

Hormônio Anti-Mülleriano: Revisão e Contribuição para a Investigação das Ambigüidades Genitais

perspectivas

RESUMO

A investigação etiológica das ambigüidades genitais com cariótipo 46,XY apresenta dificuldades freqüentes. A função testicular tem sido tradicionalmente avaliada pela capacidade esteroidogênica das células de Leydig e pela espermatogênese. Recentemente, demonstrou-se que a avaliação sérica do hormônio anti-mülleriano (HAM) como marcador da função das células de Sertoli pode ser de grande valia nesta investigação. O objetivo desta revisão é apresentar aspectos históricos e fisiológicos do HAM, e sua utilidade na investigação diagnóstica de pacientes com intersexo. Também é mostrada a experiência dos autores na avaliação de intersexo com dosagens combinadas de andrógenos, HAM e testosterona. **(Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/5: 425-433)**

Unitermos: Células de Sertoli; Deficiência de 5 α -redutase; Hormônio anti-mülleriano; Intersexo; Testículo; Testosterona

ABSTRACT

Etiological investigation of patients with sex ambiguity and XY karyotype is a complex matter. Traditionally, testicular function has been assessed only by examining the steroidogenic capacity of Leydig cells and spermatogenesis. Recently, it has been shown that measurement of the serum antimüllerian hormone (AMH), as a marker of Sertoli cell function, may also help clinicians. The aim of this review is to show historic and physiological aspects of the AMH, and its utility to establish the diagnosis in patients with intersexual states. The authors experience in intersex evaluation combining the measurement of androgens, AMH and gonadotropins is also showed. **(Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/5: 425-433)**

Keywords: Antimüllerian hormone; Intersex; 5 α -reductase deficiency; Sertoli cell; Testis; Testosterone

EM 1947, ALFRED JOST (1) DESCREVEU SEUS CLÁSSICOS experimentos com castração intra-uterina de fetos de coelho, que permitiram a compreensão de alguns dos mecanismos da diferenciação sexual. Estes experimentos demonstraram que a castração de embriões de coelhos masculinos causava efeitos na organogênese gonadal, na dependência do momento da gestação em que ela era realizada.

Assim, quando a castração ocorria em fetos de 24 dias, a organogênese masculina se seguia, ocorrendo a diferenciação dos ductos de Wolff em ductos eferentes, epidídimo, ductos deferentes e vesícula seminal, além da inibição do desenvolvimento e regressão dos ductos de Müller. Na castração em fetos de 23 dias, os canais deferentes e as vesículas seminais não se diferenciavam, e quando ocorria antes de 21 dias, os ductos de Wolff regrediam totalmente, enquanto que os ductos de Müller persistiam e se diferenciavam em trompas, útero e vagina, permanecendo os órgãos genitais externos com aspecto feminino. A próstata interrompia

*Eliana Gabas Stuchi Perez
Gil Guerra Júnior*

*Grupo Interdisciplinar de Estudos da
Determinação e Diferenciação do Sexo
(GIEDDS) Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, UNICAMP.*

Recebido em 05/11/99

Revisado em 04/02/00

Aceito em 10/05/00

seu desenvolvimento ou estava completamente ausente se a castração fosse anterior a 19 dias de vida. A castração de fetos femininos não impedia que estes adquirissem aspecto feminino, não ocorrendo nenhum efeito sensível quando realizado com 23 ou 21 dias, sendo apenas observada uma diminuição no volume dos órgãos derivados dos ductos de Müller, quanto mais precoce ocorresse a castração.

Demonstrou-se, também, que os efeitos da castração em embriões de coelhos eram devidos à ausência da secreção testicular, pois com a implantação de cristais de andrógenos no feto masculino castrado observou-se completo desenvolvimento dos ductos de Wolff, sem inibição do desenvolvimento dos ductos de Müller. Os fetos femininos castrados, na presença de testículos implantados na cavidade vitelínica, se masculinizavam e os ductos de Müller regrediam.

Assim, demonstrou-se que a secreção testicular é a responsável pela diferença dos genitais entre os dois sexos, sendo a testosterona responsável pelo desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos (ductos de Wolff, seio urogenital, genitália externa), sem alterar o desenvolvimento ovariano no sexo feminino ou causar regressão dos derivados de Müller.

