



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências da Saúde

Identificação de uma nova mutação na síndrome de insensibilidade aos androgénios

Joana Brioso Infante

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Medicina

(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutor Manuel Carlos Loureiro de Lemos

Coorientadora: Doutora Maria Margarida dos Santos Antunes Catarino Bastos
Ferreira

Covilhã, maio de 2014

Dedicatória

Ao meu pai que me passou o gosto pelo saber, ciência e descobertas e à minha mãe que em mim inculuiu a solidariedade e o ajudar o próximo - os traços herdados dos dois que me colocaram no caminho da Medicina.

Agradecimentos

Aos meus pais e irmão, por todo o apoio e incentivo dados durante a elaboração deste trabalho e durante o curso.

Ao Professor Doutor Manuel Lemos, por me ter dado a grande oportunidade de pertencer à sua equipa e aprender investigação durante o curso desde o quarto ano. Agradecerei sempre o apoio dado na elaboração desta tese e na minha candidatura à bolsa de investigação em Harvard, e a sua disponibilidade e conselhos valiosos.

À Doutora Margarida Bastos, pela sua disponibilidade e apoio no estudo da doente.

À Inês Alvelos, grande amiga e companheira, que esteve a meu lado desde os primeiros passos no laboratório e tanto se dedicou comigo a este projeto. Agradeço tudo o que me ensinou, a sua confiança, e sobretudo a sua amizade.

A todos os colegas do laboratório - Eduarda, Catarina, Marina e David - por me terem recebido tão bem e por todas as dicas e boa companhia durante o trabalho laboratorial.

Aos meus amigos e amigas que me acompanharam estes seis anos.

Ao Professor Tom Kirchhausen, que apostou em mim e me inspirou a não desistir da investigação.

Finalmente, à doente estudada nesta tese pela sua simpatia e confiança no nosso trabalho.

Resumo

Introdução: A Síndrome de Insensibilidade aos Androgénios (SIA), uma doença rara de hereditariedade recessiva ligada ao X, é causada por mutações no gene que codifica o recetor dos androgénios (AR). Esta disfunção leva à resistência dos tecidos-alvo aos androgénios, impedindo a masculinização e virilização normal num indivíduo com a constituição cromossómica 46,XY. O diagnóstico pode ser feito *in utero* ou na infância, mas muitos casos passam despercebidos até à puberdade, quando a amenorreia primária com desenvolvimento mamário normal e pêlos púbicos e axilares escassos levam ao estudo dessas jovens. A presença de uma mutação no gene *AR* é o principal critério diagnóstico de SIA. O objetivo deste trabalho foi estudar geneticamente uma paciente adulta de fenótipo feminino e com cariótipo 46,XY.

Materiais e Métodos: A paciente em estudo apresentava aparência feminina normal, mas com cariótipo XY e ausência de útero e ovários mas com gónada à esquerda em ecografia. Extraíu-se ADN leucocitário da paciente e amplificaram-se os exões 4-8 do gene *AR*, que foram sequenciados. Analisou-se a estrutura do ARN mensageiro do *AR* através da realização de RT-PCR a partir de ARN leucocitário e sequenciação do produto resultante.

Resultados: Foi encontrada uma mutação c.2173+2T>C, localizada na zona doadora de *splicing* do intrão 4, com a substituição de uma timina por uma citosina. A sequenciação do produto de RT-PCR demonstrou uma deleção de 123 nucleótidos do exão 4, com justaposição do exão 5 ao restante exão 4. A tradução deste transcrito aberrante produz uma proteína AR com deleção *in-frame* de 41 aminoácidos, correspondentes aos resíduos 674-714, do domínio de ligação da testosterona.

Discussão: Confirmou-se o diagnóstico de síndrome de insensibilidade aos androgénios nesta paciente. A mutação encontrada é a primeira mutação reportada na posição +2 de um intrão do gene *AR*. Esta mutação inativou o local de doação de *splicing* do intrão 4 e iniciou um mecanismo de *splicing* alternativo na posição c.2049 do exão 4, e parte do exão foi eliminada. No recetor dos androgénios, a região deletada corresponde a grande parte da hélice 3, cuja presença é crítica para a mudança conformacional do recetor que facilita a entrada dos androgénios no núcleo. A inexistência da hélice 3 explica a ausência de ligação fisiológica da testosterona ao seu recetor nesta paciente. Após o diagnóstico de SIA, a abordagem terapêutica assenta no tratamento da densidade mineral óssea mais baixa, na exérese cirúrgica das gónadas masculinas, e no apoio psicológico e aconselhamento genético.

Palavras-chave: Síndrome de Insensibilidade aos Androgénios; amenorreia primária; infertilidade; recetor dos androgénios; genética; mutação; testosterona; endocrinologia

Abstract

Introduction: Androgen Insensitivity Syndrome (AIS), a rare X-linked recessive disorder, is caused by mutations in the gene coding the androgen receptor (AR). Its dysfunction leads to target-tissue resistance to androgens, preventing a normal masculinization and virilization of a 46,XY individual. Diagnosis can be made *in utero* or during infancy, but many cases go unnoticed until puberty, when primary amenorrhea with normal breast development and scarce axillary and pubic hair lead to assessment of these girls. Demonstration of a mutation in the AR gene is the main diagnostic criteria for AIS. The aim of this study was to genetically study an adult patient with a female phenotype and 46,XY karyotype.

Materials and Methods: The patient presented a normal female appearance, but with an XY karyotype and absence of a uterus and ovaries, but with a gonad on the left, demonstrated by ultrasound. Leukocyte DNA was extracted from the patient and exons 4-8 of the AR gene were amplified and then sequenced. The structure of the messenger RNA was analyzed using RT-PCR with leukocyte RNA with subsequent sequencing of the resulting product.

Results: A c.2173+2T>C mutation was found, located at the splice donor site of intron 4, with the substitution of a thymine for a cytosine. Sequencing of the RT-PCR product demonstrated a 123-nucleotide deletion in exon 4, with exon 5 being spliced directly to the remaining exon 4. Translation of this aberrant transcript produces an AR protein with an in-frame deletion of 41 aminoacids, corresponding to residues 674-714, in the testosterone-binding domain.

Discussion: The diagnosis of AIS was confirmed in this patient. This is the first reported mutation at the +2 position of an intron in the AR gene. This mutation inactivated the donor splice region of intron 4 and initiated an alternative splicing at position c.2049 of exon 4, and part of the exon was deleted. In the androgen receptor, the deleted region corresponds to the majority of helix 3, and its presence is critical to the conformational change of the receptor that enables the entry of androgens into the nucleus. The inexistence of helix 3 explains the absence of physiological binding of testosterone to its receptor in this patient. After the diagnosis of AIS, the therapeutic approach is based on the treatment of the lower bone mineral density, in the surgical removal of the male gonads, and in psychological support and genetic counseling.

Keywords: Androgen Insensitivity Syndrome; primary amenorrhea; infertility; androgen receptor; genetic; mutation; testosterone; endocrinology

Índice

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
1. Introdução.....	1
2. Materiais e Métodos.....	3
2.1 Caracterização clínica.....	3
2.2 Caracterização molecular.....	4
2.2.1 Amplificação e sequenciação do gene <i>AR</i>	5
2.2.2 Estudo de ARN e ADNc.....	6
3. Resultados.....	8
4. Discussão.....	11
5. Bibliografia.....	17
6. Anexos.....	20
Anexo I. Protocolo de extração de ADN a partir de sangue periférico.....	21
Anexo II. Protocolo de extração de ARN a partir de leucócitos.....	22
Anexo III. Protocolo de síntese ADNc.....	23
Anexo IV. Tabela das mutações reportadas na literatura em locais de <i>splicing</i>	24
Anexo V. Autorização de reprodução de imagem.....	26
Anexo VI. Identificação pessoal.....	28

Lista de Figuras

Figura 1. Gene do recetor dos androgénios e respetiva proteína.....	2
Figura 2. Heredograma da família da paciente.....	3
Figura 3. Localização dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do ADNc do gene <i>AR</i> por RT-PCR.....	7
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR correspondentes aos exões 4-8 do gene <i>AR</i>	8
Figura 5. Eletroferograma correspondente à sequenciação do exão 4 do gene <i>AR</i>	9
Figura 6. Localização da mutação no local de doação de <i>splicing</i> e esquema do conseqüente evento de <i>splicing</i> aberrante.....	9
Figura 7. Comparação do local de doação de <i>splicing</i> com o local de <i>splicing</i> mutante e o local de doação críptico de <i>splicing</i> do intrão 4 do pré-ARNm do <i>AR</i>	12
Figura 8. Representação da estrutura aminoacídica do LBD do recetor dos androgénios.....	13

Lista de Tabelas

Tabela 1. Doseamentos hormonais da paciente.....	4
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados na amplificação dos exões e regiões intrónicas flanqueantes do gene <i>AR</i>	6
Tabela 3. Número dos diferentes tipos de mutação do gene <i>AR</i> associados à Síndrome de Insensibilidade Completa aos Androgénios.....	14

