).

A fase inguinoescrotal inicia-se na 25^a semana e se completa próximo do nascimento. O gubernáculo fixa-se no escroto ao redor da 35^a semana, sendo acompanhado de um divertículo peritoneal. Esse pequeno saco persiste formará a túnica vaginal. Esta fase é dependente de testosterona que atua diretamente, mas também indiretamente através de um mecanismo neuroendócrino que envolve o nervo genitofemoral. Este nervo libera, por estímulo androgênico, o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGPR). Também o aumento da pressão intra-abdominal, devido ao fechamento da parede abdominal anterior, intervém na fase inguinoescrotal, o que explica a presença de criptorquidia em pacientes com defeitos da parede abdominal (3,11-14,16).

As gonadotrofinas hipofisárias do próprio feto, em especial o LH, são essenciais para a continuidade do crescimento e desenvolvimento das células de Leydig após esse período crítico inicial e, portanto, para a completa descida testicular e crescimento peniano. Após a primeira metade da gestação quando os níveis de hCG diminuem, o LH fetal é o responsável por manter o estímulo nas células de Leydig. A falta de LH nos fetos masculinos não causa grave ambiguidade genital no recém-nascido, já que os passos mais importantes da diferenciação sexual têm lugar quando a função das células de Leydig são controladas pelo hCG. A falta de produção de testosterona no terceiro trimestre pode originar criptorquidia e micropênis no recém-nascido, pois os andrógenos são responsáveis pelo crescimento peniano e pela descida testicular nesse período. Tanto o LH como o hCG transmitem o sinal através de um receptor comum, com sete domínios transmembrana associados à proteína G presente nas células de Leydig. O gene que codifica esse receptor está localizado no cromossomo 2p21 e contém 11 éxons (11).

Na diferenciação da genitália externa feminina, a porção superior da vagina origina-se nos extremos distais dos dutos de Muller (como já citado), ao passo que a parte inferior deriva dos bulbos sinovaginais, oriundos do seio urogenital. A parte superior da vagina é sensível ao HAM, ao passo que a parte inferior é sensível à ação dos andrógenos. Na 15^a semana, as estruturas mencionadas formam a placa vaginal que, por volta da 22^a semana, canaliza-se para dar origem à luz da vagina. A zona de contato da placa vaginal com o seio urogenital se mantém maciça por mais tempo. Esta zona desce progressivamente até localizar-se na posição superficial perineal e abre-se na região mais superficial do seio urogenital. Essa região superficial do seio urogenital cresce no sentido anteroposterior e forma o vestíbulo da vagina. Uma vez formado o vestíbulo, a porção profunda do seio urogenital se afina relativamente e se transforma na uretra. Dessa maneira, no vestíbulo da vagina desembocam separadamente a uretra, na base do tubérculo genital (futuro clitóris) e a vagina. A zona de contato entre a lâmina vaginal e o seio urogenital canaliza-se na 22^a semana; o vestíbulo comunica-se, então, com o resto da vagina. Restos dessa região de contato

formam a membrana do hímen, que fecha parcialmente a comunicação. Em síntese, o tubérculo genital desenvolve-se pouco e formará o clitóris, as pregas genitais darão origem aos pequenos lábios, as saliências labioescrotais formarão os grandes lábios e o seio urogenital dará origem à uretra feminina e aos dois terços inferiores da vagina (3,12,13).

5. Definição de Ambiguidade Genital e Critérios de Avaliação

Na maioria dos nascimentos, o diagnóstico do sexo é realizado de maneira correta e sem qualquer dificuldade, verificando-se apenas as características da genitália externa. Entretanto, em situações de anormalidade dos genitais externos, o diagnóstico correto do sexo somente pode ser alcançado se forem levados em conta outros dados (2,17-19).

Na realidade, o diagnóstico correto do sexo depende da concordância da aparência dos genitais externos (sexo genital externo) com os genitais internos (sexo genital interno) e com as gônadas (sexo gonadal). Além disso, é importante que pacientes com testículos, genitais internos e externos masculinos apresentem o cariótipo 46,XY, do mesmo modo que aqueles com ovários, genitais internos e externos femininos tenham o cariótipo 46,XX (sexo cromossômico). Não se pode deixar de levar em consideração a diferenciação hormonal (sexo endocrinológico), pois ela tem papel básico tanto durante a puberdade, quando os indivíduos desenvolvem caracteres sexuais secundários e capacidade reprodutiva, quanto durante o desenvolvimento fetal. A concordância entre os sexos cromossômico, gonadal, genital interno, genital externo e endocrinológico pode ficar prejudicada se não houver identificação psicológica dos indivíduos com os sexos em que são classificados (sexo psicológico), além do que, deve-se levar em conta a aceitação social desses indivíduos em um ou outro sexo (sexo social) (2,8).

Diante de um paciente com um DDS, principalmente as crianças com ambiguidade genital, quase sempre não ocorre a concordância de todas estas avaliações e a definição do sexo de criação vai se basear principalmente na identificação do diagnóstico etiológico que deve ser o mais preciso possível. Esse diagnóstico permitirá a correta definição do sexo, a definição quanto à época e ao

tipo de correção cirúrgica reconstrutiva da genitália externa, a previsão quanto ao desenvolvimento de caracteres sexuais secundários espontâneos, a necessidade de terapia hormonal de reposição, a estimativa do risco de malignização gonadal e da época adequada para a realização da gonadectomia (se necessária), e, ainda, quanto à possibilidade de fertilidade futura. Do diagnóstico etiológico depende, ainda, o aconselhamento genético da família, e também do próprio indivíduo, nos casos em que a fertilidade está preservada (2).

Nos casos de crianças com ambiguidade genital, é fundamental que o diagnóstico correto seja realizado antes que elas apresentem uma identidade sexual social e, principalmente, psicológica. Portanto, o ideal é a identificação desses casos ainda no período neonatal, devendo-se iniciar nessa época uma pronta investigação. Essa avaliação deverá ser a mais ágil e rápida possível, evitando algumas possíveis situações de risco de vida para o paciente, como no caso da hiperplasia adrenal congênita (HAC) forma perdedora de sal, e minimizando os problemas psicológicos e sociais da família em relação à incerteza quanto ao sexo do seu filho (2).

Alterações em qualquer fase do desenvolvimento embriológico podem culminar com ambiguidade genital de variados graus (2,7,8,17).

Danish, em 1982, descreveu critérios para definição de ambiguidade genital. Numa genitália de aspecto masculino: gônadas não palpáveis, tamanho peniano esticado abaixo de -2,5 DP da média de tamanho peniano normal para a idade, gônadas pequenas (maior diâmetro inferior a 8mm), presença de massa inguinal que poderá corresponder a útero e trompas rudimentares, ou hipospádia. Numa genitália de aspecto feminino: diâmetro clitoriano superior a 6mm, gônada palpável em região inguinal ou labioescrotal, fusão labial posterior, massa inguinal que possa corresponder a testículos (17).

O Consenso de Chicago, em 2006 (2), semelhante a Danish (17), definiu alguns critérios que sugerem DDS, como evidente ambiguidade genital; ou numa genitália de aparente aspecto masculino, a presença de micropênis, de criptorquidia bilateral, de hipospádia grave ou de hipospádia peniana associada à criptorquidia unilateral; ou numa genitália de aspecto feminino, a presença de

clitoromegalia, fusão labial posterior ou massa inguinal; ou história familiar de DDS; ou ainda a discordância entre o fenótipo do recém-nascido e o genótipo pré-natal (2).

A classificação da gravidade da ambiguidade genital foi inicialmente sugerida por Prader (18), em 1954, que elaborou uma classificação para HAC, que até os dias atuais é muito utilizada e aplicada para outros casos de ambiguidade genital. Ele classificou as genitálias externas dos pacientes com HAC de acordo com o grau de virilização: do mais leve (Prader 1) até o mais virilizado (Prader 5). Prader 1 – aumento isolado do clitóris; Prader 2 – aumento do clitóris associado a um intróito vaginal em forma de funil, podendo visualizar-se aberturas uretral e vaginal distintas; Prader 3 - aumento de clitóris associado a um intróito profundo, em forma de funil, com a uretra esvaziando-se na vagina, como um seio urogenital; Prader 4 – clitóris com aspecto peniano com abertura urogenital em forma de fenda na base do falo; Prader 5 - fusão labioescrotal completa e uretra peniana (Figura 2).

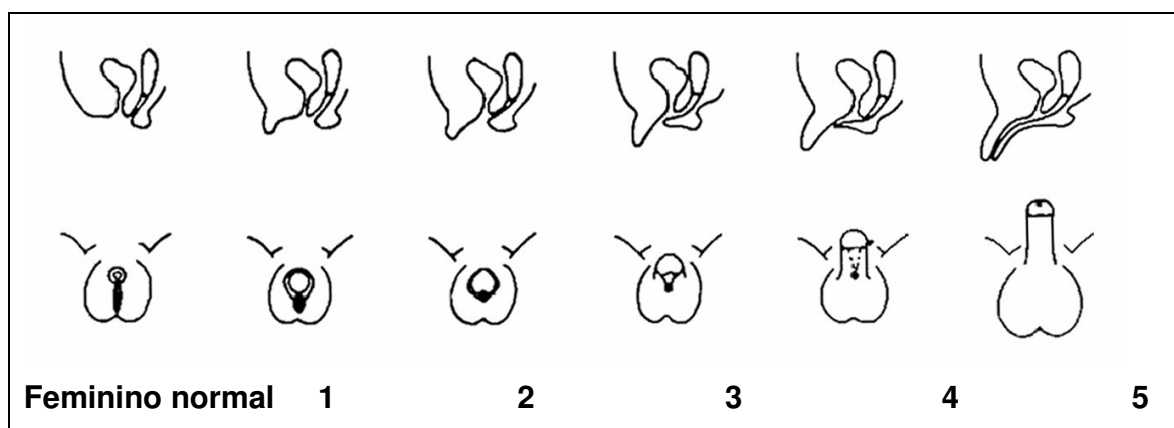


Figura 2: Classificação de Prader [adaptado de Prader, 1954 (18)].

Em 1995, Quigley e cols. sugeriram uma classificação clínica para pacientes com Insensibilidade Androgênica de acordo com o aspecto da genitália externa: grau 1 – masculina normal, com ginecomastia ou azoospermia; grau 2 – hipospádia peniana isolada; grau 3 – hipospádia perineal, micropênis, criptorquidia e/ou escroto bífido; grau 4 – seio urogenital, micropênis, fusão labioescrotal

incompleta e criptorquidia; grau 5 – genitália feminina com mínima ação androgênica, caracterizada por discreto aumento do fálo ou fusão labioescrotal posterior; grau 6 - genitália feminina normal com algum grau de masculinização (presença de pêlos) na puberdade; grau 7 – genitália feminina sem masculinização na puberdade (Figura 3) (19).