Em 1953, Jost (2) propôs, então, que outra substância testicular, isoladamente ou em conjunto com a testosterona, teria efeito inibitório sobre os ductos de Müller. Cada testículo seria responsável pela substância que vai inibir o ducto de Müller do seu lado, não sendo possível para um testículo inibir o ducto de Müller contralateral.

Picon (3) demonstrou uma substância que inibe os derivados de Müller *in vitro* com cultura de trato genital de fetos de ratos Wistar incubados com testículos fetais de várias idades. Obteve a persistência dos ductos de Müller na cultura com feto masculino de 14 dias sem testículo e a regressão dos ductos de Müller na cultura de feto feminino de 14 dias com testículo. Mostrou que a ação inibitória ocorre em tempo determinado do desenvolvimento do trato genital fetal, independentemente da idade do testículo associado à cultura, no entanto, após a data em que o trato genital sofre a influência gonadal, ocorre o desenvolvimento normal para o sexo com ou sem a presença de testículo.

Utilizando a mesma técnica de Picon, Josso (4) associou trato genital de feto de ratos de 14,5 dias de idade com tecido testicular, adrenal e ovariano, demonstrando que apenas o tecido testicular inibia os ductos de Müller. Associando a mesma cultura, tecido testicular humano de 31 fetos, 11 recém-nascidos e 10 indivíduos pós-natal em cultura orgânica, obteve completa inibição dos ductos de Müller com testículos de fetos de

até 28 semanas, com inibição variável após este período, e nenhuma inibição com testículos pós-natais (5).

Nesta mesma cultura orgânica, Josso (6) utilizou membranas semi-permeáveis para separação de trato genital de fetos de ratos e testículos observando que a substância com atividade de inibição nos ductos de Müller é uma macromolécula e não ultrapassa membrana permeável a moléculas de até 15.000 Da de peso molecular.

Josso (7) também demonstrou atividade anti-mülleriana em testículos de fetos de bezerros, comparável a outras espécies, conseguindo determinar que esta atividade está presente no tecido testicular como um todo. Utilizando técnica de microdissecção, mostrou que esta atividade ocorre nos túbulos seminíferos isolados, não encontrando nenhuma inibição dos ductos de Müller na cultura com tecido intersticial puro. Estes achados indicavam que a síntese de uma substância capaz de inibir os ductos de Müller, também chamada de substância inibidora de Müller ou hormônio anti-mülleriano (HAM) ocorreria nos túbulos seminíferos, provavelmente pelas células de Sertoli, células especializadas em síntese protéica, responsáveis por criar o meio físico e químico apropriado para a manutenção da espermatogênese nas suas diferentes fases (8).

A fonte de HAM limitada às células de Sertoli foi mostrada por Blanchard e col. (9), obtendo-se cultura de células de Sertoli pura, cuja atividade foi testada após sua transferência para superfície de membrana vitelínica com trato reprodutivo de fetos de ratos de 14,5 dias. Assim, o HAM pode ser considerado como marcador funcional das células de Sertoli fetais, coincidindo a atividade anti-mülleriana com o período inicial de diferenciação testicular que envolve a organização das células intersticiais e de Sertoli, anterior à esteroidogênese (10).

Donahoe e cols. (11), utilizando cultura semelhante com trato reprodutivo de feto de rato de 14,5 dias, estimaram a atividade do HAM, graduando a inibição dos derivados de Müller de I a V, em tecido testicular humano após o nascimento. A atividade do HAM era alta durante o 1º ano de vida, declinando durante o segundo ano de vida, e, então, desaparecia. Neste ensaio com cultura orgânica também observou-se que o grau de inibição dos ductos de Müller depende do tempo de exposição do trato genital de feto ao tecido testicular. Assim, a regressão somente se inicia após 12 horas de exposição, e somente é completada após 72 horas (12).

Até esta época os estudos bioquímicos indicavam que a molécula era uma grande proteína com peso molecular maior que 100.000 Da, características favoráveis ao efeito local que a substância tem na regressão dos ductos de Müller no homem.

Picard e cols. (13) evidenciaram a natureza glicoprotéica do HAM, através de separação das proteínas obtidas de cultura de testículos fetais de bezerro, por filtração em gel, gradiente de sedimentação e preparação com foco elétrico. Obtiveram atividade anti-mülleriana de uma substância glicoprotéica com peso molecular de 124.000 Da que se dissociava, por redução de pontes dissulfídicas, em sub-unidades de peso molecular de 72.000 Da.