Lista de abreviaturas

A - adenosina
ADN - ácido desoxirribonucleico
ADNc - ácido desoxirribonucleico complementar
ARNm - ácido ribonucleico mensageiro
AF2 - activating function 2 (função de ativação 2)
ARN - ácido ribonucleico
C - citosina
DBD - DNA-Binding Domain (domínio de ligação ao ADN)
DHT - dihidrotestosterona
dL - decilitro
dT - deoxi-timina
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
F - forward
FSH - Follicle Stimulating Hormone (hormona folículo-estimulante)
G - guanina
H - homem
HAM - hormona anti-Mulleriana
HGVS - Human Genome Variation Society
kV - quilovolt
L - litro
LBD - Ligand-Binding Domain (domínio de ligação ao ligando)
LH - Luteinizing Hormone (hormona luteinizante)
M - mulher
m - marcador
mL - mililitro
mm - milímetro
mU - miliunidade
ng - nanograma
nmol - nanomole
NTD - N-Terminal Domain (domínio N-terminal)
pb - pares de bases
PCR - Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
pg - picograma
R - reverse
RT-PCR - reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa
SIA - Síndrome de Insensibilidade aos Androgénios
SICA - Síndrome de Insensibilidade Completa aos Androgénios

SILA - Síndrome de Insensibilidade Ligeira aos Androgénios

SIPA - Síndrome de Insensibilidade Parcial aos Androgénios

snRNP - small nuclear ribonucleoprotein particle

SRY - Sex-determining Region Y

T - timina

TBE - Tris/Borato/EDTA

U - unidade

V - volt

μ L - microlitro

1. Introdução

Certas condições clínicas surgem devido a resistência completa ou parcial à ação de hormonas por incapacidade da sua ligação ao seu recetor e/ou sua ativação. Nestes casos, a concentração da hormona no sangue é normal mas o seu efeito clínico é subnormal. A resistência dos tecidos-alvo aos androgénios testosterona e o seu produto 5 α -dihidrotestosterona (DHT), por disfunção do recetor nuclear dos androgénios, provoca a Síndrome de Insensibilidade aos Androgénios (SIA), ou síndrome de feminização testicular, descrita pela primeira vez em 1953 (1).

A SIA é também a causa mais comum de distúrbio do desenvolvimento sexual em indivíduos 46,XY (2), embora as estimativas da prevalência variem na literatura. Numa série populacional holandesa foi calculada uma prevalência entre 1:40 800 a 1:99 000 casos (3).

Mutações no gene que codifica o recetor dos androgénios provocam vários graus de insensibilidade aos androgénios, de hereditariedade recessiva ligada ao X, embora 30% sejam mutações esporádicas (4). O fenótipo clássico é o de insensibilidade total, ou Síndrome de Insensibilidade Completa aos Androgénios (SICA): uma mulher normal com vagina cega, apesar do cariótipo XY, sem útero ou ovários mas com testículos intra-abdominais que produzem testosterona em concentrações dentro do intervalo adequado de um homem dessa idade que é eficazmente metabolizada em DHT (4). Geralmente são mais altas que mulheres normais, com uma altura entre a média da população feminina e a média da população masculina (5).

A SIA pode ainda ser parcial (SIPA), originando um espetro alargado de graus de masculinização dos genitais externos devido a resposta variável aos androgénios (6), ou ligeira (SILA), em rapazes que apresentam ginecomastia na adolescência ou infertilidade anos mais tarde.

O diagnóstico de SIA pode ser feito *in utero*, quando o fenótipo feminino observado na ecografia está em desacordo com o cariótipo do feto (46,XY). Na infância, as apresentações clínicas mais comuns são hérnias inguinais - de ocorrência rara no sexo feminino, sendo 1,1% manifestação de SICA (7) - ou massas labiais contendo testículos. Atualmente recomenda-se a realização de cariótipo ou biópsia do conteúdo do saco herniário em todas as meninas com hérnias inguinais para excluir a possibilidade de SICA (8).

Ainda assim, em muitos casos não existe sequer suspeita do diagnóstico até à chegada da puberdade, quando a amenorreia primária com desenvolvimento mamário normal e pêlos púbicos e axilares escassos leva ao estudo dessas jovens.

A presença de uma mutação no gene *AR* é agora o principal critério diagnóstico de SIA (9). Este gene codifica uma proteína que apresenta a mesma designação - proteína recetora dos androgénios (Androgen Receptor - AR). O AR pertence à superfamília dos recetores nucleares que ativam a transcrição de genes como resposta à ligação da sua hormona (4). O desenvolvimento masculino primário normal antes do nascimento (masculinização) e o desenvolvimento sexual masculino secundário durante a puberdade (virilização) só podem

ocorrer se existirem androgénios que atuem nos tecidos-alvo, o que requer a presença de um recetor funcionante (10).

O gene *AR* localiza-se no cromossoma Xq11-12 e tem um comprimento de aproximadamente 90kb, mas apenas 2760 nucleótidos codificam a proteína AR de 919 aminoácidos e 4 domínios funcionais estruturalmente distintos (Figura 1). O domínio N-terminal (NTD, codificado pelo exão 1) está envolvido na transativação de genes-alvo dos androgénios, o domínio de ligação ao ADN (DBD, codificado pelos exões 2 e 3) permite a ligação ao ADN, o local de ligação ao ligando está na porção C-terminal da proteína (LBD, codificado pelos exões 4-8), e a região charneira (codões 628-669, nos exões 3 e 4) une o local de ligação ao ADN com o de ligação ao ligando (11).

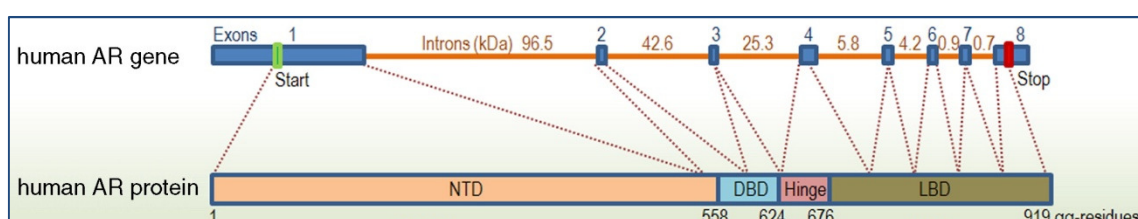


Figura 1. Gene do recetor dos androgénios e respetiva proteína. Estão representados os quatro domínios da proteína: NTD, domínio N-terminal; DBD, domínio de ligação ao ADN; LBD, domínio de ligação ao ligando. Reproduzido com autorização (12).

Atendendo ao desfasamento temporal que pode ocorrer até ao diagnóstico correto de SICA e à difusão dos testes genéticos apenas nos últimos anos, muitas mulheres amenorreicas e inférteis têm esta doença sem o saber, o que leva ao risco de desenvolvimento de complicações inerentes a este distúrbio hormonal e de perpetuação da doença na família pelas mulheres portadoras.

O objetivo deste trabalho foi estudar o gene *AR* de uma adulta com fenótipo feminino e cariótipo 46,XY para estabelecer um diagnóstico, e rever a abordagem terapêutica e psicológica a ter com uma paciente em quem se confirma o diagnóstico de SIA. Reportamos a primeira mutação na posição +2 de um intrão do gene *AR*, com análise da estrutura do ARNm e da proteína mutantes, que reforça a importância da manutenção de sequências de *splicing* específicas para a correta expressão do gene.

2. Materiais e Métodos

2.1 Caracterização clínica

Foi observada uma paciente de 34 anos de idade em consulta de Endocrinologia no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, por antecedentes de amenorreia primária e infertilidade.

Iniciou o desenvolvimento mamário aos 12 anos, e desenvolveu escassos pêlos púbicos e axilares. Casou aos 21 anos e nunca conseguiu engravidar. Negava qualquer terapêutica hormonal. Apresentava antecedentes de herniorrafia inguinal direita na infância, esclerodermia e insuficiência varicosa.

Na sua família, relatava mais casos de amenorreia primária no ramo materno: a irmã de 24 anos, com antecedentes cirúrgicos de correção de tetralogia de Fallot e herniorrafia bilateral na infância; uma prima materna; uma tia materna; e uma tia-avó materna, operada a disgerminoma (Figura 2).