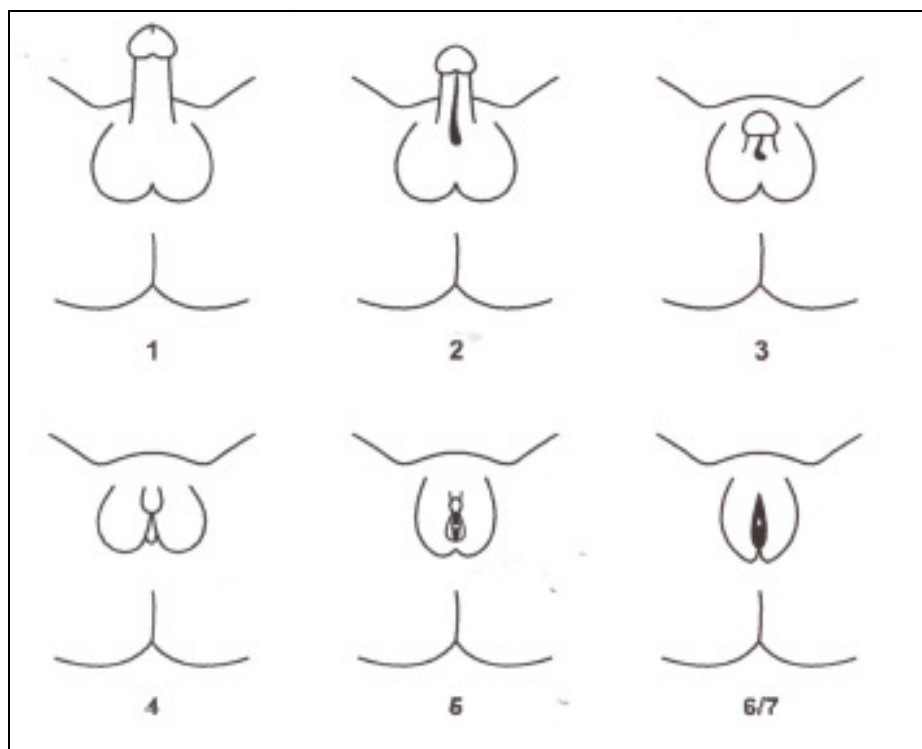


Figura 3: Classificação da gravidade da ambiguidade genital para insensibilidade androgênica [adaptado de Quigley e cols., 1995 (19)].

Em 2000, Ahmed e cols. sugeriram uma pontuação para avaliar a gravidade da alteração da genitália externa (EMS), especialmente para os pacientes com cariótipo 46,XY ou com gônadas palpáveis. Quanto maior a pontuação, mais virilizado é o paciente (20) (Tabela 1).

Tabela 1: Pontuação dos sinais de virilização da genitália externa (EMS) [adaptado de Ahmed e cols., 2000 (20)].

Características	Sim/Não
Fusão escrotal	3/0
Micropênis	0/3
Meato Uretral	
Normal	3
Balânico	2
Peniano	1
Perineal	0
Gônada direita e esquerda	
Escrotal	1,5
Inguinal	1
Abdominal	0,5
Ausente	0

Pela complexidade diagnóstica e terapêutica, os pacientes com DDS, especialmente aqueles com ambiguidade genital ao nascimento, requerem uma equipe multiprofissional capacitada e um arsenal de exames subsidiários para a definição etiológica e do sexo de criação o mais precoce possível (2,7,8).

O pediatra, em especial o neonatologista, é peça fundamental desta equipe, pois depende dele a identificação precoce da ambiguidade genital, a primeira conversa com a família e o encaminhamento adequado à equipe multiprofissional (21).

6. Classificação de DDS com e sem ambiguidade genital

No Consenso de Chicago de 2006 (2), termos como intersexo, pseudohermafroditismo, hermafroditismo e reversão sexual foram considerados estigmatizantes e orientados para serem evitados. Neste Consenso foi proposta nova terminologia com o objetivo de ser suficientemente flexível para incorporar novas informações, indicar a etiologia genética e a variação fenotípica da doença. No entanto, apesar das mudanças, as terminologias atuais adotadas ainda são

consideradas confusas e estigmatizantes por alguns autores que sugerem revisão das mesmas nas futuras edições do Consenso (22,23).

Os DDS são definidos como situações em que não há concordância entre os vários sexos do indivíduo, ou seja, o sexo genético (46,XX ou 46,XY), o sexo gonadal e hormonal e o sexo fenotípico ou anatômico. Assim, é possível a ocorrência de casos de DDS com e sem ambiguidade genital. A antiga nomenclatura descrita em livros e em artigos científicos sobre o assunto baseava-se na natureza da gônada presente e os três grupos básicos eram o pseudo-hermafroditismo masculino (PHM = genitália ambígua com testículos), pseudo-hermafroditismo feminino (PHF = genitália ambígua com ovários) e hermafroditismo verdadeiro (HV = testículo e ovário com ou sem genitália ambígua). Com a descoberta dos cromossomos, alguns autores passaram a definir PHM como ambiguidade genital em presença de um cariótipo 46,XY e testículos; PHF como ambiguidade genital com cariótipo 46,XX e ovários, mantendo-se a anatomia gonadal como base para o diagnóstico de HV independente do cariótipo (24).

O Consenso de Chicago (2) estabeleceu uma nova classificação para os DDS, com base no cariótipo (Tabela 2). No entanto, alguns autores têm questionado esta classificação e sugerido outras (24) com base na associação do cariótipo e do tecido gonadal (Tabela 3)

Tabela 2: Classificação de DDS segundo o cariótipo [adaptado de Lee e cols., 2006 (2)].

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

Tabela 3: Classificação dos DDS com base no cariótipo e tecido gonadal [adaptado de Maciel-Guerra & Guerra-Júnior, 2010 (24)].

DDS por distúrbio da determinação gonadal	46,XY DDS testicular	46,XX DDS ovariano	Outros
(A) 45,X – síndrome de Turner e variantes	(A) Distúrbios na síntese ou ação dos andrógenos	(A) Excesso de andrógenos	(A) Quadros malformativos perineais sem ambiguidade genital
(B) 47,XXY – síndrome de Klinefelter e variantes	1. Defeito de secreção de LH (isolado ou hipopituitarismo)	1. Fetal (ex.: deficiência da 21-OHase, deficiência da 11-OHase, deficiência da 3β-OH esteroide desidrogenase tipo 2)	1. Agenesia de pênis
(C) 46,XX ou 46,XY - Disgenesia gonadal completa	2. Defeito na biossíntese dos andrógenos (ex.: deficiência da 17β-OH esteróide desidrogenase tipo 3, deficiência da 5α-reductase tipo 2, mutações na StAR, CYP11A1 ou 3β-OH esteroide desidrogenase tipo 2)	2. Fetoplacentária (deficiência da aromatase placentária, deficiência da POR...)	2. Inversão penoescrotal total ou parcial
(D) 46,XY - Disgenesia gonadal parcial	3. Defeito na ação androgênica (ITA, IPA)	3. Materno (tumor, exógeno...)	3. agenesia de clitóris
(E) 45,X/46,XY - Disgenesia gonadal mista	4. Defeito no receptor de LH (hipoplasia ou aplasia das células de Leydig)	4. Sindrômico	4. malformação de vagina ou útero (MURCS...)
(D) Qualquer cariótipo - DDS ovotesticular	5. Distúrbios do HAM ou do seu receptor (persistência dos ductos de Muller)	5. Clitoromegalia isolada idiopática	5. Outros
(E) 46,XX - DDS 46,XX testicular	6. Exógeno		
(F) 46,XY - Síndrome de regressão testicular	7. Sindrômico		
	8. Idiopático ou não esclarecido		

Uma crítica sobre a classificação sugerida pelo Consenso leva em consideração que na nova classificação também não se resolveram certos problemas terminológicos e continua a se criar algum grau de estigmatização. Primeiramente, a sugestão de se incluir o cariótipo no nome da doença supõe, erroneamente, que os pacientes não tenham conhecimento do que significa ser 46,XY ou 46,XX. Uma criança criada no sexo feminino DDS 46,XY não vai entender porque está no sexo feminino se seu cariótipo é masculino. A substituição do termo HV por DDS ovotesticular não resolve o problema de estigmatização causado pelo termo hermafroditismo. O termo ovotesticular é claramente entendido como uma fusão entre ovário e testículo e não é aceito com naturalidade. Um ponto em que todos concordam é o de que a substituição de intersexo por DDS não dá a conotação de um sexo intermediário como o nome antigo proporcionava (22,23).

Para que sejam compreendidos os diagnósticos pertencentes a cada grupo, serão descritas a seguir as principais características de cada situação de DDS apenas com ambiguidade genital (Tabela 4).

Tabela 4: Características clínicas das principais causas de DDS com ambiguidade genital.

Diagnóstico	Cariótipo	Genitália Externa	Local Gônadas	Tipo Gônadas	Genitália Interna	Puberdade espontânea	Fertilidade espontânea	Sexo Criação
Disgenesia gonadal parcial	46,XY	A/M	Ab/I/LS	D/TD	A	M?	-	F/M
Disgenesia gonadal mista	45,X/46,XY	A	Ab/I/LS	TD/T	A	M?	-	F/M
DDS ovotesticular	qualquer	A	Ab/I/LS	T/O/OT	A	F	+(F)	F
DDS 46,XX testicular	46,XX	A/M	I/LS	T	M	M	-	M
Síndrome de regressão testicular	46,XY	A/M	-	♯	M?	-	-	F/M
Defeito de secreção de LH	46,XY	M	Ab/I	T	M	-	-	M
Defeito de ação de LH/hCG	46,XY	A	Ab/I	T	M?	-	-	F/M(?)
Defeito da síntese de testosterona	46,XY	A	Ab/I	T	M?	-	-	F/M
Insensibilidade total andrógenos	46,XY	F	I/LS	T	-	F	-	F
Insensibilidade parcial andrógenos	46,XY	A/M	I/LS	T	M?	M?	-	F/M
Deficiência de 5 α -redutase tipo 2	46,XY	A/F	I/LS	T	M	M	-	M
Defeito de produção ou ação do HAM	46,XY	M	I	T	A	M	+	M
Hiperplasia adrenal congênita	46,XX	A	Ab	O	F	F	+	F
Defeito na aromatase placentária	46,XX	A	Ab	O	F	F	+	F
Defeito na P450 oxidoreductase	46,XX	A	Ab	O	F	F	+	F

A = ambígua; Ab = abdominal; D = disgenética; F = feminino; I = inguinal; LS = labioescrotal; M = masculino;

O = ovário; OT = ovotestis; T = testículo; ♯ = testículo regredido

6.1. Disgenesia Gonadal Parcial (46,XY)

Atualmente utiliza-se este termo para designar os casos em que há cariótipo 46,XY sem mosaicismo, diferenciação testicular parcial e ambiguidade genital (25). A etiologia em vários casos ainda é desconhecida, porém, em outros é devida a mutações nos genes da diferenciação testicular, como *SRY*, *NR5A1* (associação com insuficiência adrenal ou histórico familiar de falência ovariana primária em mulheres), *WT1* (associação com aniridia, síndrome nefrótica córtico-resistente, insuficiência renal e/ou tumor de Wilms), *SOX9* (associação com displasia camptomélica), *DMRT1* (associação com retardo mental), entre outros (26). Essa doença é considerada uma variante da disgenesia gonadal pura XY, visto que ambas as formas, completa e incompleta (ou parcial), podem ocorrer na mesma família (27). A histologia gonadal é variável, porém, frequentemente observam-se túbulos seminíferos hipoplásicos associados a áreas semelhantes ao estroma ovariano. A genitália interna consiste de combinação de derivados de Wolff e Muller. Existe risco de transformação neoplásica de ambas as gônadas, em geral para gonadoblastoma mas também para seminomas ou disgerminomas (28). O sexo de criação vai depender da gravidade da ambiguidade genital externa e a puberdade espontânea da presença de tecido testicular normal. No entanto, a maioria dos pacientes apresenta FSH elevado na puberdade e são inférteis (29).