Vigier e cols. (14), para produção de anticorpo monoclonal contra HAM bovino, utilizaram o HAM de bezerro parcialmente purificado para imunização em camundongos e fusão de seus esplenócitos com células de mieloma produzindo hibridomas, que eram selecionados através de precipitação de HAM e implantados em camundongos produzindo anticorpo monoclonal, removido por imunocomplexo, que bloqueava atividade antimülleriana de testículos de bezerro, mas não de ratos.

Finalmente, Picard e col. (15) conseguiram a purificação do HAM, visualizando a glicoproteína por imunocromatografia com anticorpo monoclonal contra HAM, conseguindo multímeros de 145.000 a 235.000 Da de peso molecular na ausência de condições de redução, e monômeros de 72.000 Da de peso molecular após redução de pontes dissulfídicas.

Com o seqüenciamento do HAM, definiu-se que se trata de uma glicoproteína de 140 Kd, constituída de dois dímeros de 70 Kd ligados com pontes dissulfídicas, cuja região carboxi-terminal (C-terminal) mostra homologia com a superfamília do *transforming growth factor beta* (TGF- β) (16). O gene humano do HAM de 2,75 Kb, dividido em 5 éxons, está localizado no braço curto do cromossomo 19, codifica uma proteína precursora de 560 aminoácidos com sítio de clivagem localizada no aminoácido 109 da porção C-terminal. A porção N-terminal é importante para a manutenção da atividade biológica da porção C-terminal do HAM, o que não é observado nos outros membros da família TGF- β , cuja atividade biológica se concentra na porção C-terminal (17-20).

A produção do HAM pelas células de Sertoli inicia-se no feto humano masculino a partir da 7ª semana com a diferenciação destas células, sendo possível a visualização do seu RNAm através de hibridização *in situ* a partir da 8ª semana. O RNAm é negativo no sexo feminino. É neste período que o HAM exerce sua ação na inibição dos ductos de Müller, período em que estes ductos são sensíveis ao HAM, sendo esta ação unilateral, já que o HAM se difunde célula a célula (8,21).

A ação do HAM somente é possível na presença do seu receptor. O receptor tipo II do HAM consiste em

uma proteína de 573 aminoácidos. Seu gene de 8,2 Kb, localizado no braço longo do cromossomo 12, está arranjado em 11 éxons (éxons 1-3 codificam o domínio extracelular, e o éxon 4, o segmento transmembrana) (22-24).

As células da granulosa ovariana também são capazes de produzir HAM, imunorreativo e bioativo, assim como as células de Sertoli, demonstrando mais uma homologia entre estas duas células (25). A diferença existente entre elas é que no início da diferenciação testicular, no período fetal, as células de Sertoli produzem grande quantidade de HAM (10), enquanto as células da granulosa exibem ligeira imunorreatividade apenas em folículos com desenvolvimento mais avançado no feto e produção de pequenas quantidade de HAM pelas células da granulosa de folículos de ovários maduros após o nascimento (26). Uma das funções do HAM nos folículos ovarianos pode ser a de inibir a meiose do oócito, como demonstrado em cultura de folículos de ratos com HAM (27).

Experimentos com ovário de feto de ovelhas mostraram que, quando expostos ao HAM, ocorre inibição da aromatase que converte testosterona em estradiol, sendo inclusive possível medir atividade antimülleriana em ensaio usando aromatase fetal. Uma consequência desta inibição é a reversão da diferenciação gonadal com aparecimento de estruturas semelhantes aos túbulos seminíferos primordiais, sugerindo um papel do HAM na diferenciação gonadal (28,29). Apesar do HAM ser praticamente indosável em mulheres normais, pode estar aumentado em mulheres com tumor ovariano de células granulosas ou em raro tumor ovariano de células de Sertoli, servindo como marcador sensível e específico usado para avaliação de cura e recorrência precoce do tumor (30,31). O HAM exibe alguma atividade citotóxica em tumores ovarianos epiteliais podendo ser também um agente quimioterápico em alguns tipos de tumor (32).

A monitorização do HAM no soro humano foi possível depois de três descrições de Elisa por três grupos diferentes (33-35).