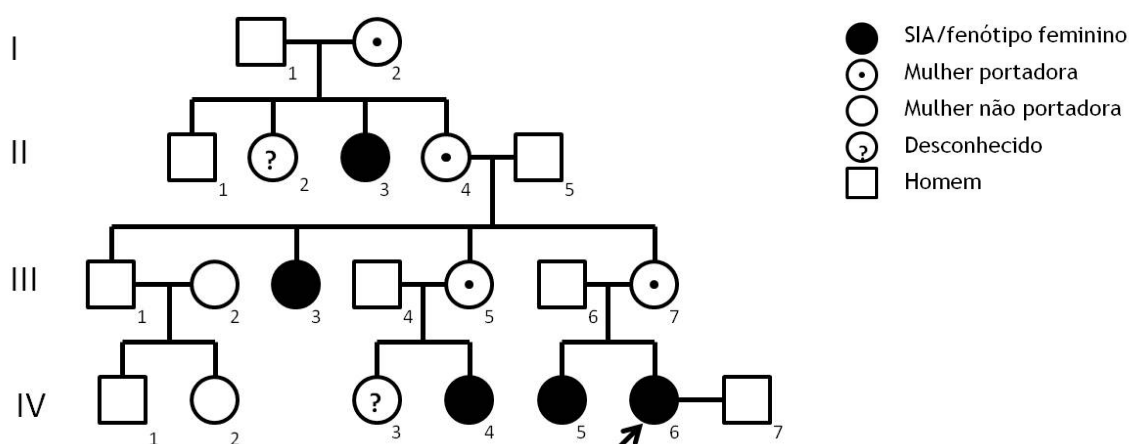


Figura 2. Heredograma da família da paciente. A família apresenta vários membros afetados pelo Síndrome de Insensibilidade aos Androgénios, de transmissão recessiva ligada ao X: a irmã (IV-5), uma prima materna (IV-4), uma tia materna (III-3) e a tia-avó (II-3). A paciente (caso índice) em estudo (IV-6) está indicada por uma seta.

A paciente tinha 168 cm de estatura e pesava 84 kg. Apresentava mamas de conformação adulta com areola, normais à inspeção e palpação, e pêlos púbicos e axilares escassos, correspondentes ao estágio P2 de Tanner.

Ao exame ginecológico, demonstrava vulva de aspeto normal, vagina normal com boa troficidade e cerca de 7 cm de comprimento, e ausência do colo do útero. O toque vaginal foi normal, sem deteção de massas. Como exames complementares de diagnóstico, realizaram-se os doseamentos hormonais da paciente, que revelaram valores de testosterona total e livre correspondentes ao intervalo normal para um homem e superiores ao limite máximo para uma mulher (Tabela 1).

Tabela 1. Doseamentos hormonais da paciente.

Hormona (unidades)	Valor	Valores de referência
FSH (mU/mL)	3,8	H<15, M<9,6
LH (mU/mL)	13,0	H<9, M<12
Estradiol (pg/mL)	29,0	H:6-44, M:10-200
Progesterona (ng/mL)	0,4	H<0,6, M<1,5
Prolactina (ng/mL)	8,0	H<18, M<20
Testosterona total (ng/dL)	2,9	H:2,7-11, M:0,1-0,9
Testosterona livre (pg/mL)	10,0	H:13-40, M<3,9
Androstenediona (nmol/L)	2,0	H:0,6-3,7, M:0,5-3,4

Valores de referência utilizados pelo Centro Hospitalar Universitário de Coimbra. H - homem, M - mulher, FSH - hormona folículo-estimulante, LH - hormona luteinizante, mU - miliunidade, L - litro, pg - picograma, ng - nanograma, mL - mililitro, dL - decilitro, nmol - nanomole

O cariótipo de sangue periférico realizado aos 24 anos de idade foi 46,XY. Foi feita ecografia endovaginal, que revelou ausência do útero e a presença de uma estrutura alongada e densa, medindo 27x8mm, que se pensou tratar-se de gónada esquerda. À direita não se identificou qualquer estrutura correspondente a tecido gonadal.

A paciente foi submetida a gonadectomia da gónada esquerda aos 34 anos, e o estudo de anatomia patológica da gónada revelou tecido testicular. Ficou medicada com 17β-estradiol (2mg/dia, via oral) após a cirurgia para manutenção da troficidade geral do organismo, manutenção dos caracteres sexuais femininos incluindo a mama, e também para prevenção da osteoporose.

2.2 Caracterização molecular

2.2.1 Amplificação e sequenciação do gene AR

Foi obtido o consentimento informado da paciente para a realização do estudo e utilização das suas amostras biológicas. Os elementos da sua família não manifestaram interesse em participar no estudo. O estudo genético foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (Referência CE-FCS-2013-017).

O ADN leucocitário foi extraído a partir de uma amostra de sangue periférico da paciente, de acordo com o protocolo no Anexo I, e quantificado utilizando o espectrofotómetro NanoPhotometer™ (Implen GmbH, Munique, Alemanha).

Os exões 4, 5, 6, 7 e 8 do gene AR, e regiões intrónicas flanqueantes correspondentes - escolhidos por corresponderem à região *hotspot* mutacional do AR (sequências de ADN de grande suscetibilidade a mutações) - foram amplificados por PCR. Cada reação foi preparada num volume final de 25 µL DreamTaq Green Buffer (DreamTaq Buffer, Fermentas, Life Sciences) 1x com 1,5mM de MgCl₂, dNTPs (5 mmol/cada) (NZYMix, NzyTech), 0,24 µM de cada primer (forward e reverse) (StabVida, Portugal), 1U de DNA Polymerase *DreamTaq* (DreamTaq Buffer, Fermentas, Life Sciences), água sem nuclease até perfazer o volume final, e 100 ng de DNA do caso. As reações foram colocadas num termociclador com um programa de PCR padrão. Amplificou-se um segmento por cada exão utilizando os *primers* apresentados na Tabela 2, derivados de sequências publicadas (13).

A temperatura de emparelhamento ideal de cada *primer* foi determinada, testando um gradiente de temperaturas de 55 a 72°C com ADN de um controlo normal, e escolheram-se as temperaturas que produziram uma banda de maior intensidade na eletroforese (Tabela 2).

Para cada exão prepararam-se três reações diferentes: uma com o ADN da paciente, uma sem ADN (controlo negativo) e outra com ADN de um caso controlo previamente testado (controlo positivo). Foram analisados 2 µL de produto de PCR de cada reação por eletroforese, correndo num gel de agarose a 2% com 5 µL de corante de ácidos nucleicos Greensafe (Nzytech) em Tampão TBE (1x) a 120 volt (V) durante 30 minutos. Os produtos da reação de PCR foram purificados enzimaticamente, adicionando 0,5 µL de Exonuclease (Exonuclease I, Thermo Scientific) e 1 µL de Fosfatase (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Scientific) a 10 µL de produtos de PCR, que foram incubados a 37°C durante 20 minutos, seguidos de 20 minutos a 80 °C.

Cada reação de sequenciação do ADN, duas por cada exão, foi preparada com aproximadamente 14 ng de ADN do caso, 0,25 µM de *primer* (Stabvida) e 8 µL de DTCS Quick Start Master Mix (GenomeLab, Beckman Coulter). Os *primers* utilizados foram os mesmos utilizados na reação de PCR. As reações foram colocadas num termociclador de acordo com o

seguinte protocolo: 30 ciclos em que cada ciclo consiste em 20 segundos a 96°C, 20 segundos à temperatura de emparelhamento de cada *primer*, e 4 minutos a 60°C.

Seguidamente procedeu-se à precipitação por etanol e preparação das amostras a sequenciar, de acordo com as instruções do fabricante (GenomeLab, Beckman Coulter).

O método utilizado para sequenciar as amostras consistiu numa temperatura capilar de 50°C, com desnaturação a 90°C durante 120 segundos, voltagem de injeção de 2,0 kV durante 15 segundos e voltagem de separação de 4,0 kV durante 70 minutos. Os resultados foram analisados pelo software GenomeLab Genetic Analysis System (Versão 10.2.3, Beckman Coulter).

Tanto a direção *sense* como a *antisense* de cada fragmento de ADN foram sequenciadas.

Tabela 2. *Primers* utilizados na amplificação dos exões e regiões intrónicas flanqueantes do gene *AR*.

Nome do primer	Sequência	Tamanho do produto PCR (pb)	Temperatura de emparelhamento (°C)
AR-exon4-F	GGAGTTTAGAGTCTGTGACCAGGGA	494	63
AR-exon4-R	CCCACAGGGTTATGATGAAGACTGCC		
AR-exon5-F	GGCCAGCCTGGATGGTCCCT	382	72
AR-exon5-R	CTGGATTGGCTGGCTGGGGC		
AR-exon6-F	TCCCTGGAGCACCAGCAGGA	327	63
AR-exon6-R	TGTCCAGGAGCTGGCTTTTCCT		
AR-exon7-F	AGGCCCAAGCACAGACT	371	63
AR-exon7-R	CACCTCCAACAGGTGGTGCC		
AR-exon8-F	GAGGCCACCTCCTTGCAACCCTG	294	63
AR-exon8-R	GGAACATGTTTCATGACAGACTGTACATCA		

AR - androgen receptor; pb - pares de bases; °C - graus Celsius; F - forward; R - reverse; PCR - Polymerase Chain Reaction

2.2.2 Estudo do ARN e ADNc

Para estudo do efeito da mutação no processamento do ARN do gene *AR*, foi extraído ARN leucocitário de uma amostra de sangue periférico da paciente utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies), segundo o protocolo no Anexo II. Foi sintetizado ADNc através de

métodos padrão (Thermo Scientific RevertAid First Strand DNAc Synthesis Kit, anexo III), utilizando *primers* oligo-DT.