6.2. Disgenesia Gonadal Mista (45,X/46,XY)

Grupo heterogêneo de anomalias gonadais, cromossômicas e fenotípicas, comumente caracterizadas pela presença de testículo disgenético bilateralmente ou associado à gônada disgenética unilateral, persistência de derivados mullerianos e graus variados de ambiguidade genital. Associa-se ao mosaicismo com linhagem 45,X e outra 46,XY, com Y normal ou estruturalmente anômalo. O espectro fenotípico que varia de homem normal com criptorquidia, ou hipospádia peniana, até mulheres com disgenesia gonadal e um quadro semelhante ao da Síndrome de Turner com cariótipo 45,X. É necessário excluir na presença desta linhagem, alterações cardíacas, renais e auditivas, comuns nesta condição (25), em que a baixa estatura é encontrada em 84% dos pacientes. Nos pacientes com disgenesia gonadal mista a incidência de gonadoblastoma varia de nove a 30% dos casos. O risco de tumor quando as gônadas são intra-abdominais chega a 50%. O germinoma

não associado ao gonadoblastoma é a segunda neoplasia mais frequente observada na gônada disgenética, sendo o mais temido por seu potencial de malignidade e bilateralidade. Outras neoplasias, malignas ou não, também podem ocorrer neste grupo de pacientes. Gônadas disgenéticas intra-abdominais e gônadas em fita necessitam ser retiradas assim que possível após o diagnóstico (30). Em gônadas disgenéticas a função hormonal é frequentemente inadequada para o desenvolvimento de uma puberdade normal o que não justifica mantê-las para este fim. A maioria dos pacientes serão inférteis. Terapia de reposição hormonal é necessária na maioria dos casos para indução da puberdade. A decisão do sexo de criação depende do grau de virilização da genitália externa (31).

6.3. DDS Ovotesticular (qualquer cariótipo)

Denominado anteriormente por HV, este é um diagnóstico histopatológico, com a demonstração de tecido testicular (com túbulos seminíferos e/ou espermatozóides) e ovariano (com folículos) presentes num mesmo indivíduo. É denominado lateral quando há ovário de um lado e testículo do outro, bilateral quando o tecido ovariano e testicular (ovotestis) é encontrado nos dois lados e unilateral quando há ovotestis apenas de um lado, independente da gônada contralateral (32). Cerca de 60% dos casos apresentam cariótipo 46,XX, 20% são mosaicos ou quimeras, e 10 a 20% 46,XY (33). A maior parte dos pacientes com DDS ovotesticular e cariótipo 46,XX são *SRY* (em sangue periférico ou fibroblasto) negativo. A maioria dos casos de DDS ovotesticular ainda não tiveram sua definição genética (33). Existe a descrição, na literatura, da presença em uma mesma família de DDS 46,XX testicular e DDS-ovotesticular 46,XX, todos *SRY* negativo. O estudo de famílias como esta sugere um padrão de herança autossômico dominante ou dominante ligado ao X, com expressividade variável (34). Um pequeno número de famílias com DDS 46,XX testicular e DDS ovotesticular 46,XX, porém *SRY* positivo, também já foi descrito e nestes casos, a inativação do X pode ter papel importante na constituição gonadal dos homens XX (33). Nenhuma característica clínica o diferencia claramente das outras causas de ambiguidade genital. O espectro de apresentação clínica vai desde o homem normal até a mulher normal e fértil. No entanto, na maioria dos casos relatados existe ambiguidade genital, sendo mais frequente a genitália predominantemente masculina. A partir da puberdade, porém, a maioria desenvolve aumento de mamas, e cerca de 50% menstruem. Quanto à

genitália interna, há uma variação ampla de apresentação, à semelhança da genitália externa. Quando diagnosticados em idade precoce, a melhor opção de criação é do sexo feminino, tentando-se, quando possível, preservar a porção ovariana das gônadas, com possibilidade de puberdade feminina espontânea, bem como fertilidade (35).

6.4. DDS 46,XX Testicular (46,XX)

Cerca de 80% desses casos apresentam o gene *SRY* translocado sobre um dos cromossomos X ou, mais raramente, sobre um autossomo. Apresentam-se, em geral, sem ambiguidade genital interna ou externa, exceto por microrquidia bilateral. Cerca de 30% dos casos desenvolvem ginecomastia e há uma tendência a haver diminuição da pilosidade facial e distribuição feminina de pelos pubianos (36). Em cerca de 10 a 20% dos casos pode ocorrer ambiguidade genital com hipospadia e criptorquidia; nestes casos o *SRY* raramente é detectado, e podem se associar a DDS 46,XX ovotesticular em uma mesma família (34). A histologia testicular mostra ausência de espermatogônias, disgenesia dos túbulos seminíferos com fibrose peritubular e hiperplasia de células de Leydig, alterações essas que são semelhantes às encontradas na síndrome de Klinefelter. O sexo de escolha de criação é sem dúvida o masculino, porém com prognóstico de infertilidade futura (36).

6.5. Síndrome de Regressão Testicular Bilateral (46,XY)

O fenótipo vai depender da fase do desenvolvimento embriológico em que ocorreu a regressão testicular. A prova da existência prévia de tecido testicular é, no mínimo, a regressão dos derivados de Muller. Esses pacientes caracterizam-se, portanto, pela ausência de gônadas, de útero, trompas e da porção superior da vagina, como também pela presença de um retardo puberal com hipogonadismo hipergonadotrófico. De acordo com a época em que ocorreu a regressão testicular, a clínica pode ser associada à genitália completamente feminina (regressão entre oitava e a 12^a semana de gestação) ou ambígua (regressão entre 12^a e a 20^a semana de gestação) ou masculina com micropênis (regressão após a 20^a semana de gestação). O sexo de criação vai depender da gravidade da ambiguidade genital externa (37).

6.6. Hipogonadismo Hipogonadotrófico (46,XY)

A deficiência de LH pode ser isolada ou associada a outras deficiências hormonais hipotálamo-hipofisárias, e ainda primária ou secundária a patologias do sistema nervoso central, em especial malformações de linha média. O hipogonadismo hipogonadotrófico pode se associar a hiposmia ou anosmia (por hipo ou aplasia dos lobos olfatórios), caracterizando a síndrome de Kallmann. Visto que a produção de testosterona pelas células de Leydig na primeira metade da gestação é estimulada pelo hCG e na segunda metade da gestação pelo LH produzido pela hipófise fetal, o hipogonadismo hipogonadotrófico acarreta criptorquidia, micropênis e hipoplasia escrotal sem hipospádia. O sexo de criação será sempre o masculino (38).

6.7 Insensibilidade ao receptor LH/hCG – Hipoplasia ou Aplasia das Células de Leydig (46,XY)

Esta condição resulta em deficiente produção de testosterona, de cuja magnitude depende a gravidade da ambiguidade genital. A genitália interna é masculina ou ausente e a histologia gonadal mostra testículo com ausência ou deficiência marcada das células de Leydig. Laboratorialmente, os níveis de testosterona são baixos, não respondem ao estímulo com hCG e os níveis de LH são elevados. O tratamento depende da idade de diagnóstico e do grau de virilização da genitália externa, porém sempre que possível o sexo de escolha deve ser o feminino. A herança é autossômica dominante com expressão limitada ao sexo masculino e ocorre por mutações em hemizigose do gene *hCG-LHr* localizado em 2p21 (39).

6.8. Defeitos da Síntese de Testosterona com ou sem HAC (46,XY)

Cinco níveis enzimáticos podem estar afetados na síntese de testosterona, a partir do colesterol. É frequente a presença de uma vagina curta que desemboca em fundo cego; os testículos são geralmente criptorquídicos, e, a partir da puberdade haverá hiperplasia de células de Leydig devido ao excesso de LH. Há diminuição da espermatogênese devido à ausência de testosterona intratesticular necessária tanto para iniciá-la quanto para mantê-la, e lesão de túbulos seminíferos devido ao excesso de FSH. A apresentação da genitália externa varia desde tipicamente feminina a até com qualquer grau de ambiguidade. Dos cinco passos

enzimáticos envolvidos até a produção de testosterona, três são comuns à via de síntese do cortisol (P450_{scc} ou 20-22 desmolase e StAR, complexo P450_{c17} ou 17-hidroxilase e 3 β -OH esteróide desidrogenase) e são, portanto, formas de HAC. As outras duas enzimas (complexo P450_{c17} ou 17-20 desmolase e 17 β -OH esteróide oxidoreductase tipo 3) são exclusivas da via de síntese de testosterona. Todas são doenças de herança autossômica recessiva. O sexo de escolha é o masculino, dependendo do grau de virilização da genitália externa (40).

6.9. Insensibilidade (Parcial ou Total) aos Andrógenos (46,XY)

Doença de herança recessiva ligada ao cromossomo X. O gene do receptor de andrógenos (*AR*) localiza-se em Xq11-Xq12. Os testículos secretam normalmente testosterona na vida fetal e na puberdade. Porém, tanto a genitália quanto os outros órgãos alvo não respondem aos andrógenos nessas fases, causando diferenciação feminina da genitália externa e do seio urogenital, além de feminização na puberdade. O eixo hipotálamo-hipofisário também não tem sensibilidade aos andrógenos, levando a um aumento do LH, o que causará, na puberdade, grandes incrementos da produção de estradiol pelo testículo. Os pacientes com a insensibilidade total aos andrógenos apresentam ausência de dutos genitais internos (os dutos de Wolff regredem pela não ação da testosterona, e os de Muller pela ação normal do HAM), vagina em fundo cego e genitália externa feminina normal, com presença de gônadas inguinais ou labioescrotais. Na puberdade, a distribuição de gordura é ginecóide e os pelos são geralmente escassos ou mesmo ausentes, as mamas têm características femininas normais e as pacientes apresentam amenorréia primária. A opção sexual é indubitavelmente feminina, porém há controvérsias quanto à época ideal para orquiectomia, se precoce pelo risco de malignização (apesar de muito baixo), ou se após a puberdade pela possibilidade de desenvolvimento espontâneo de caracteres sexuais secundários. Os pacientes com a insensibilidade parcial aos andrógenos apresentam os mais variados graus de masculinização da genitália externa e interna, e do seio urogenital. Os testículos podem ser criptorquídeos ou de localização normal e frequentemente ocorre ginecomastia na puberdade, além do comprometimento da espermatogênese. Laboratorialmente, também há aumento de LH, testosterona e estradiol. A opção do sexo vai depender do grau de virilização da genitália externa que reflete, por sua vez, a gravidade da resistência androgênica (19,41,42).

6.10. Deficiência da 5 α -redutase tipo 2 (46,XY)

Essa enzima é necessária para a conversão da testosterona em DHT, responsável pela diferenciação da genitália externa masculina na vida fetal, e, durante a puberdade, necessária para o desenvolvimento dos pelos sexuais e da próstata, e ainda de acne e da recessão temporal dos cabelos. Portanto, a deficiência dessa enzima causa, em indivíduos 46,XY, ambiguidade genital externa acentuada, geralmente com hipospádia grave (períneo-escrotal pseudo-vaginal), micropênis e seio urogenital com vagina em fundo cego; os testículos diferenciam-se normalmente, porém a próstata é rudimentar. Esses pacientes, quando não diagnosticados precocemente, são criados frequentemente como mulheres, mas na puberdade virilizam (sem as características dependentes de DHT e sem ginecomastia) e adquirem, na maioria das vezes, identidade masculina. É doença de herança autossômica recessiva e ocorre devido a mutações do gene da 5 α -redutase tipo 2 (*SRD5A2*), localizado no cromossomo 2. O diagnóstico é sugerido pela relação T/DHT aumentada após teste de estímulo com hCG e confirmado pelo estudo molecular do gene *SRD5A2*. O sexo de criação deve ser o masculino, com correção precoce da hipospádia e uso de testosterona ou DHT para induzir o crescimento do pênis (42-45).

6.11. Defeito da Síntese ou Ação do HAM – Síndrome de Persistência dos Dutos de Muller (46,XY)

Ocorre ou por uma deficiência de produção do HAM (gene em 19p) ou por defeito do receptor do mesmo hormônio (gene em 12q). Clinicamente, a maioria desses pacientes apresenta criptorquidia e hérnia inguinal, que contém, geralmente, trompas, útero e o testículo (chamada de *hernia uteri inguinalis*), com o restante da genitália externa masculina normal. O grau de desenvolvimento dos dutos de Muller é variável e, frequentemente, assimétrico. A função testicular é normal, porém alguns pacientes podem desenvolver neoplasia testicular após a puberdade. O tipo de defeito genético pode ser suspeitado pelo nível sérico do HAM: se baixo ou indetectável, o defeito é decorrente de mutação do gene que codifica o hormônio; se elevado, mutação no seu receptor. São doenças de herança autossômica recessiva. O sexo de criação é sempre o masculino com fertilidade normal (46).

6.12. HAC (46,XX)

É a principal causa de DDS 46,XX. Das cinco passagens enzimáticas necessárias para a síntese do cortisol, a deficiência de três delas (deficiência da 3 β -OH-esteróide desidrogenase tipo II, da 21-hidroxilase e da 11-hidroxilase) poderá causar a virilização da genitália externa feminina, devido ao excesso de produção de andrógenos. Nessas três situações ocorrerá deficiência da síntese do cortisol, acarretando a hiperplasia adrenal, pelo retrocontrole positivo no eixo hipotálamo-hipófise, aumentando a secreção do CRH e do ACTH. Poderá, além de excesso de produção de andrógenos por acúmulo dos metabólitos pré-bloqueio, deficiência ou excesso de secreção mineralocorticóide. São doenças de herança autossômica recessiva. A deficiência da 21-hidroxilase ou P450c21 é responsável por aproximadamente 90% dos casos de HAC. Essa enzima é necessária para a conversão da progesterona em desoxicorticosterona, e da 17-OH-progesterona em 11-desoxicortisol (composto S). A sua deficiência, na maioria das vezes, causará deficiência glico e mineralocorticóide, além do excesso de produção de andrógenos (forma perdedora de sal). No entanto, em alguns casos, a deficiência mineralocorticóide nem sempre é evidente (forma virilizante simples). As formas clássicas apresentam elevados níveis séricos de progesterona, 17-OH-progesterona, dehidroepiandrosterona (DHEA), delta-4-androstenediona e testosterona. Nas formas perdedoras de sal ocorre ainda aumento da atividade de renina plasmática, hiponatremia, hipercalemia e acidose metabólica. Devido ao excesso androgênico, essa doença, se não tratada adequadamente, levará a virilização pós-natal progressiva, com aumento da velocidade de crescimento, avanço da maturação esquelética, pilificação pubiana, hirsutismo, acne, aumento de massa muscular, engrossamento da voz, irregularidade menstrual e infertilidade (47,48).

6.13. Deficiência da Aromatase Placentária (46,XX)

A aromatização e dessulfuração dos andrógenos fetais são essenciais para a produção de estrógenos pela placenta humana. A deficiência da aromatase placentária é responsável pela virilização materna e do feto feminino durante a gravidez. No terceiro trimestre de gestação os níveis séricos maternos de estrógenos são baixos e os de andrógenos altos. Após o nascimento de uma criança do sexo feminino com grave ambiguidade genital, a virilização materna vai gradualmente desaparecendo e o recém-nascido cresce normalmente, sem sinais de excesso androgênico. Os níveis materno e neonatal de estrógenos normalizam entre

o segundo e o sexto mês após o parto. É doença de herança autossômica recessiva. Deve-se pensar no diagnóstico diferencial com deficiência da citocromo P450 redutase com ou sem síndrome de Antley-Bixler (gene *CYP17 + CYP21* em 7q11.2). O sexo de criação é o feminino (49,50).

6.14. DDS por Origem Materna (Medicação ou Tumor) (46,XX ou 46,XY)

O tipo de medicação, a dose, a potência e a época do uso são fatores determinantes da gravidade da ambiguidade genital e da definição do sexo social, assim como a presença de doença materna virilizante (hiperplasia adrenal ou tumor adrenal ou gonadal) (51).

6.15. DDS Síndrômicos (46,XX ou 46,XY)

São inúmeras as situações em que ocorre a associação de ambiguidade genital com cariótipo 46,XY ou 46,XX e outras malformações (4).

6.16. DDS não esclarecidos ou idiopáticos (46,XX ou 46,XY)

Apesar de uma ampla e adequada avaliação laboratorial de todos os casos de ambiguidade genital, uma proporção importante (20 a 25%) dos casos com cariótipo 46,XY não tem sua etiologia esclarecida, o que evidencia as dificuldades de diagnóstico e de conduta a serem tomadas nesses casos. Alguns destes casos se associam a retardo de crescimento intrauterino (45,52-54). Entre os casos com cariótipo 46,XX, os casos idiopáticos são raros (55).

7. Estudos de Incidência de DDS

Em 2000, Blackless e cols. (56), com base em relatos da literatura médica, estimaram que 1,7% dos nascidos vivos apresentavam características de DDS. Tal estimativa foi realizada incluindo pacientes com e sem ambiguidade genital. Os pacientes que necessitavam de cirurgia para correção genital eram cerca de 1 entre 1000 a 2000 nascidos vivos.

A alta prevalência de DDS sugerida por Blackless e cols., atraiu a atenção do meio científico e em 2002 Sax (57) questionou tal prevalência, já que o estudo anterior incluía casos de DDS sem ambiguidade genital, como por exemplo síndrome de Klinefelter, síndrome Turner ou hiperplasia adrenal congênita não clássica. O

autor sugeriu que a incidência de DDS com ambiguidade genital seria então muito menor, em torno de 0,018%.

Estudo publicado em 2013 por Cox e cols. (58) mostrou número expressivo de pacientes. Os dados foram obtidos do Registro Europeu de DDS e continham casuística de vários centros de atendimento, por meio dos quais foi obtida a amostra de 649 pacientes. Destes, 460 (71%) eram 46,XY, 121 (19%) 46,XX, 42 (6%) 45,X/46,XY, 8 (1%) 45,X, 6 (1%) 46,XX/46,XY, 2 (0,3%) 47,XXY. Outros cariótipos atípicos (como translocações) ocorreram em 10 casos (1%). Dos 649 casos, 168 (26%) apresentavam outras anomalias associadas. Entre os casos DDS 46,XY, as condições mais comuns incluíam: recém-nascidos pequenos para a idade gestacional em 26 (23%) pacientes, anomalias cardíacas em 22 (20%) e distúrbios do sistema nervoso central em 22 (20%). Já nos DDS 46,XX, as situações associadas foram anomalias ósseas e renais em 12 (44%) e 8 (30%), respectivamente. Foram relatados 170 casos com síndrome da insensibilidade androgênica. Em 9 casos foram confirmadas mutações no receptor de andrógenos, sendo que 6 destes eram de insensibilidade total aos andrógenos e 3 insensibilidade parcial. Nos DDS 46,XX houve 72 casos de HAC por deficiência da 21-hidroxilase, e destes, 8 apresentavam outras condições associadas. Foi evidenciada grande relação de baixo peso ao nascimento em casos de DDS 46,XY, o que não ocorreu nos indivíduos 46,XX.

Pode-se citar, também, o estudo de um único centro, mas com casuística muito menor, envolvendo não apenas pacientes com ambiguidade genital e sim todos os casos de DDS, publicado por Jaruratanasirikul & Engchaun em 2014 (59) e realizado no sul da Tailândia. Foram reunidos 117 pacientes em 20 anos de acompanhamento. Alterações de cromossomos sexuais foram responsáveis por 53% dos casos, seguidos dos DDS 46,XX (29,9%) e pelos DDS 46,XY (17,1%). A ambiguidade genital foi o principal problema em 43 (36,8%) dos 117 pacientes. A HAC por deficiência da 21-hidroxilase forma perdedora de sal foi responsável por 39,5% dos casos e a forma virilizante simples por 25,5%. A disgenesia gonadal mista foi responsável por 18,6% e o DDS ovotesticular por 16,3% dos casos de ambiguidade genital. Em um total de 20 pacientes com DDS 46,XY, 43,8% tinham diagnóstico de disgenesia gonadal parcial XY, 37,5% insensibilidade completa a andrógenos e 12,5% tinham HAC por deficiência da *CYP11A1* ou da *StAR*.

Um estudo indiano reuniu 109 pacientes com ambiguidade genital, acompanhados de 1995 a 2004 no serviço de Endocrinologia Pediátrica em Mumbai. Houve a prevalência de DDS 46,XY em 52,3% dos casos (principalmente insensibilidade androgênica e deficiência de 5 α -redutase tipo 2) seguidos pelos DDS 46,XX em 27,5% dos casos (principalmente HAC por deficiência da 21-hidroxilase forma perdedora de sal). Pacientes com distúrbio da diferenciação gonadal foram 10,1% (9 disgenesias gonadais e 2 DDS ovotesticular). Os casos sindrômicos foram a minoria 1,8% (60).

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Todos os casos com ambiguidade genital atendidos no Ambulatório do GIEDDS – UNICAMP entre janeiro de 1989 e dezembro de 2011 foram incluídos no estudo. Durante esse período, a mesma equipe médica, composta por endocrinologista pediátrico, geneticista e psicólogo acompanhou todos os casos. Todos os cariótipos foram realizados no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) – UNICAMP, com contagem de no mínimo 30 metáfases. Todos os exames hormonais e bioquímicos foram realizados no Laboratório de Fisiologia do HC – UNICAMP. Todos os exames moleculares foram realizados no Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – UNICAMP.

O critério para definição de ambiguidade genital foi o definido pelo Consenso de Chicago (2). Os casos foram classificados em quatro grandes grupos que concordaram em parte, com a nomenclatura proposta pelo Consenso (2) e foi adaptada de acordo com o tecido gonadal (24): (1) distúrbio da determinação gonadal (DDG); (2) DDS 46,XX ovariano; (3) DDS 46,XY testicular e (4) malformações complexas da genitália externa, neste estudo definido como outros.

Entre os DDG foram incluídos os casos de DDS ovotesticular, disgenesia gonadal mista, disgenesia gonadal parcial XY, DDS 46,XX testicular, e regressão testicular 46,XY. Entre os DDS 46,XX ovariano foram incluídos os casos de HAC, clitoromegalia isolada, uso de medicamentos pela mãe na gestação (teratogênico), quadros malformativos (sindrômicos) e não esclarecidos (idiopáticos). Entre os DDS 46,XY testicular foram incluídos os casos de hipogonadismo hipogonadotrófico isolado ou com hipopituitarismo, defeito no receptor LH/hCG, defeito na síntese de testosterona com ou sem HAC, defeito no receptor de andrógenos nas formas total e parcial, deficiência da 5 α -redutase tipo 2, uso de medicamentos pela mãe na gestação (teratogênico), quadros malformativos (sindrômicos) e não esclarecidos (idiopáticos). Entre os casos de malformações complexas da genitália externa (outros) foram incluídos epispádia, malformação do pênis, malformação do clitóris e outras malformações complexas incluindo alterações na genitália externa.