O ADNc sintetizado foi amplificado por PCR utilizando os *primers* AR_ADNc_1-2F (GGGGACATGCGTTTGGGAGACTG) e AR_ADNc_5-6R (GTGCATGCGGTACTCATTGAAA), desenhados recorrendo a programa informático de modo a flanquearem a região onde se esperava que a mutação de *splicing* exercesse efeito, originando um fragmento com 726 pb (Figura 3). A especificidade destes *primers* foi testada através do programa Primer-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, do National Center for Biotechnology Information) que verificou o cumprimento dos critérios de utilização: ligam-se a 100% ao ARNm do AR, contêm a junção de dois exões, têm 22 nucleótidos, aproximadamente 50% dos pares de base são G-C e não formam alça (*hairpin*).

A amplificação foi realizada pelo método de RT-PCR, de protocolo idêntico ao do PCR efetuado com ADN leucocitário da doente, mas utilizando o ADNc como molde em vez de ADN. Como controlo, amplificou-se ADNc correspondente ao gene da β -actina (um gene de manutenção, expresso constitutivamente em todas as células do organismo) através do mesmo protocolo.

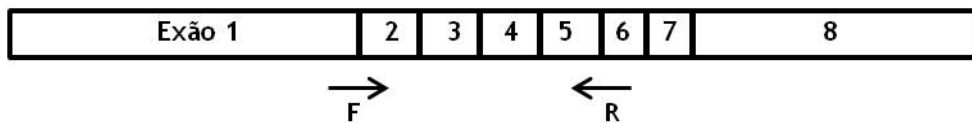


Figura 3. Localização dos *primers* utilizados na amplificação do ADNc do gene AR por RT-PCR. O primer forward (F) abrange a junção do exão 1 com o exão 2, e o primer reverse (R) abrange a junção do exão 5 com o exão 6. O fragmento de ADNc originado com estes *primers* tem o tamanho de 726 nucleótidos e abrange os exões 2 a 5.

3. Resultados

Após a amplificação dos exões 4-8 por PCR, os produtos foram corridos em gel por eletroforese e resultaram no padrão apresentado na Figura 4. Para cada exão, as bandas únicas correspondentes ao ADN do caso estudado e ao ADN do controlo positivo (+) possuíam tamanho (em pares de bases) idêntico e corresponderam ao tamanho esperado para cada exão (Tabela 2). Houve ausência de banda no controlo negativo (-), significando ausência de contaminação de ADN estranho. Estes produtos foram posteriormente sequenciados.

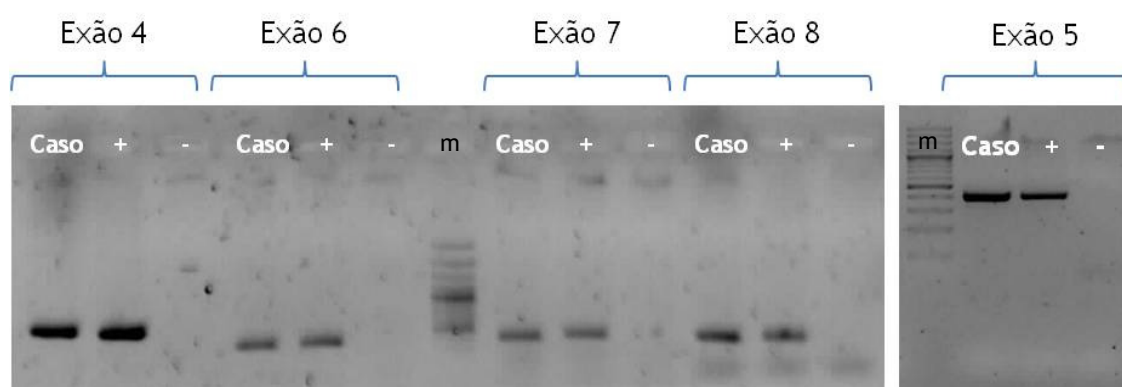


Figura 4. Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose a 2% e analisado com luz ultravioleta. Para cada exão, mostra bandas idênticas para o caso estudado e para o controlo positivo (+), e ausência de banda no controlo negativo (-). Cada amostra apresenta uma banda única. Os tamanhos obtidos dos exões 4, 5, 6, 7, e 8 foram 494, 382, 327, 371 e 294 pb, respetivamente. Não ocorreu contaminação de ADN estranho. m - marcador de 100 pb.

A sequenciação dos exões 4 a 8 revelou sequências idênticas às sequências normais do *AR* previamente publicadas, com uma exceção: a substituição de uma timina (T) por uma citosina (C) no intrão 4, na posição c.2173+2 (de acordo com a nomenclatura HGVS - Human Genome Variation Society - mutação c.2173+2T>C) (Figura 5; Figura 6-A). Esta mutação foi confirmada numa segunda amostra de sangue da paciente.

O ADNc produzido a partir de ARN dos leucócitos da paciente foi sintetizado com *primers* específicos (Figura 3) de modo a conter a junção entre o exão 4 e exão 5. O ADNc da paciente amplificado por PCR foi analisado por eletroforese em gel, que detetou apenas um fragmento, mas de tamanho mais pequeno que o ADNc correspondente ao recetor normal de um controlo (Figura 6-B). Este achado demonstra a existência de um transcrito do *AR* nesta paciente consideravelmente mais pequeno que o transcrito normal do *AR* encontrado no ARN de um controlo.

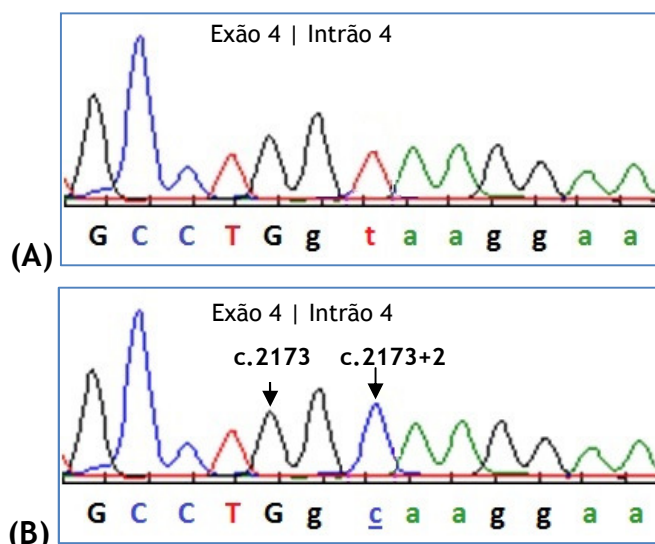


Figura 5. Eletroferograma correspondente à sequenciação do exão 4 do gene *AR*. Sequência do ADN da junção do exão 4 com o intrão 4, (A) normal e (B) da paciente, com uma mutação por substituição de uma timina por uma citosina na posição c.2173+2 (mutação c.2173+2 T>C), correspondente ao segundo nucleótido do local de doação de *splicing*. Os nucleótidos exónicos estão em letras maiúsculas e nucleótidos intrónicos em letras minúsculas.

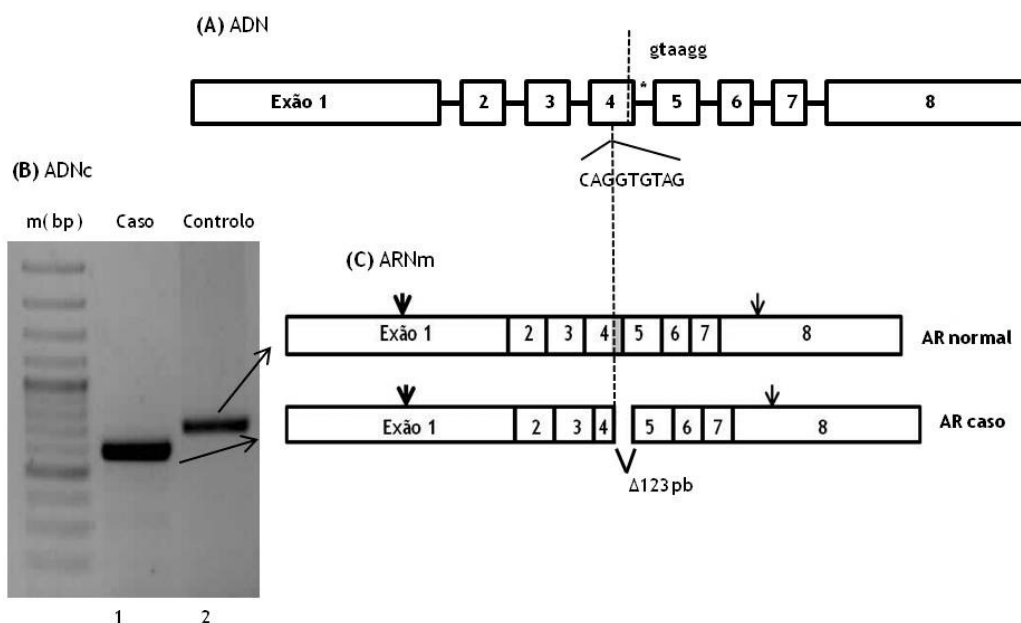


Figura 6. Localização da mutação no local de doação de *splicing* e esquema do consequente evento de *splicing* aberrante. (A) Mutação (*) no segundo nucleótido do intrão 4, com substituição de uma timina por uma citosina (c.2173+2 T>C). (B) Eletroforese em gel de agarose comparando os tamanhos do ADNC amplificado do recetor dos androgénios. O ADNC foi amplificado utilizando os *primers* AR_ADNC_1-2F e AR_ADNC_5-6R. A amplificação do ADNC da paciente (linha 1) originou um produto de 603 nucleótidos, 123 nucleótidos mais curto que o produto normal (linha 2), de 726 pb, de um controlo. (C) A mutação no intrão 4 impede o padrão normal de *splicing*, produzindo um transcrito anómalo de ARNm do *AR* com deleção de 123 nucleótidos do exão 4 e justaposição da primeira porção do exão 4 com o exão 5. m - marcador de 100 pb.