Para a definição de cada etiologia foram estabelecidos os seguintes critérios: (I) independente do cariótipo: DDS ovotesticular: presença de tecido testicular (túbulos seminíferos) e ovariano (folículos) em um mesmo indivíduo; (II) disgenesia gonadal mista: cariótipo com linhagem 45,X e linhagem contendo Y com ausência de tecido ovariano nas gônadas; (III) cariótipo 46,XY: (III.1) disgenesia gonadal parcial: presença de gônadas disgenéticas ou testículos disgenéticos, derivados de Muller (nestes casos foram avaliados os genes *SRY*, *WT1*, *NR5A1* e *SOX9*); (III.2) regressão testicular: ausência macro e microscópica de tecido testicular sem derivados de Muller; (III.3) hipogonadismo hipogonadotrófico (isolado ou com hipopituitarismo): presença de micropênis com ou sem criptorquidia sem hipospádia com níveis baixos de LH; (III.4) defeito no receptor de LH/hCG: defeito na produção de testosterona sem aumento dos precursores adrenais, com ausência de células de Leydig na biópsia testicular e mutação no gene *LHCGR*; (III.5) defeito na síntese de testosterona com ou sem HAC: defeito na produção de testosterona com aumento de pelo menos um dos precursores adrenais (DHEA, progesterona ou androstenediona) e mutação no gene específico (*HSD3B2*, *CYP17A1*, *HSD17B3*); (III.6) defeito no receptor de andrógenos (parcial ou total): produção normal de testosterona com ou sem aumento de LH e mutação no gene *AR*; (III.7) deficiência de 5 α -redutase tipo 2: produção normal de testosterona sem aumento de dihidrotestosterona (DHT) com mutação no gene *SRD5A2*; (III.8) persistência dos ductos de Muller: presença de útero e trompas sem outras alterações na genitália interna e externa e mutação no gene *AMH* ou *AMHR*; (III.9) teratogênico: declarado uso de medicamento pela mãe durante a gestação com produção normal de testosterona; (III.10) sindrômico: presença de ambiguidade genital associada a quadro malformativo sem aberração de cromossomos sexuais; (III.11) idiopático ou não esclarecido: quadro de ambiguidade genital com produção normal de testosterona sem malformações associadas ou uso de drogas na gestação e estudo molecular normal dos genes *AR*, *SRD5A2* e *NR5A1*; (III.12) malformação do pênis: malformação (e não ambiguidade genital) do pênis; (III.13) epispádia: abertura uretral na face dorsal do pênis com ou sem malformação urinária associada; (III.14) malformação múltipla e complexa: quadro de malformação genital (e não ambiguidade genital) associada a outras malformações urinárias, intestinais ou de coluna; (IV) cariótipo 46,XX: (IV.1) DDS 46,XX testicular: presença de tecido testicular bilateral; (IV.2) HAC: aumento de um dos precursores da biossíntese

adrenal (17-OH progesterona, 11-desoxicortisol, progesterona, DHEA) com diminuição da síntese de cortisol e aumento do ACTH, e mutação no gene específico (*CYP21A2*, *POR*); (IV.3) clitoromegalia isolada: aumento exclusivo do clitóris e ausência de qualquer alteração hormonal; (IV.4) teratogênico: declarado uso de medicamento pela mãe durante a gestação com produção hormonal normal; (IV.5) sindrômico: presença de ambiguidade genital associada a quadro malformativo sem aberração de cromossomos sexuais e com produção hormonal normal; (IV.6) idiopático ou não esclarecido: quadro de ambiguidade genital com produção hormonal normal sem malformações associadas ou uso de drogas na gestação; (IV.7) malformação do clitoris: malformação (e não ambiguidade genital) do clitoris; (IV.8) malformação múltipla e complexa: quadro de malformação genital (e não ambiguidade genital) associada a outras malformações urinárias, intestinais ou de coluna.

Quando necessário, o teste de estímulo com hCG foi feito na dose de 1.500 UI intra-muscular por dia, por 3 dias consecutivos, e considerado como resposta normal quando ocorreu um aumento da testosterona superior a 150 ng/dL e relação da testosterona com a DHT menor que 10 (60).

Foram também avaliados os seguintes dados: idade (em meses) na primeira consulta, peso ao nascimento (em gramas), sexo social na primeira consulta e após definição etiológica do caso.

Os dados foram armazenados em planilha do SPSS 16.0 e apresentados em forma de frequência absoluta e relativa. Em relação à idade foi aplicado o teste de Mann-Whitney para verificar diferenças entre os quatro grandes grupos de doenças, com $p < 0,05$.

RESULTADOS

Nestes 23 anos, o GIEDDS – UNICAMP atendeu 408 casos encaminhados por ambiguidade genital, sendo 189 (46,3%) com DDS 46,XY testicular, 105 (25,7%) com DDS 46,XX ovariano, 95 (23,3%) com DDG e 19 (4,7%) com outras malformações (Tabela 5). Em relação aos cariótipos, 250 (61,3%) apresentaram 46,XY, 124 (30,4%) 46,XX e 34 (8,3%) com aberração numérica ou estrutural de cromossomos sexuais em mosaicismo ou não.

Entre os 105 casos de DDS 46,XX ovariano, 69 (65,7%) foram HAC [68 por deficiência da 21 α -hidroxilase: 17 virilizantes simples (1 caso em associação com síndrome de Turner - cariótipo 45,X/46,XX) e 51 perdedores de sal e 1 caso de deficiência da P450-oxidoreductase], 19 (18,1%) com clitoromegalia isolada, 10 (9,5%) sindrômicos [3 associação VATER, 1 síndrome de Seckel, 1 síndrome de Wolf-Hirschhorn, 1 com regressão caudal e 4 de etiologia indefinida], 2 (1,9%) por uso de medicamento pela mãe durante a gestação e 5 (4,8%) sem causa definida (Tabela 5).

Entre os 189 casos de DDS 46,XY testicular, 12 (6,3%) foram hipogonadismo hipogonadotrófico (6 deles com hipopituitarismo associado), 2 (1,1%) com defeito no receptor LH/hCG, 4 (2,1%) com defeito de síntese de testosterona (1 com deficiência da 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase, 1 com deficiência da 17 α -hidroxilase e 2 com deficiência da 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 3), 25 (13,2%) com defeito no receptor de andrógenos (15 com forma completa e 10 com parcial), 20 (10,6%) com deficiência da 5 α -redutase tipo 2, 4 (2,1%) com persistência dos dutos de Müller, 5 (2,6%) por uso de medicamento pela mãe durante a gestação, 40 (21,2%) sindrômicos [3 associação VATER, 3 síndrome CHARGE, 3 síndrome Aarskog, 3 síndrome fetal alcoólico, 1 síndrome de Wolf-Hirschhorn, 1 síndrome de Robnow, 1 síndrome Opitz GBBB, 1 síndrome de Noonan, 3 com aberrações em autossomos como 46,XY,add(1)(q43), 46,XY,add(10)(q26), 46,XY,t(13;14)(q11;q11) e 21 de etiologia indefinida], e 77 (40,8%) de causa não definida [sendo 42 com peso de nascimento \leq 2.500 g (700 a 2.500 g; média = 1.934 g)] (Tabela 5).

Entre os 95 casos com DDG, 22 (23,1%) com DDS ovotesticular [8 com cariótipo 46,XX, 6 com 46,XY, 2 com 46,XX/46,XY, 1 com 47,XXY, 1 com

46,XX/47,XXY/48,XXYY, 1 com 45,X/46,XY, 1 com 45,X/47,XXY, 1 com 45,X/46,X,+mar (Y+), e 1 com 45,X/47,XY,+mar (Y+)], 25 (26,3%) com disgenesia gonadal mista [12 com cariótipo 45,X/46,XY, 4 com 45,X/46,X,+mar(Y+), 3 com 45,X/46,XY/47,XY,+mar(Y+), 1 com 45,X/46,X,i(Yq), 1 com 45,X/46,X,del(Yq), 1 com 45,X/46,X,idic(Yq), 1 com 45,X/46,X,i(Yq)/47,X,i(Yq),i(Yq), 1 com 45,X/46,X,i(Yq)/46,X,r(Y)/47,X,i(Yq),r(Y), e 1 com 45,X,inv(9)(p13;q21)/46,XY,inv(9)(p13;q21)], 39 (41,1%) com disgenesia gonadal parcial 46,XY (9 com mutação no gene *NR5A1*; 5 no *WT1*, sendo 1 WAGR, 2 Dennys-Drash e 2 Frasier; 2 com mutação no *SRY*; e 22 sem mutação nos genes avaliados), 3 (3,2%) com DDS 46,XX testicular, e 7 (7,4%) com síndrome de regressão testicular (1 com agonadismo bilateral e 6 com anorquia bilateral) (Tabela 5).

Entre os 19 outros casos, 4 (21,0%) com epispádia, 5 (26,3%) com malformação do pênis (2 com inversão peno-escrotal parcial, 1 com agenesia do pênis, 1 com má rotação do pênis e 1 com aderência peno-escrotal), 6 (31,7%) com malformação do clitoris (4 com agenesia do clitoris, 1 com hipoplasia grave do clitoris e 1 com lipoma sobre o clitoris), e 4 (21,0%) com malformações múltiplas complexas (2 com extrofia da cloaca e cardiopatia; 1 com síndrome de Prunne-Belly; e 1 com lipoma perineal) (Tabela 5).

A Tabela 6 mostra que dos 111 casos que vieram inicialmente sem registro civil, 52 foram definidos como masculino e 59 como feminino. Dos 189 com registro inicial masculino, 174 foram mantidos no masculino e 15 trocados para feminino; e dos 108 com registro inicial feminino, 96 foram mantidos no feminino e 12 trocados para o masculino.

Tabela 5: Frequência de diagnóstico etiológico de 408 casos consecutivos de DDS com ambiguidade genital atendidos no GIEDDS – UNICAMP entre janeiro de 1989 e dezembro de 2011.

Diagnóstico sindrômico	Diagnóstico etiológico	n	F1	F2		
DDS 46,XX ovariano	Hiperplasia Adrenal Congênita	69	16,9	65,7		
	Clitoromegalia Isolada	19	4,7	18,1		
	Sindrômico	10	2,5	9,5		
	Teratogênico	2	0,5	1,9		
	Idiopático	5	1,2	4,8		
Total parcial		105	25,7	100,0		
DDS 46,XY testicular	Hipogonadismo hipogonadotrófico	12	2,9	6,3		
	Defeito no receptor LH/hCG	2	0,5	1,1		
	Defeito de síntese de testosterona	4	1,0	2,1		
	Defeito no receptor de andrógenos	Total	15	3,7	7,9	
		Parcial	10	2,5	5,3	
	Deficiência de 5 α -redutase tipo 2	20	4,9	10,6		
	Persistência dos ductos de Müller	4	1,0	2,1		
	Teratogênico	5	1,2	2,6		
	Sindrômico	40	9,8	21,2		
	Idiopático	77	18,8	40,8		
Total parcial		189	46,3	100,0		
Distúrbio Diferenciação Gonadal	da	DDS ovotesticular	22	5,4	23,1	
		Disgenesia gonadal mista	25	6,1	26,3	
		Disgenesia gonadal parcial	com mutação <i>SRY</i>	2	0,5	2,1
			com mutação <i>WT1</i>	5	1,2	5,3
			com mutação <i>NR5A1</i>	9	2,3	9,5
			causa desconhecida	22	5,4	23,1
		DDS 46,XX testicular	3	0,7	3,2	
		Síndrome de regressão testicular	7	1,7	7,4	
Total parcial		95	23,3	100,0		
Outros	Epispádia	4	1,0	21,0		
	Malformação do pênis	5	1,2	26,3		
	Malformação do clitóris	6	1,5	31,7		
	Malformações múltiplas	4	1,0	21,0		
Total parcial		19	4,7	100,0		

F1 = frequência relativa (%) em relação ao número total de casos de ambiguidade genital (408);

F2 = frequência relativa (%) em relação ao número de casos do grupo de diagnóstico (105 para o DDS 46,XX ovariano; 189 para o DDS 46,XY testicular; 95 para o DDG e 19 para o outros)

Tabela 6: Frequência de sexo inicial e sexo final de 408 casos consecutivos de DDS com ambiguidade genital atendidos no GIEDDS – UNICAMP entre janeiro de 1989 e dezembro de 2011.

		Sexo Inicial			Total
		Masculino	Feminino	Indeterminado	
Sexo final	Masculino	174	12	52	238
	Feminino	15	96	59	170
Total		189	108	111	408

A Tabela 7 mostra que dos 15 casos com registro inicial masculino que foram trocados para o feminino, 7 eram DDS 46,XX ovariano por HAC, 4 disgenesia gonadal mista, 3 DDS ovotesticular e 1 DDS 46,XY testicular idiopático. Dos 12 que mudaram o registro inicial feminino para masculino, 7 eram deficiência de 5 α -redutase tipo 2, 2 disgenesia gonadal parcial 46,XY, 1 disgenesia gonadal mista, 1 DDS ovotesticular e 1 DDS 46,XY testicular sindrômico. Todos os casos de DDS 46,XX ovariano tiveram registro final feminino. Dos DDS 46,XY testicular, a grande maioria, com exceção dos casos de defeito no receptor LH/hCG, defeito de síntese de testostosterona e insensibilidade total aos andrógenos, tiveram registro final masculino. Entre os DDG, não houve predominância de um dos sexos no registro final na maioria dos casos, com exceção dos DDS 46,XX testicular e síndrome de regressão testicular, em que todos ficaram no sexo final masculino. Entre as outras causas de ambiguidade genital, em geral, a definição do sexo final seguiu o sexo genotípico. Com exceção dos casos de deficiência de 5 α -redutase tipo 2, em nenhum outro caso foi feita a redesignação do sexo após 24 meses de idade.

Ainda na Tabela 7, observa-se que 193 (47,3%) dos 408 casos tiveram a primeira consulta no GIEDDS – UNICAMP antes dos 6 meses de idade. Destes, 82 tinham cariótipo 46,XX, 95 cariótipo 46,XY e 16 aberrações de cromossomos sexuais numéricas ou estruturais. Ainda, 105 tinham sexo social indeterminado, 51 masculino e 37 feminino; e o sexo final foi masculino em 95 e feminino em 98. Destes 193 casos com idade na primeira consulta abaixo de 6 meses, 74 tiveram diagnóstico de DDS 46,XX ovariano, 74 de DDS 46,XY testicular, 37 de DDG e 8 de outras malformações.

A idade média na primeira consulta da amostra como um todo foi de 31,7 meses (aproximadamente 3 anos), sendo significativamente menor no grupo DDS 46,XX ovariano em relação ao DDS 46,XY testicular (Mann-Whitney, $p <$

0,0001) e DDG (Mann-Whitney, $p < 0,0001$); porém não em relação ao grupo de outras malformações (Mann-Whitney, $p = 0,060$). O grupo DDS 46,XY testicular não apresentou diferença estatística com o grupo DDG (Mann-Whitney, $p = 0,975$) e com o grupo outras malformações (Mann-Whitney, $p = 0,125$); assim como o grupo DDG com o grupo outras malformações (Mann-Whitney, $p = 0,190$) (Tabela 8).

Tabela 7: Frequência de sexo inicial e sexo final por diagnóstico etiológico de 193 casos consecutivos de DDS com idade abaixo de 6 meses e ambiguidade genital atendidos no GIEDDS - UNICAMP entre janeiro de 1989 e dezembro de 2011.

Diagnóstico etiológico		Idade ≤ 6 m	Sexo Inicial			Sexo Final		
			M	F	I	M	F	
DDS 46,XX Ovariano	HAC	50	7	36	26	0	69	
	Clitoromegalia Isolada	14	0	10	9	0	19	
	Teratogênico	1	0	2	0	0	2	
	Sindrômico	6	0	7	3	0	10	
	Idiopático	3	0	3	2	0	5	
DDS 46,XY Testicular	Hipogonadismo hipogonadotrófico	4	12	0	0	12	0	
	Defeito no receptor LH/hCG	0	0	2	0	0	2	
	Defeito de síntese de testosterona	1	1	3	0	1	3	
	Defeito no receptor de andrógenos	Total	2	0	14	1	0	15
		Parcial	4	9	0	1	9	1
	Deficiência de 5 α -redutase tipo 2	5	2	12	6	13	7	
	Persistência dos ductos de Müller	1	4	0	0	4	0	
	Teratogênico	3	4	0	1	5	0	
	Sindrômico	21	29	1	10	38	2	
	Idiopático	33	57	1	19	76	1	
Distúrbio da Diferenciação Gonadal	DDS ovotesticular	8	13	4	5	10	12	
	Disgenesia gonadal mista	13	17	1	7	17	8	
	Disgenesia gonadal parcial	com mutação <i>SRY</i>	1	0	0	2	2	0
		com mutação <i>WT1</i>	2	1	2	2	3	2
		com mutação <i>NR5A1</i>	4	4	2	3	8	1
		causa desconhecida	8	11	3	8	18	4
	DDS 46,XX testicular	1	2	0	1	3	0	
Síndrome de regressão testicular	0	7	0	0	7	0		
Outros	Epispádia	2	4	0	0	4	0	
	Malformação do pênis	2	3	0	2	5	0	
	Malformação do clitóris	2	0	5	1	0	6	
	Malformações múltiplas	2	2	0	2	3	1	
Total		193	189	108	111	238	170	

Tabela 8: Idade (em meses) à primeira consulta de 408 casos consecutivos de distúrbios da diferenciação do sexo (DDS) com ambiguidade genital atendidos no GIEDDS - UNICAMP entre janeiro de 1989 e dezembro de 2011.

Diagnóstico	n	Idade (meses)				
		Média	Mediana	DP	Mínimo	Máximo
DDS 46,XX ovariano	105	15,9	1,7	33,7	0,0	173,0
DDS 46,XY testicular	189	35,4	13,7	60,1	0,1	301,0
Distúrbio da Diferenciação Gonadal	95	45,3	9,0	69,3	0,2	324,0
Outros	19	14,8	8,1	22,4	0,3	96,2
Total	408	31,7	7,0	56,7	0,0	324,0

DISCUSSÃO

Trata-se de um estudo descritivo e de grande casuística de DDS com ambiguidade genital durante um longo período de acompanhamento por uma mesma equipe clínica e de laboratório. Ao nosso conhecimento é a maior casuística consecutiva de casos de DDS com ambiguidade genital de um único serviço já publicada na literatura.

Nesses 23 anos, dentre os 408 casos avaliados por ambiguidade genital, predominou o cariótipo 46,XY em 250 casos (61,3%), seguido do 46,XX em 124 casos (30,4%) e das aberrações numéricas ou estruturais dos cromossomos sexuais em mosaicismo ou não em 34 casos (8,3%). Estes resultados são semelhantes aos dados de Cox e cols. (58) que analisando 649 casos do registro internacional de DDS, encontraram 460 casos (71%) com cariótipo 46,XY, 121 (19%) 46,XX e 68 (10%) aberrações numéricas ou estruturais dos cromossomos sexuais em mosaicismo ou não, confirmando que os DDS são mais frequentes em indivíduos com cariótipo 46,XY, devido à complexidade da diferenciação sexual masculina (11).

Dentre os 408 casos, 105 (25,7%) apresentaram o diagnóstico de DDS 46,XX ovariano. Neste grupo de doenças, a principal etiologia foi a HAC com 69 casos (65,7% dos DDS 46,XX ovariano e 16,8% do total de 408 casos de DDS). Dentre os casos de HAC, 68 casos (98,5%) foram por deficiência da 21-hidroxilase (todos com confirmação molecular), sendo 51 perdedores de sal (75%), confirmando a alta frequência desta doença entre todos os casos de DDS (58-60,62). A frequência da forma perdedora de sal também foi semelhante a encontrada em estudos populacionais da doença (63), confirmando que se trata da principal etiologia monogênica de DDS, tanto pela frequência, quanto pelo risco de morte. Também ocorreu um caso de HAC por deficiência da P450-oxidoreductase (49). Entre os demais DDS 46,XX ovariano foram observados casos de clitoromegalia isolada (19 casos), sindrômicos (9 casos), por uso de medicamentos durante a gestação (2 casos) e idiopáticos (5 casos). Estes dados mostram a importância da avaliação clínica, hormonal e molecular detalhada dos DDS, como também da procura de dismorfismos e malformações associadas em casos de ambiguidade genital (4,58).

Quando se trata de DDS com cariótipo 46,XY, muitos são os desafios tanto para a equipe médica como para os pacientes e famílias, pois a complexa

diferenciação sexual masculina e os inúmeros diagnósticos diferenciais exigem tempo e experiência da equipe médica para o estabelecimento do diagnóstico o mais preciso possível no menor tempo de investigação (11). Dos 189 casos, (46,3% dos 408 casos) de DDS 46,XY testicular, destacam-se entre os mais frequentes os defeitos no receptor de andrógenos, tanto na forma parcial como completa, todos com diagnóstico molecular (25 casos, sendo 6,2% dos 408 casos e 13,2% dos 189 com DDS 46,XY testicular) (45) e os com deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2, também todos com diagnóstico molecular (20 casos, sendo 4,9% dos 408 casos e 10,6% dos 189 com DDS 46,XY testicular) (44,45,64,65). Tais diagnósticos diferenciais não são fáceis de serem realizados no recém-nascido, em especial quando não há história de consanguinidade ou casos semelhantes na família (11,42,45,66) e podem definir a opção do sexo preferencial de criação destas crianças (67). Ainda entre os DDS 46,XY testicular, também se deve destacar os casos de hipogonadismo hipogonadotrófico, com ou sem hipopituitarismo, onde a presença de micropênis com criptorquidia e sem hipospádia é o ponto forte para a suspeita diagnóstica (68). Nesta casuística, foram 12 casos de hipogonadismo hipogonadotrófico (6 com hipopituitarismo), que representaram 6,3% dos 189 casos DDS 46,XY testicular e 2,9% dos 408 casos. Entre as etiologias menos frequentes de DDS 46,XY testicular de origem monogênica estiveram os defeitos no receptor LH/hCG (2 casos), os defeitos de síntese de testosterona (4 casos: 1 por mutação no *HSD3B2*, 1 no *CYP17A1* e 2 no *HSD17B3*) (69-71) e as persistências dos ductos de Muller (4 casos) (46). Ainda entre as etiologias pouco frequentes estiveram os casos por uso de medicamentos pela mãe na gestação (5 casos). Porém, entre os mais frequentes no grupo DDS 46,XY testicular estiveram os sindrômicos com 40 casos (21,2% dos 189 casos de DDS e 9,8% dos 408 casos), mostrando novamente a importância de uma avaliação clínica e laboratorial completa destes casos (11,58), e os idiopáticos com 77 casos (40,8% dos 189 casos de DDS 46,XY testicular e 18,8% dos 408 casos), sendo que destes, 42 (54,5%) apresentaram peso abaixo de 2.500g ao nascimento. A associação de baixo peso ao nascimento e ambiguidade genital em recém-nascidos com cariótipo 46,XY é bastante relatada na literatura (4,52,54,58), porém a explicação ainda não está esclarecida.