A sequenciação do ADNc da paciente demonstrou uma deleção de 123 nucleótidos do exão 4, com justaposição do exão 5 ao restante exão 4 (Figura 6-C).

A tradução deste transcrito aberrante produz uma proteína AR com deleção *in-frame* de 41 aminoácidos, correspondentes aos resíduos 674-714 da zona de ligação da testosterona.

4. Discussão

Nos pacientes com SIA, é habitual encontrar uma mutação no gene *AR* (2). O recetor dos androgénios é o recetor de esteróides mais mutado na literatura, com 565 diferentes mutações causando SICA, 285 causando SIPA e 55 causando SILA. (10).

O estudo genético realizado nesta paciente confirmou o diagnóstico de síndrome de insensibilidade aos androgénios, na forma completa, provocada pela substituição de uma timina por uma citosina (c.2173+2T>C) no intrão 4 do gene *AR*. Esta mutação, nunca antes reportada, inativou o local de doação de *splicing* do intrão 4 e desencadeou um mecanismo de *splicing* alternativo.

Nos eucariotas, praticamente todos os intrões começam com o dinucleótido GU (GT no ADN) na extremidade 5'. Os primeiros seis nucleótidos do intrão são suficientes para sinalizar a ocorrência de *splicing* (14), constituindo então o local de doação de *splicing*, e a maioria obedece à sequência consensual ${}^C_A A G / G U {}^A_G A G U$ (com o local de clivagem exão/intrão representado por /). Cada nucleótido ocorre com a seguinte frequência (em %): $A_{64} G_{73} / G_{100} U_{100} A_{62} A_{68} G_{84} U_{63}$ (15). O papel da obrigatoriedade do dinucleótido GU, presente em 100% dos intrões, é demonstrado pela inativação completa do local de *splicing* quando ocorrem mutações do G ou do U (16). Essa inativação leva a um de dois cenários: à remoção de um ou mais exões completos, ou ao reconhecimento de uma sequência iniciada por GU e semelhante à consensual como local de *splicing* alternativo (também denominado “críptico”) (16).

A presença de um local de *splicing* críptico adequado na proximidade da mutação é um fator importante na determinação da ocorrência de *splicing* alternativo em vez de remoção do exão (17). No meio do exão 4 do *AR*, existe uma sequência - CAGGUGUAG (CAGGTGTAG no ADN) - que apresenta grande homologia com a sequência consensual de *splicing*. O local de doação de *splicing* da paciente foi mutado de GT para GC, e ficou inativado. Alternativamente, ativou-se a sequência mencionada acima como local críptico de *splicing* (Figura 7-A), e o exão foi cortado ao meio na posição c.2049, originando um transcrito aberrante do *AR*.

Para confirmar a capacidade da primeira sequência ser reconhecida pelos mecanismos de *splicing*, comparámos a homologia da sequência críptica com a sequência de doação normal (Figura 7-B). O primeiro passo do *splicing*, o mais crítico do processo, é a identificação e ligação ao local de *splicing* por snRNPs U1 (*small nuclear ribonucleoprotein particle*) através do emparelhamento de cinco a sete bases complementares (18). No recetor dos androgénios, a sequência de *splicing* normal utilizada entre o exão 4 e intrão 4 - CTG/GTAAGG - consegue formar 7 pares de bases com o ARNU1. Nos recetores normais, esta sequência é preferida à sequência críptica de *splicing* - CAG/GTGTAG - que forma apenas 5 pares de bases com o ARN U1. No entanto, estes 5 pares de bases complementares são suficientes para serem utilizados como local de *splicing* alternativo quando ocorrem mutações no dinucleótido GT inicial do intrão.

(A)

Sequência doadora normal	C U G / G U A A G G
Sequência doadora mutante	C U G / G C A A G G
Sequência doadora críptica	C A G / G U G U A G
Sequência doadora consensual	^C _A A G / G U ^A _G A G U

(B)

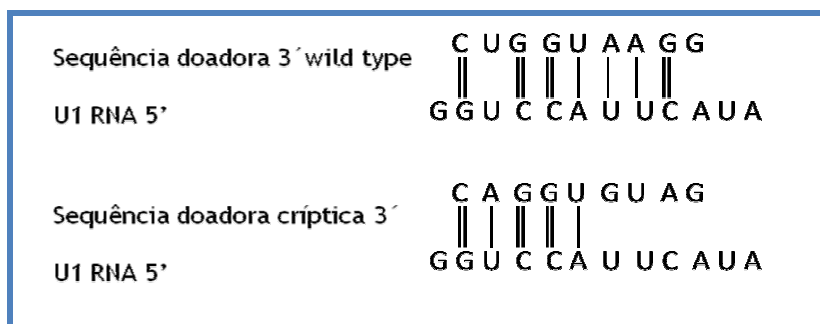


Figura 7. (A) Comparação do local de doação de *splicing*, do local de *splicing* mutante e do local de doação críptico de *splicing* do intrão 4 do pré-mARN do AR com a sequência consensual de *splicing* (15). (B) Emparelhamentos possíveis entre os nucleótidos do ARNU1, responsável por identificar o local de *splicing* adequado, e os nucleótidos do local de doação de *splicing* normal (total de 7 ligações) e do local de doação de *splicing* críptico (total de 5 ligações). Os emparelhamentos entre guanina (G) e citosina (C) estão indicados por linhas duplas e os emparelhamentos entre adenosina (A) e uracilo (U) estão indicados por linhas simples. Esquema adaptado de Ris-Stalpers et al (19).

A utilização deste local de *splicing* alternativo resulta na deleção de 123 nucleótidos do ARNm da paciente. A sua tradução produz uma proteína AR com deleção *in-frame* de 41 aminoácidos (correspondentes aos resíduos 674-714) do exão 4, que codifica parte do domínio de ligação do recetor com a testosterona (LBD). Observando a composição de aminoácidos do LBD do recetor dos androgénios, verifica-se que os aminoácidos eliminados nesta paciente correspondem a grande parte da hélice 3 do recetor (Figura 8) (20). A hélice 3, juntamente com as hélices 4 e 12, forma a superfície de ligação da função de ativação 2 (AF2) que induz uma mudança conformacional na estrutura do AR quando se liga a testosterona (21). Esta mudança permite a interação do recetor com os seus coreguladores e facilita a entrada dos androgénios no núcleo da célula onde exercem o seu efeito (12). Infere-se assim que o desaparecimento de grande parte da hélice 3 impediu a ocorrência da mudança conformacional do recetor da paciente, bloqueando a consequente cascata que leva à entrada dos androgénios no núcleo e à modulação da transcrição dos seus genes-alvo.