A determinação gonadal fetal é influenciada por vários genes (*SRY*, *NR5A1*, *WT1*, *SOX9*, entre outros) e por anormalidades em cromossomos sexuais (11,72,73). Com as novas técnicas de sequenciamento genômico, novos genes

estão surgindo como candidatos a participarem deste complexo processo da formação da gônada (5,8,74). Os DDG incluem um grupo de doenças no qual a formação da gônada foi inadequada ou não ocorreu de forma completa, sendo, portanto diagnósticos que exigem a confirmação histológica e a experiência de um patologista teinado na área (75). Como são doenças que podem estar associadas às anormalidades cromossômicas e gênicas, também se faz necessário ter avaliação laboratorial com citogenética convencional, citogenética molecular e molecular de qualidade (76). Dentre os 95 casos de DDG, 11 (11,6%) apresentaram cariótipo 46,XX (8 DDS ovotesticular e 3 DDS 46,XX testicular), 51 (53,7%) com cariótipo 46,XY (6 com DDS ovotesticular, 38 com disgenesia gonadal parcial e 7 com síndrome de regressão testicular) e os demais 33 com aberração numérica ou estrutural de cromossomos sexuais em mosaico ou não (8 com DDS ovotesticular e 25 com disgenesia gonadal mista). Dentre os casos de DDG destacaram-se a disgenesia gonadal parcial (38 casos: 40,0% dos 95 casos de DDG e 9,4% dos 408 casos), a disgenesia gonadal mista (25 casos: 26,3% dos 95 casos de DDG e 6,1% dos 408 casos) e os DDS ovotesticular (22 casos: 23,1% dos 95 casos de DDG e 5,4% dos 408 casos). Dos 39 casos de disgenesia gonadal parcial, em 16 foi encontrada mutação em um gene específico (27,77-81). A identificação da mutação no gene específico é importante para o acompanhamento ao longo prazo destes casos, em especial nos casos de mutação no *WT1* pelo risco de neoplasia renal e gonadal e insuficiência renal (77,78), e no *NR5A1* pelo risco de insuficiência adrenal e falência ovariana primária em mulheres afetadas (80-82). Em uma família com mutação no *SRY*, foi encontrado amplo especto de manifestação da disgenesia gonadal XY, com as formas completa e parcial (27). No entanto, os demais casos sem alteração nos genes avaliados são candidatos ao sequenciamento genômico amplo (74). Ainda em relação aos casos de disgenesia gonadal parcial, o prognóstico de puberdade espontânea nos casos mantidos no sexo masculino é relativamente bom (27). Os casos de disgenesia gonadal mista, pela presença da linhagem 45,X, exigem um acompanhamento ao longo prazo das doenças associadas à síndrome de Turner (83). Os casos de DDS ovotesticular, que podem ocorrer na presença de qualquer constituição cromossômica, são desafio diagnóstico, de definição do sexo de criação, de prognóstico e de identificação da etiologia (33,84,85). A conduta nos casos de DDS ovotesticular depende da faixa etária em que foi feito o diagnóstico e da capacidade funcional dos genitais internos e externos, como na grande maioria

dos casos de ambiguidade genital. Quando diagnosticados em idade precoce, a melhor opção de criação é a do sexo feminino, tentando-se, quando possível, preservar a porção ovariana das gônadas com possibilidade de puberdade feminina espontânea, bem como fertilidade, especialmente nos pacientes com constituição cromossômica 46,XX (33). Casos de DDS ovotesticular 46,XX e DDS 46,XX testicular já foram descritos na mesma família e em gêmeos monozigóticos, mostrando que talvez estas duas entidades possam ter apenas uma etiopatogenia com amplo espectro fenotípico (34). Das etiologias menos frequentes de DDG nesta casuística estiveram os DDS 46,XX testicular (36) e a síndrome de regressão testicular (37,86).

Ainda, entre os 408 casos de DDS, 19 foram avaliados por apresentarem malformação (e não ambiguidade genital) complexa associada a alterações de coluna, trato urinário e intestinal, entre outras (87). O desenvolvimento anormal da genitália externa pode tratar-se de uma anomalia isolada, como também pode fazer parte de alteração no desenvolvimento da parede abdominal inferior ou períneo. Como descrito por Cox e cols. (58) e Hutson e cols. (4), a investigação de malformações em pacientes com DDS é fundamental e muito mais frequente do que a descrita na literatura em geral.

A definição do sexo de criação antes do encaminhamento ao nosso serviço e antes de uma investigação etiológica precisa, além da faixa etária elevada da primeira consulta em nosso serviço, com média de 31,7 meses, mostram ainda que os pediatras necessitam entender melhor os conceitos de DDS e as suas etiologias e implicações clínicas e psicossociais (88). A idade média na primeira consulta foi significativamente menor no grupo DDS 46,XX ovariano talvez explicado pelo grande número de casos de deficiência da 21-hidroxilase na forma perdedora de sal, onde há risco de morte caso não seja realizado diagnóstico precoce. O sexo de criação final predominante foi o masculino (238 casos) seguindo a maior frequência de cariótipos 46,XY e o maior número de casos de DDS 46,XY testicular.

A redesignação do sexo foi necessária em 27 casos [15 de masculino para feminino (DDS 46,XX ovariano por HAC em 7 casos, disgenesia gonadal mista em 4 casos e DDS ovotesticular em 3) e 12 de feminino para masculino (7 por deficiência da 5 α -redutase tipo 2, 2 por disgenesia gonadal parcial XY, 1 disgenesia gonadal mista e 1 DDS ovotesticular)]. Em nenhum destes casos, a redesignação do sexo foi realizada após 24 meses de idade, com exceção dos casos de deficiência

de 5 α -redutase tipo 2 em que a mudança de sexo foi feita em todos na puberdade por opção do próprio paciente.

Nestes 23 anos de atendimento interdisciplinar de DDS com ambiguidade genital e com a experiência de 408 casos atendidos e acompanhados ao longo prazo, pode-se afirmar que os casos de ambiguidade genital representam um problema urgente que devem ser resolvidos de modo rápido e preciso e o mais cedo possível. O manejo destes pacientes exige muita sensibilidade e deve ser realizado por uma equipe multidisciplinar capacitada, para que se possa chegar ao diagnóstico correto e para que não exista confusão ao longo do tempo a respeito da identificação sexual da criança. Se for feito o diagnóstico adequadamente antes do registro civil, na maioria dos casos, é possível fornecer ao paciente e à família uma melhor compreensão da condição, a definição adequada do sexo de criação e permitir uma melhor satisfação com o tratamento. O presente estudo com a ampla casuística descrita mostra que é fundamental que o pediatra geral, muitas vezes o primeiro profissional a avaliar a criança, tenha o mínimo conhecimento sobre DDS, já que tal diagnóstico apesar de raro, se não for encaminhado e conduzido adequadamente, como foi relatado pode causar erros e atrasos diagnósticos, registros civis inadequados e tratamentos ineficazes.

CONCLUSÕES

Portanto, pode-se concluir que o cariótipo 46,XY foi o mais frequente entre os casos de DDS, porém a HAC foi a etiologia de herança monogênica mais frequente entre os DDS. Os casos de DDS 46,XY e de DDG exigem muita atenção e exames laboratoriais precisos para o diagnóstico etiológico correto. As malformações associadas foram frequentes em todos os grupos de DDS e o baixo peso ao nascimento esteve associado ao DDS 46,XY testicular. A idade média ao diagnóstico foi de 31,7 meses, sendo menor no grupo de DDS 46,XX. O sexo de criação final foi masculino em 238 casos e feminino em 170.

REFERÊNCIAS

1. Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G. Histórico do Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo (GIEDDS). In: Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G (Eds). Menino ou menina? Os distúrbios da diferenciação do sexo. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.
2. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA. International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. *Pediatrics*. 2006;118(2):e488-500.
3. Moraes GS, Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G. Aspectos embriológicos. In: Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G (Eds). Menino ou menina? Distúrbios da diferenciação do sexo. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.
4. Hutson JM, Grover SR, O'Connell M, Pennell SD. Malformation syndromes associated with disorders of sex development. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10:476-87.
5. Bashamboo A, Ledig S, Wieacker P, Achermann J, McElreavey K. New technologies for the identification of novel genetic markers of disorders of sex development (DSD). *Sex Dev*. 2010;4:213-24.
6. Eggers S, Sinclair A. Mammalian sex determination - insights from humans and mice. *Chromosome Res*. 2012;20(1):215-38.
7. Ankara GO. Current concepts in Disorders of Sexual Development. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2011;3(3):105-14.
8. Hiort O, Ahmed SF. Understanding differences and disorders of sex development. *Endocr Dev*. 2014;27:VII-VIII.
9. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev*. 2007;87:1-28.
10. Kocer A, Reichmann J, Best D, Adams IR. Germ cell sex determination in mammals. *Mol Hum Reprod*. 2009;15:205-13.
11. Rey RA, Grinspon RP. Normal male sexual differentiation and aetiology disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010;25(2):221-38.

12. Moore KL. Sistema Urogenital. In: Moore KL (Ed.). Embriologia Clínica. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
13. Hutson JM. Embryology of the Human Genital Tract. In: Hutson JM, Warne GL, Grover SR (Eds). Disorders of sex development. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2012.
14. Virtanen HE, Toppari J. Embryology and physiology of testicular development and descent. *Pediatr Endocrinol* . 2014;11(2):206-13.
15. Hannema SE, Hughes IA. Regulation of Wolffian duct development. *Horm Res*. 2007;67:142-51.
16. Hutson JM, Hasthorpe S. Testicular descent and cryptorchidism: the state of the art in 2004. *J Pediatr Surg*. 2005;40(2):297-302.
17. Danish RK. Intersex problems in the neonate. *Indian J Pediatr*. 1982;49(399):555-75.
18. Prader A. Genital findings in the female pseudo-hermaphroditism of the congenital adrenogenital syndrome; morphology, frequency, development and heredity of the different genital forms. *Helv Paediatr Acta*. 1954;9(3):231-48.
19. Quigley CA, De Bellis A, Marsche KB, El- Awady MK, Wilson EM, French F. Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev*. 1995;16:271-321.
20. Ahmed SF, Khwaja O, Hughes IA. The role of a clinical score in the assessment of ambiguous genitalia. *BJU Int*. 2000;85(1):120-24.
21. Guerra-Júnior G, Maciel-Guerra AT. The role of pediatrician in the management of children with genital ambiguities. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(5 Suppl):S184-91.
22. Daminani D, Guerra-Júnior G. As novas definições e classificações dos estados intersexuais: o que o Consenso de Chicago contribui para o estado da arte? *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2007;51(6):1013-7.
23. Pasterski V, Prentice P, Hughes IA. Consequences of the Chicago consensus on disorders of sex development (DSD): current practices in Europe. *Arch Dis Child*. 2010;95:618-23.
24. Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G. Classificação. In: Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G (Eds). Menino ou menina? Os distúrbios da diferenciação do sexo. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.

25. Andrade JGR, Guerra-Júnior G, Maciel-Guerra AT. 46,XY and 45,X/46,XY testicular dysgenesis: similar gonadal and genital phenotype, different prognosis. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2010;54(3):331-4.
26. Andrade JGR, Maciel-Guerra A, Guerra-Júnior G. Outras Disgenesias Gonadais. In: Maciel-Guerra A, Guerra-Júnior G (Eds). *Menino ou menina? Distúrbios da Diferenciação do Sexo.* Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.
27. Assumpção JG, Benedetti CE, Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G, Baptista MT, Scolfaro MR, et al. Novel mutations affecting SRY DNA-binding activity: the HMG box N65H associated with 46,XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-HMG box R30I associated with variable phenotypes. *J Mol Med.* 2002;80(12):782-90.
28. McCann-Crosby B, Mansouri R, Dietrich JE, McCullough LB, Sutton VR, Austin EG, et al. State of the art review in gonadal dysgenesis: challenges in diagnosis and management. *Int J Pediatr Endocrinol* 2014;2014:4.
29. Andrade JGR, Marques-de-Faria AP, Fabbri HC, Mello MP, Guerra-Júnior G, Maciel-Guerra AT. Long-Term follow-up of patients with 46,XY Partial Gonadal Dysgenesis reared as males. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:480724.
30. Lipay MVN, Bianco B, Verreschi ITN. Disgenesias Gonadais e tumores: aspectos genéticos e clínicos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49(1):60-70.
31. Farrugia MK, Sebire NJ, Achermann JC, Eisawi A, Duffy PG, Mushtaq I. Clinical and gonadal features and early surgical management of 45,X/46,XY and 45,X/47,XYY chromosomal mosaicism presenting with genital anomalies. *J Pediatr Urol.* 2013;9(2):139-44.
32. Nistal M, Paniagua R, Gonzalez-Peramato P, Reyes-Múgica M. Ovotesticular DSD (true hermaphroditism). *Pediatr Dev Pathol.* 2014 (Epub ahead of print).
33. Sircili MH, Denes FT, Costa EM, Machado MG, Inacio M, Silva RB, et al. Long-term follow up of a large cohort of patients with ovotesticular disorder of sex development. *J Urol.* 2014;191(5):1532-6.
34. Maciel-Guerra AT, Mello MP, Coeli FB, Ribeiro ML, Miranda ML, Marques-de-Faria AP, et al. XX Maleness and XX true hermaphroditism in SRY-negative monozygotic twins: additional evidence for a common origin. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:339-43.

35. Damiani D, Guedes DR, Damiani D, Setian N, Maciel-Guerra AT, Mello MP, Guerra-Júnior G. Hermafroditismo verdadeiro: experiência com 36 casos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49(1):71-8.
36. Damiani D, Guedes DR, Damiani D, Dichtchekenian V, Coelho Neto JR, Maciel-Guerra AT, et al. Homem XX: relato de três casos na faixa etária pediátrica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49(1):79-82.
37. Pirgon Ö, Dündar BN. Vanishing testes: a literature review. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2012 ;4(3):116-20.
38. Beate K, Joseph N, Nicolas de R, Wolfram K. Genetics of isolated Hypogonadotropic Hypogonadism: Role of GnRH receptor and other genes *Int J Endocrinol.* 2012;2012:147893.
39. Sinha SK, Bhangoo A, Ten S, Gromoll J. Leydig cell hypoplasia due to inactivating luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene mutation presenting as a 46,XY DSD. *Adv Exp Med Biol.* 2011;707:147-8.
40. Reis ACS, Paulo SS, Castro M. Defeitos da síntese da testosterona. In: Maciel-Guerra A, Guerra-Júnior G (Eds). *Menino ou menina? Distúrbios da Diferenciação do Sexo.* Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.
41. Melo KFS, Mendonça BB, Billerbeck AEC, Costa EMF, Latronico AC, Arnhold LJP. Síndrome de insensibilidade aos andrógenos: análise clínica, hormonal e molecular de 33 casos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49(1):87-97.
42. Veiga-Junior NN, Medaets PA, Petrolí RJ, Calais FL, Mello MP, Castro CC, et al. Clinical and laboratorial features that may differentiate 46,XY DSD due to Partial Androgen Insensitivity and 5 α -reductase type 2 deficiency. *Int J Endocrinol.* 2012;2012:964876.
43. Stuchi-Perez EG, Hackel C, Oliveira LE, Ferraz LF, Oliveira LC, Nunes-Silva D, et al. Diagnosis of 5 α -reductase type 2 deficiency: contribution of anti-Mullerian hormone evaluation. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2005;18(12):1383-9.
44. Costa EM, Domenice S, Sircili MH, Inácio M, Mendonça BB. DSD due to 5 α -reductase 2 deficiency - from diagnosis to long term outcome. *Semin Reprod Med.* 2012;30(5):427-31.
45. Calais FL, Soardi FC, Petrolí RJ, Lusa AL, Paiva E Silva RB, Maciel-Guerra AT, et al. Molecular diagnosis of 5 α -reductase type II deficiency in Brazilian siblings with 46,XY disorder of sex development. *Int J Mol Sci.* 2011;12(12):9471-80.

46. Nishi MY, Domenice S, Maciel-Guerra AT, Zaba Neto A, Silva MA, Costa EM, et al. Analysis of anti-Mullerian hormone (AMH) and its receptor (AMHR2) genes in patients with persistent Mullerian duct syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2012;56(8):473-8.
47. Sharma R, Seth A. Congenital adrenal hyperplasia: issues in diagnosis and treatment in children. *Indian J Pediatr.* 2014;81(2):178-85.
48. White PC, Bachega TA. Congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency: from birth to adulthood. *Semin Reprod Med.* 2012;30(5):400-9.
49. Guaragna-Filho G, Castro CC, Carvalho RR, Coeli FB, Ferraz LF, Petroli RJ, et al. DDS 46,XX e síndrome de Antley-Bixler causada por novas mutações no gene da enzima P450 oxidoredutase. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2012;56(8):578-585.
50. Lin L, Ercan O, Raza J, Burren CP, Creighton SM, Auchus RJ, et al. Variable phenotypes associated with aromatase (CYP19) insufficiency in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:982-90.
51. Sultan C, Balaguer P, Teroaunne B, Georget V, Paris F, Jeandel C, et al. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;178:99-105.
52. Mendonca BB, Billerbeck AE, Zegher F. Nongenetic male pseudohermaphroditism and reduced prenatal growth. *N Engl J Med.* 2001;345(15):1135.
53. Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassalli JD, Efstratiadis A, Accili D, et al. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature.* 2003;426(6964):291-5.
54. Machado Neto FA, Morcillo AM, Maciel-Guerra AT, Guerra-Junior G. Idiopathic male pseudohermaphroditism is associated with prenatal growth retardation. *Eur J Pediatr.* 2005;164:287-91.
55. Guerra-Júnior G. Quadros idiopáticos ou não esclarecidos. In: Maciel-Guerra A, Guerra-Júnior G (Eds). *Menino ou menina? Distúrbios da Diferenciação do Sexo.* Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.
56. Blackless M, Charuvastra A, Derrtyck A, Fausto-Sterling A, Lauzanne K, Lee E. How sexually dimorphic are we? Review and synthesis. *Am J Hum Biol.* 2000;12:151-66.
57. Sax L. How common is intersex? A response to Anne Fausto-Sterling. *J Sex Res.* 2002;39(3):174-8.

58. Cox K, Bryce J, Jiang J, Rodie M, Sinnott R, Alkhawari M, et al. Novel associations in Disorders of Sex Development: findings from the IDSD Registry. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(2):E348-55.
59. Jaruratanasirikul S, Engchaun V. Management of children with disorders of sex development: 20-year experience in southern Thailand. *World J Pediatr.* 2014;10(2):168-74.
60. Joshi RR, Rao S, Desai M. Etiology and clinical profile of ambiguous genitalia an overview of 10 years experience. *Indian Pediatr.* 2006;43(11):974-9.
61. Stuchi-Perez EG, Lukas-Croisier C, Castro M, Baptista MTM, Scolfaro MR, Marques-de-Faria AP, et al. Evaluation of the tubular and interstitial functions of the testis in 46,XY patients with ambiguous genitalia. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000;13(6):605-12.
62. Al-Mutair A, Iqbal MA, Sakati N, Ashwal A. Cytogenetics and etiology of ambiguous genitalia in 120 pediatric patients. *Ann Saudi Med.* 2004;24(5):368-72.
63. Gidlöf S, Wedell A, Guthenberg C, von Döbeln U, Nordenström A. Nationwide neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Sweden: a 26-year longitudinal prospective population-based study. *JAMA Pediatr.* 2014;168(6):567-74.
64. Hackel C, Oliveira LE, Ferraz LF, Tonini MM, Silva DN, Toralles MB, et al. New mutations, hotspots, and founder effects in Brazilian patients with steroid 5alpha-reductase deficiency type 2. *J Mol Med.* 2005;83(7):569-76.
65. Hackel C, Oliveira LE, Toralles MB, Nunes-Silva D, Tonini MM, Ferraz LF, et al. [5alpha-reductase type 2 deficiency: experiences from Campinas (SP) and Salvador (BA)]. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49(1):103-11.
66. Choi JH, Kim GH, Seo EJ, Kim KS, Kim SH, Yoo HW. Molecular analysis of the AR and SRD5A2 genes in patients with 46,XY disorders of sex development. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2008;21(6):545-53.
67. Cohen-Kettenis PT. Gender change in 46,XY persons with 5alpha-reductase-2 deficiency and 17beta-oxysteroid dehydrogenase-3 deficiency. *Arch Sex Behav.* 2005;34:399-410.
68. Grumbach MM. A window of opportunity: the diagnosis of gonadotropin deficiency in the male infant. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5):3122-7.
69. Lusa LG, Lemos-Marini SH, Soardi FC, Ferraz LF, Guerra-Junior G, Mello MP. Structural aspects of the p.P222Q homozygous mutation of HSD3B2 gene in a

patient with congenital adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2010;54(8):768-74.

70. Belgini DR, Mello MP, Baptista MTM, Oliveira DM, Denardi FC, Garmes HM, et al. Six new cases confirm the clinical molecular profile of complete combined 17 α -hydroxylase/17,20-lyase deficiency in Brazil. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2010;54(8):711-6.

71. Castro CC, Guaragna-Filho G, Calais FL, Coeli FB, Leal IR, Cavalcante-Junior EF, et al. Clinical and molecular spectrum of patients with 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (17- β -HSD3) deficiency. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2012;56(8):533-9.

72. Houk CP, Lee PA. Update on disorders of sex development. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012;19(1):28-32.

73. Romao RL, Salle JL, Wherrett DK. Update on the management of disorders of sex development. *Pediatr Clin North Am.* 2012;59(4):853-69.

74. Ostrer H. Disorders of sex development (DSDs): an update. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(5):1503-9.

75. Scolfaro MR, Cardinali IA, Stuchi-Perez EG, Mello MP, Assumpção JG, Baptista MTM, et al. Morphometry and histology of gonads from 13 children with dysgenetic male pseudohermaphroditism. *Arch Pathol Lab Med.* 2001;125(5):652-6.

76. Santos AP, Andrade JGR, Piveta CS, Paulo J, Guerra-Junior G, Mello MP, et al. Screening of Y chromosome microdeletions in 46,XY partial gonadal dysgenesis and in patients with a 45,X/46,XY karyotype or its variants. *BMC Med Genet.* 2013;14:115.

77. Assumpção JG, Ferraz LF, Benedetti CE, Maciel-Guerra AT, Guerra-Junior G, Marques-de-Faria AP, et al. A naturally occurring deletion in the SRY promoter region affecting the Sp1 binding site is associated with sex reversal. *J Endocrinol Invest.* 2005;28(7):651-6.

78. Andrade JG, Guaragna MS, Soardi FC, Guerra-Junior G, Mello MP, Maciel-Guerra AT. Clinical and genetic findings of five patients with WT1-related disorders. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008;52(8):1236-43.

79. Guaragna MS, Lutaif AC, Bittencourt VB, Piveta CS, Soardi FC, Castro LC, et al. Frasier syndrome: four new cases with unusual presentations. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2012;56(8):525-32.

80. Fabbri HC, Andrade JG, Soardi FC, Calais FL, Petroli RJ, Maciel-Guerra AT, et al. The novel p.Cys65Tyr mutation in NR5A1 gene in three 46,XY siblings with normal testosterone levels and their mother with primary ovarian insufficiency. *BMC Med Genet.* 2014;15:7.
81. Soardi FC, Coeli FB, Maciel-Guerra AT, Guerra-Junior 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(2):223-4.
82. Lourenço D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, et al. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med.* 2009;360(12):1200-10.
83. Johansen ML, Hagen CP, Rajpert-De Meyts E, Kjærgaard S, Petersen BL, Skakkebæk NE, et al. A. 45,X/46,XY mosaicism: phenotypic characteristics, growth, and reproductive function - a retrospective longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(8):E1540-9.
84. Guerra-Junior G, Mello MP, Assumpção JG, Morcillo AM, Lemos-Marini SHV, Baptista MTM, et al. True hermaphrodites in the southeastern region of Brazil: a different cytogenetic and gonadal profile. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 1998;11(4):519-24.
85. Matsui F, Shimada K, Matsumoto F, Itesako T, Nara K, Ida S, et al. Long-term outcome of ovotesticular disorder of sex development: a single center experience. *Int J Urol.* 2011;18(3):231-6.
86. Maciel-Guerra AT, Farah SB, Garmes HM, Pinto-Junior W, Bustorff-Silva JM, Baptista MTM, et al. True agonadism: report of a case analyzed with Y-specific DNA probes. *Am J Med Genet.* 1991;41(4):444-5.
87. Guerra-Junior G, Aun AM, Miranda ML, Beraldo LP, Moraes SG, Baptista MTM, et al. Congenital perineal lipoma presenting as ambiguous genitalia. *Eur J Pediatr Surg.* 2008;18(4):269-71.
88. Warne GL, Raza J. Disorders of sex development (DSDs), their presentation and management in different cultures. *Rev Endocr Metab Disord.* 2008;9(3):227-36.