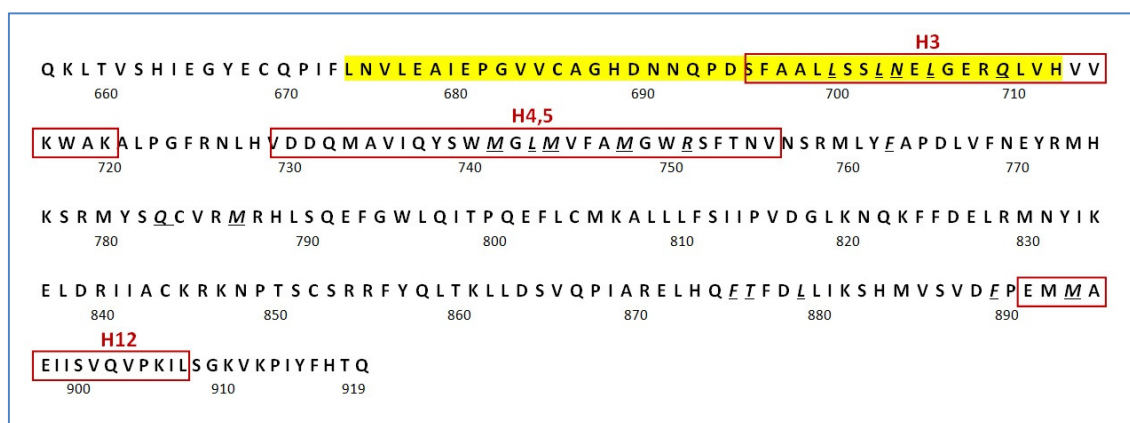


Figura 8. Representação da estrutura aminoacídica do LBD do recetor dos androgénios. A amarelo encontram-se os aminoácidos 674-714, deletados por consequência do *splicing* alternativo desencadeado pela mutação c.2173+2T>C. Dentro das caixas a vermelho encontram-se os aminoácidos que perfazem as hélices 3, 4 e 12, estruturas essenciais para a ligação adequada dos androgénios ao recetor. A deleção dos aminoácidos desta paciente levou ao desaparecimento de grande parte da hélice 3, tornando-a disfuncional, e bloqueando a mudança conformacional do recetor e conseqüente cascata que leva à sua entrada no núcleo e modulação da transcrição de genes-alvo dos androgénios. A - alanina, C - cisteína, D - ácido aspártico, E - ácido glutâmico, F - fenilalanina, G - glicina, H - histidina, I - isoleucina, K - lisina, L - leucina, M - metionina, N - asparagina, P - prolina, Q - glutamina, R - arginina, S - serina, T - treonina, V - valina W - triptofano, Y - tirosina.

A posição dos aminoácidos deletados dentro do recetor dos androgénios explica assim a ausência de ligação fisiológica da testosterona ao seu recetor nesta paciente. A perda de função do recetor dos androgénios foi tal que, apesar do cariótipo XY, a paciente desenvolveu um fenótipo e identidade completamente femininos. Durante a embriogénese, a testosterona é responsável pela diferenciação dos ductos Wolffianos em epidídimos, canais deferentes e vesículas seminais, e a dihidrotestosterona pelo desenvolvimento dos genitais masculinos externos, pênis e escroto (22). As células de Sertoli, nos testículos, produzem a hormona anti-Mulleriana (HAM), que induz a regressão dos ductos Mullerianos que, numa menina, se diferenciariam no útero, trompas de Falópio e fórnix vaginal (23). Deste modo, na nossa paciente os androgénios tiveram um efeito subclínico durante a gestação devido ao recetor não funcional, e os ductos wolffianos regrediram, não desenvolveu genitais externos masculinos, mas a produção normal da HAM inibiu a formação do útero e das trompas, nascendo então com testículos intra-abdominais e genitais externos femininos. Os testículos ficaram nessa localização anormal porque são também os androgénios que controlam a descida inguinoescrotal dos testículos (24).

Não se investigou se o ARNm encurtado desta forma conseguiria ser traduzido, mas um estudo anterior que apresenta um caso de SICA com uma mutação semelhante (na posição 2173+1) revelou que esta variante mutante do *AR* não permite a ligação da testosterona e que é incapaz de regular a transcrição dos genes-alvo da testosterona (19).

Quanto ao gene *AR*, as mutações em zonas de *splicing* perfazem um grupo raro dentro das 565 mutações reportadas em indivíduos com SICA (Tabela 3), com 20 casos reportados até ao momento (Anexo IV) (10). Nesta lista encontram-se tanto casos de *splicing* alternativo como de remoção completa de exões. Nenhum dos casos apresentados resultou de uma mutação na posição +2 do local de *splicing*. Assim, a mutação da nossa paciente é nova e vem reiterar a importância do segundo nucleótido do intrão no reconhecimento adequado das zonas de *splicing* que permitem a construção de uma proteína estruturalmente correta e funcional.

Tabela 3. Número dos diferentes tipos de mutação do gene *AR* associados à Síndrome de Insensibilidade Completa aos Androgénios.

Tipo de mutação	Exão 1	Exão 2	Exão 3	Exão 4	Exão 5	Exão 6	Exão 7	Exão 8
Substituição	54	21	29	60	90	58	84	36
Inserção	7	-	1	-	-	-	6	-
Inserção/Deleção	2	-	-	1	2	-	-	-
Duplicação	5	5	-	1	-	1	1	-
Deleção	26	9	7	7	11	4	4	8
Total	94	35	37	69	103	64	95	40
Grandes deleções					8			
<i>Splicing</i>					20			

Total de mutações associadas a SICA: 565

Dados originados da base de dados de todas as mutações do recetor dos androgénios reportadas na literatura científica (Androgen Receptor Gene Mutations Database (<http://androgendb.mcgill.ca>, acedida a 3 de Novembro de 2013).

Após a confirmação de um diagnóstico de SIA, há complicações clínicas e questões psicológicas que devem ser vigiadas nestas pacientes.

Mulheres com SIA têm densidade mineral óssea mais baixa (25), independentemente da idade em que fazem a gonadectomia. Para fortificar os ossos e evitar o aparecimento de fraturas patológicas, devem iniciar terapia de reposição hormonal após a gonadectomia, pois perdem a produção de androgénios que eram aromatizados em estrogénios. Deve recomendar-se exercício físico regular com pesos, assim como monitorização com

densitometrias ósseas (26). Foi com este propósito que se prescreveram 2mg de 17 β -estradiol diariamente a esta paciente.

A posição anormal dos testículos, usualmente intraabdominais, assim como a resistência aos androgénios podem levar a alterações patológicas. Existe um maior risco de carcinoma de células germinativas do testículo que aumenta com a idade, estimando-se que seja de 3,6% aos 25 anos e 33% aos 50 anos (27). Assim, quando uma criança apresenta SICA, pode ser realizada logo uma gonadectomia precoce ou esta pode ser adiada para o início da idade adulta, e incluindo o exame anatomopatológico das gónadas. Esta paciente fez uma herniorrafia em criança e esse achado não foi relacionado com SIA; se fosse atualmente, com a recomendação de fazer biópsia do conteúdo herniário de hérnias em meninas, provavelmente teria recebido este diagnóstico muito mais cedo.

Como balançar o risco do desenvolvimento de tumor gonadal, com a permissão de uma puberdade de início natural? Se a gonadectomia for realizada na infância, a puberdade terá de ser induzida com reposição de estrogénios, frequentemente na forma de etinilestradiol, tomada de forma contínua já que as pacientes não terão útero (28).

No entanto, revendo casos de malignização dos testículos em pacientes com SIA na literatura, encontramos apenas três casos: Rutgers e Scully descreveram um *carcinoma in situ* com infiltração precoce do estroma aos 17 anos (29), Hurt um seminoma metastático aos 14 anos (30), e Morris um teratoma maligno aos 14 anos (1). Assim, parece seguro adiar a gonadectomia e permitir um desenvolvimento mamário e um surto de crescimento na altura apropriada. No entanto, há situações em que se pode justificar uma gonadectomia mais cedo: por exemplo, se existir um benefício psicológico na remoção precoce das gónadas, ou para prevenir masculinização caso haja dúvida de que a SIA seja completa (27).

Finalmente, crucial na abordagem terapêutica destes pacientes é a componente emocional desta doença, que acarreta infertilidade e stress psicológico provocado pela dissociação entre o seu sexo externamente feminino mas com cromossomas e gónadas masculinas.

Quando descreveu a doença pela primeira vez em 1953, John Morris defendeu que o genótipo XY das pacientes com SICA devia ser escondido, pois “poderia produzir dano psiquiátrico e até talvez suicídio”, e que estas deviam apenas ser informadas de que nunca poderiam ter filhos (1). Na altura, predominava entre a classe médica o princípio de privilégio terapêutico, que considerava legítimo omitir informação clínica a um paciente caso se considerasse que esta fosse prejudicial. Entretanto, o uso deste princípio foi declinando, dando lugar ao consentimento informado e ao princípio da autonomia do paciente. Atualmente defende-se a prática de informar os pacientes com SICA do genótipo XY no momento do diagnóstico, mesmo nas pacientes que foram diagnosticadas no tempo do privilégio terapêutico e que desconheciam a natureza da sua doença (31). No caso das crianças com SICA, o diagnóstico deve inicialmente ser partilhado com os pais, que depois darão a informação de forma gradual à filha no início da adolescência, para as poupar de uma revelação chocante anos mais tarde (32). Na posse desta informação, o apoio pela família e

pelos profissionais de saúde é fulcral. As pacientes devem fazer aconselhamento psicológico, preferencialmente com um especialista em distúrbios do desenvolvimento sexual, e deve ser oferecido aconselhamento genético para as mulheres portadoras na família (33). Os resultados a nível psicosexual a longo prazo destas pacientes sugerem que a maioria assume uma identidade feminina, com comportamento tipicamente feminino e bem-estar psicológico semelhante ao de outras mulheres (34).

Para o futuro, gostaríamos de poder estudar os restantes elementos da família da paciente e confirmar geneticamente se os quatro membros da família com amenorreia primária têm de facto SIA e se a mutação causadora é a mesma. Esta informação poderia ajudar psicologicamente esta família e daria indicação para tratar as complicações inerentes a esta síndrome. Adicionalmente, o conhecimento exato do diagnóstico poderia encaminhar as mulheres portadoras da mutação desta família para aconselhamento genético na altura de conceção de descendentes. Assim, sendo esta uma doença familiar, o estudo deverá no futuro abranger toda a família caso esta o autorize, para avaliar os riscos de cada elemento com SIA e para aconselhar as mulheres portadoras que poderão ter filhas com esta doença.

5. Bibliografia

1. Morris JM. The syndrome of testicular feminization in male pseudohermaphrodites. *Am J Obstet Gynecol.* 1953;65(6):1192-211.
2. Jääskeläinen J. Molecular biology of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;352(1-2):4-12.
3. Boehmer ALM, Brüggewirth H, van Assendelft C, Otten BJ, Verleun-Mooijman MCT, Niermeijer MF, et al. Genotype versus phenotype in families with androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(9):4151-60.
4. Hughes IA, Deeb A. Androgen resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006;20(4):577-98.
5. Danilovic DLS, Correa PHS, Costa EMF, Melo KFS, Mendonca BB, Arnhold IJP. Height and bone mineral density in androgen insensitivity syndrome with mutations in the androgen receptor gene. *Osteoporos Int.* 2007;18(3):369-74.
6. Deeb A, Mason C, Lee YS, Hughes IA. Correlation between genotype, phenotype and sex of rearing in 111 patients with partial androgen insensitivity syndrome. *Clin Endocrinol.* 2005;63(1):56-62.
7. Sarpel U, Palmer SK, Dolgin SE. The incidence of complete androgen insensitivity in girls with inguinal hernias and assessment of screening by vaginal length measurement. *J Pediatr Surg.* 2005;40(1):133-7.
8. Deeb A, Hughes IA. Inguinal hernia in female infants: a cue to check the sex chromosomes? *BJU Int.* 2005;96(3):401-3.
9. Gottlieb B BL, Trifiro MA. Androgen Insensitivity Syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al, editors *GeneReviews™* [Internet] Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014. 1999 Mar 24 [Updated 2011 Oct 6].
10. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat.* 2012;33(5):887-94.
11. Chang CS KJ, Liao ST. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science.* 1988;240(4850):324-6.
12. Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(6):813-27.
13. Cong P, Ye Y, Wang Y, Lu L, Yong J, Yu P, et al. A large deletion/insertion-induced frameshift mutation of the androgen receptor gene in a family with a familial complete androgen insensitivity syndrome. *Gene.* 2012;500(2):220-3.
14. Wieringa B, Hofer E, Weissmann C. A minimal intron length but no specific internal sequence is required for splicing the large rabbit β -globin intron. *Cell.* 1984;37(3):915-25.

15. Mount SM. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* 1982;10(2):459-72.
16. Green MR. PRE-mRNA splicing. *Annu Rev of Genet.* 1986;20(1):671-708.
17. Maruyama T, Miyake Y, Tajima S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Yamamoto A. A single point mutation in the splice donor site of the low-density-lipoprotein-receptor gene produces intron read-through, exon-skipped and cryptic-site-utilized transcripts. *Eur J Biochem.* 1995;232(3):700-5.
18. Côté J, Beaudoin J, Tacke R, Chabot B. The U1 small nuclear ribonucleoprotein/5' splice site interaction affects U2AF binding to the downstream 3' splice site. *J Biol Chem.* 1995;270(8):4031-6.
19. Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Faber PW, Schweikert HU, van Rooij HC, Zegers ND, et al. Aberrant splicing of androgen receptor mRNA results in synthesis of a nonfunctional receptor protein in a patient with androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sciences USA.* 1990;87(20):7866-70.
20. Matias PM, Donner P, Coelho R, Thomaz M, Peixoto C, Macedo S, et al. Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor: implications for pathogenic gene mutations. *J Biol Chem.* 2000;275(34):26164-71.
21. Liao G, Chen L-Y, Zhang A, Godavarthy A, Xia F, Ghosh JC, et al. Regulation of androgen receptor activity by the nuclear receptor corepressor SMRT. *J Biol Chem.* 2003;278(7):5052-61.
22. Hughes IA. Minireview: sex differentiation. *Endocrinology.* 2001;142(8):3281-7.
23. Josso N, Rey RA, Picard J-Y. Anti-Mullerian Hormone: a valuable addition to the toolbox of the pediatric endocrinologist. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:12.
24. Lim HN, Hughes IA, Ross Hawkins J. Clinical and molecular evidence for the role of androgens and WT1 in testis descent. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;185(1-2):43-50.
25. Sobel V, Schwartz B, Zhu Y-S, Cordero JJ, Imperato-McGinley J. Bone mineral density in the complete androgen insensitivity and 5 α -reductase-2 deficiency syndromes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(8):3017-23.
26. Oakes MB, Eyvazzadeh AD, Quint E, Smith YR. Complete androgen insensitivity syndrome—a review. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2008;21(6):305-10.
27. Hannema SE, Scott IS, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Coleman N, Hughes IA. Testicular development in the complete androgen insensitivity syndrome. *J Pathol.* 2006;208(4):518-27.
28. Hughes IA DJ, Bunch TI, Pasterski V, Mastroyannopoulou K, MacDougall J. Androgen insensitivity syndrome. *Lancet.* 2012;380:1419-28.
29. Rutgers JL SR. The androgen insensitivity syndrome (testicular feminization): a clinicopathologic study of 43 cases. *Int J Gynecol Pathol.* 1991;10(2):126-44.

30. Glenn W, Bodurtha J, McCall J, Ali M. Seminoma in pubertal patient with androgen insensitivity syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;161(3):530-1.
31. Conn J, Gillam L, Conway GS. Revealing the diagnosis of androgen insensitivity syndrome in adulthood. *BMJ.* 2005;331(7517):628.
32. Goodall J. Helping a child to understand her own testicular feminisation. *Lancet.* 1991;337(8732):33-5.
33. Jorgensen PB, Kjartansdóttir KR, Fedder J. Care of women with XY karyotype: a clinical practice guideline. *Fertil Steril.* 2010;94(1):105-13.
34. Hines M AS, Hughes IA. Psychological outcomes and gender-related development in complete androgen insensitivity syndrome. *Arch Sex Behav.* 2003;32(2):93-101.

6. Anexos

Anexadas a esta tese encontram-se os seguintes documentos:

Anexo I. Protocolo de extração de ADN a partir de sangue periférico

Anexo II. Protocolo de extração de ARN a partir de leucócitos

Anexo III. Protocolo de síntese ADNc

Anexo IV. Tabela das mutações reportadas na literatura em locais de *splicing*

Anexo V. Autorização de reprodução de imagem

Anexo VI. Identificação pessoal

Anexo I. Protocolo de extração de ADN a partir de sangue periférico

- 1- Adicionar 5 mL de SE, 500 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) e 12,5 µL de proteinase K ao tubo de sangue do caso e incubar durante a noite a 55° C.
- 2- Adicionar 3 mL de NaCl (cloreto de sódio) saturado (6M).
- 3- Incubar a 55°C durante 10 minutos.
- 4- Agitar no vórtex durante 25 seg.
- 5- Centrifugar a 4000 rpm, durante 30 minutos, a 15°C .
- 6- Decantar o sobrenadante com uma pipeta de 1 mL, evitando a espuma, para um novo tubo de 50 mL identificado.
- 7- Adicionar etanol 100% frio em cerca de 2x o volume do sobrenadante.
- 8- Inverter gentilmente o tubo cerca de 50 vezes, observando a formação do novelo de ADN.
- 9- Pipetar 500 µL com o novelo de ADN para eppendorf de 1,5mL identificado.
- 10- Centrifugar a 13000 rpm a 4°C durante 5 minutos.
- 11- Decantar e rejeitar o sobrenadante, observando sempre o pellet de ADN no fundo do tubo.
- 12- Adicionar 500 µL de etanol a 70% frio e inverter algumas vezes.
- 13- Centrifugar a 13000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C.
- 14- Descartar o sobrenadante e deixar secar o tubo de tampa aberta durante cerca de 30 minutos.
- 15- Adicionar 500 µL de água desionizada.
- 16- Deixar em agitação lenta e permanente durante a noite à temperatura ambiente.

Protocolo adaptado de: Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.

Anexo II. Extração de ARN a partir de leucócitos

1. Centrifugar amostra de sangue a 1200 rpm durante 5 minutos para formar um pellet.
2. Lisar as células com 0,5 mL de reagente TRIzol (Life Technologies) e raspar.
3. Deixar as amostras à temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Adicionar 0,2 mL de clorofórmio e mexer os tubos vigorosamente durante 15 segundos.
5. Incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos.
6. Centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
7. Transferir a fase aquosa, aproximadamente 600 µL, para um novo tubo e adicionar 0,5 mL de isopropanol a cada amostra.
8. Incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos a 4°C.
9. Centrifugar as amostras a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
10. Remover o sobrenadante com cuidado, tentando remover o máximo possível, e lavar o pellet de ARN com 1 mL de etanol a 75% (preparado em água sem RNase).
11. Vortexar as amostras e centrifugar a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C.
12. Deixar o pellet de ARN secar ao ar.
13. Dissolver o ARN em 23 µL de água sem RNase/DNase pré-aquecida a 55-60°C por pipetagem repetitiva e incubar a 55-60°C durante 10 a 15 minutos para facilitar a dissolução.
14. Tirar 1 µL para análise no espectrofotómetro.
15. Preservar as amostras a -80°C.

Protocolo adaptado de: Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*. 15, 532-537

Anexo III. Síntese de ADNc

1. Adicionar os seguintes reagentes a um eppendorf esterilizado, sem nuclease e em gelo, na seguinte ordem:

:

ARN	5 µL
Primer	2 µL (1+1)
H2O (sem nuclease)	5 µL

2. Homogeneizar suavemente, centrifugar brevemente e incubar a 65°C durante 5 minutos.
3. Manter solução anterior em gelo. Adicionar os seguintes reagentes na ordem indicada:

5X Reaction Buffer	4 µL
RiboLock RNase Inhibitor (20U/ µL)	1 µL
10 mM dNTP Mix	2 µL
RevertAid M-MuLV Reverse	1 µL
Trasncryptase (200U/µL)	

4. Homogeneizar e centrifugar.
5. Para a síntese de ADNc com oligo-dT, incubar a 42°C durante 60 minutos.
6. Terminar a reação, incubando a 70°C durante 5 minutos.

Anexo IV. Tabela das mutações reportadas na literatura em locais de *splicing*, com fenótipo de Síndrome de Insensibilidade aos Androgénios completo*.

Zona de <i>splicing</i>	Base (HGVS)	Para nucleótido	Referência bibliográfica
Ex1/Int1	c.1616+2_+3	Inserção T	(1)
Ex1/Int1	c.1616+5G	>C	(2)
Ex2/Int2	c.1768+1G	>A	(3)
Ex2/Int2	c.1768+1G	>A	(4)
Ex3/Int3	c.1885+1G	>A	(5)
Ex3/Int3	c.1885+1G	>A	(6)
Ex4/Int4	c.2173+1G	>T	(7)
Ex5/Int5	c.2320+1G	>A	(8)
Ex6/Int6	c.2450-44G	>A	(9)
Ex6/Int6	c.2449+5G	>C	(10)
Ex6/Int6	c.2449+3A	>T	(1)
Ex7/Int7	c.2607+1G	>A	(11)
Ex7/Int7	c.2607+1G	>T	(12)
Ex7/Int7	c.2607+1G	>A	(13)
Int2/Ex3	c.1769-3C	>G	(9)
Int2/Ex3	c.1769-1G	>A	(14)
Int2/Ex3	c.1769-2A	>C	(9)
Int3/Ex4	c.1886-1G	>T	(15)

*Omitiram-se duas mutações por não apresentarem localização. Adaptado da Androgen Receptor Gene Mutations Database (<http://androgendb.mcgill.ca>, acedida a 3 de Novembro de 2013). Ex-exão, Int-intrão.

Referências bibliográficas do anexo IV

1. Trifiro M, Lumbroso R, Beitel L, Vasiliou D, Bouchard J, Deal C, et al. Altered ARNm expression due to insertion or substitution of thymine at position +3 of two splice-donor sites in the androgen receptor gene. *Eur J Hum Genet.* 1997;5(1):50-8.
2. Philibert P, Audran F, Pienkowski C, Morange I, Kohler B, Flori E, et al. Complete androgen insensitivity syndrome is frequently due to premature stop codons in exon 1 of the androgen receptor gene: an international collaborative report of 13 new mutations. *Fertil Steril.* 2010;94(2):472-6.
3. Hellwinkel OJ, Bull K, Holterhus PM, Homburg N, Struve D, Hiort O. Complete androgen insensitivity caused by a splice donor site mutation in intron 2 of the human androgen receptor gene resulting in an exon 2-lacking transcript with premature stop-codon and reduced expression. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999;68(1-2):1-9.

4. Hiort O, Sinnecker GH, Holterhus PM, Nitsche EM, Kruse K. Inherited and de novo androgen receptor gene mutations: investigation of single-case families. *J Pediatr.* 1998;132(6):939-43.
5. 10th joint meeting of British Endocrine Societies. 15-18 April 1991, Brighton. Abstracts. *J Endocrinol.* 1991 Apr;129 Suppl:1-319.
6. Ahmed SF, Cheng A, Dovey L, Hawkins JR, Martin H, Rowland J, et al. Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(2):658-65.
7. Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Faber PW, Schweikert HU, van Rooij HC, Zegers ND, et al. Aberrant splicing of androgen receptor ARNm results in synthesis of a nonfunctional receptor protein in a patient with androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(20):7866-70.
8. Vasu VR, Saranya B, Jayashankar M, Munirajan AK, Santhiya ST. A novel splice site and two known mutations of androgen receptor gene in sex-reversed XY phenotype. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16(7):749-55.
9. Audi L, Fernandez-Cancio M, Carrascosa A, Andaluz P, Toran N, Piro C, et al. Novel (60%) and recurrent (40%) androgen receptor gene mutations in a series of 59 patients with a 46,XY disorder of sex development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(4):1876-88.
10. Chavez B, Mendez JP, Ulloa-Aguirre A, Larrea F, Vilchis F. Eight novel mutations of the androgen receptor gene in patients with androgen insensitivity syndrome. *J Hum Genet.* 2001;46(10):560-5.
11. Lim J, Ghadessy FJ, Yong EL. A novel splice site mutation in the androgen receptor gene results in exon skipping and a non-functional truncated protein. *Mol Cell Endocrinol.* 1997;131(2):205-10.
12. Choi C, Kim KC, Kim HO, Cho SH, Lee JB, Kim IS, et al. Androgen receptor gene mutation identified by PCR-SSCP and sequencing in 4 patients with complete androgen insensitivity syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 2000;263(4):201-5.
13. Kohler B, Lumbroso S, Leger J, Audran F, Grau ES, Kurtz F, et al. Androgen insensitivity syndrome: somatic mosaicism of the androgen receptor in seven families and consequences for sex assignment and genetic counseling. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(1):106-11.
14. Jaaskelainen J, Mongan NP, Harland S, Hughes IA. Five novel androgen receptor gene mutations associated with complete androgen insensitivity syndrome. *Hum Mutat.* 2006;27(3):291.
15. Avila DM, Wilson CM, Nandi N, Griffin JE, McPhaul MJ. Immunoreactive AR and genetic alterations in subjects with androgen resistance and undetectable AR levels in genital skin fibroblast ligand-binding assays. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(1):182-8.

Anexo V. Autorização de reprodução de imagem (Figura 1)

This is a License Agreement between Joana Infante ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Joana Infante
Customer address	Av Anil, Lote 1 Covilha, 6200-498
License number	3307650560419
License date	Jan 14, 2014
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	The International Journal of Biochemistry & Cell Biology
Licensed content title	Molecular cell biology of androgen receptor signalling
Licensed content author	Nigel C. Bennett, Robert A. Gardiner, John D. Hooper, David W. Johnson, Glenda C. Gobe
Licensed content date	June 2010
Licensed content volume number	42
Licensed content issue number	6
Number of pages	15
Start Page	813
End Page	827
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	print
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Title of your thesis/dissertation	A new mutation in the Androgen Insensitivity Syndrome

Expected completion date	Apr 2014
Estimated size (number of pages)	20
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 EUR
VAT/Local Sales Tax	0.00 EUR / 0.00 GBP
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

Anexo VI. Identificação pessoal

Nome: Joana Brioso Infante

Data de nascimento: 7 de junho de 1989

Residência: Fundão

Contacto: joanabrioso@gmail.com

Formação académica:

- Ensino secundário na Escola Secundária do Fundão
- 2008-2014: 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior
- 2008: Summer Institute for Outstanding European Students, na Universidade de Drexel em Filadélfia (EUA)
- 2009: 30th International Summer School in Irish Studies, na University College Cork (Irlanda)
- 2011, 2013: International Student Festival in Trondheim - Global Health, na Universidade de Trondheim (Noruega)

Estágios profissionais:

- 2011: Estágio laboratorial em genética do cancro colorectal, na Tumor Profiling Unit do Cancer Center Amsterdam da Vrije Universiteit Medisch Centrum, Amesterdão (Holanda)
- 2012: Estágio laboratorial em instabilidade genómica, no Dana Farber Cancer Institute e Harvard Medical School (EUA)
- 2013: Estágio no Departamento de Anestesia do Hospital de Nottingham (Reino Unido)