Baker e cols. (33) utilizaram ensaio imunoenzimático tipo *sandwich* com anticorpos monoclonais contra HAM bovino (HAMb) (primeiro anticorpo) e anticorpos policlonais contra HAM recombinante humano (HAMrh) (segundo anticorpo), obtendo dosagem de HAM do soro de pacientes desde o nascimento até os 16 anos e observaram que o HAM aumenta do nascimento até 1 ano de idade, diminuindo até os 16 anos quando torna-se indetectável, sendo também indetectável no sexo feminino.

Hudson e cols. (34) descreveram um ensaio imunoenzimático (Elisa) em fase sólida tipo *sandwich*

com anticorpos anti-HAMrh monoclonais aderidos ao tubo que reagem com soro, e, em seguida, com anticorpos anti-HAMrh, produzidos em coelhos, ligados a anticorpos anti-coelho conjugados com peroxidase. Neste ensaio observou-se aumento de HAM do nascimento até 1 ano de idade (entre 10-70ng/mL), queda menos brusca até os 5 anos de idade, e mais acentuada a partir dos 10 anos de idade, no sexo masculino. No sexo feminino foi indetectável, com discreto aumento na segunda década de vida até valores basais, comparáveis ao do sexo masculino após a puberdade (~ 2ng/mL), apenas uma mulher com tumor ovariano de células de Sertoli apresentou HAM extremamente elevado.

Josso e cols. (35) utilizaram ELISA para detecção de HAM baseado em anticorpo policlonal contra HAMb purificado, obtendo curva de calibração com HAMrh. A dosagem de HAM foi obtida em 117 controles masculinos a partir do nascimento até idade adulta: observando níveis elevados até 2 anos de idade, com queda progressiva até valores residuais após a puberdade, permanecendo indetectável na idade adulta, com exceção de um indivíduo de 22 anos com HAM de 2,5ng/mL. No sexo feminino HAM foi indetectável, com exceção de uma mulher aparentemente saudável com HAM de 5,2ng/mL.

Um estudo com dosagem de HAM em cordão umbilical de recém-nascidos mostrou concentrações relativamente altas entre 25 e 31 semanas de gestação (média de $86,4 \pm 36,1$ ng/mL), e, então, queda a partir de 32 semanas até termo (média $24,2 \pm 14,0$ ng/mL) (36). Uma das funções sugeridas para o HAM no 2º e 3º trimestres de gestação é a promoção da descida testicular, na sua fase abdominal (com início entre 8 e 15 semanas de gestação) até a região inguinal (com início entre 25 e 28 semanas), sugerida pelas associações entre atividade antimülleriana diminuída e criptorquidismo (11) e síndromes de persistência de ductos de Müller e criptorquidismo (21). Mas uma ação apenas mecânica das estruturas de Müller bloqueando a descida poderia existir, já que outros trabalhos mostram HAM normal em crianças com criptorquidismo (21,37-39). Outro efeito possível do HAM, demonstrado *in vitro*, é a inibição da formação de fosfatidilcolina na maturação pulmonar, sendo a imaturidade pulmonar mais freqüente entre recém-nascidos do sexo masculino que feminino (40).

Os valores séricos do HAM parecem ser independentes de gonadotrofinas, variando inversamente com os valores de testosterona, o que pode ser observado em pacientes com puberdade atrasada que apresentam valores maiores de HAM que os controles para

a idade, e crianças com puberdade precoce que apresentam valores mais baixos que os controles (41). Um grande declínio de HAM é observado quando os valores séricos de testosterona se elevam acima de 1,9ng/mL (correspondendo com estágio puberal P3), independentemente do nível de FSH, já que em puberdade precoce dependente ou independente de gonadotrofinas a evolução do HAM é a mesma.

Esta relação entre o HAM e a testosterona é confirmada nos casos de síndrome de insensibilidade androgênica, nos quais observam-se valores elevados de testosterona e gonadotrofinas no período da puberdade com HAM extremamente elevado nas formas completas da síndrome. Nas formas parciais os valores elevados de testosterona inibem parcialmente o HAM, permanecendo porém ainda altos quando comparados aos controles da mesma idade (42).

No período pré-natal, quando a testosterona e o HAM estão elevados, os andrógenos exercem pouca influência na maturação de túbulos seminíferos, não ocorrendo a formação de *tight junctions* e invaginações das células de Sertoli e a espermatogênese não progride além do estágio de espermatogônia. A constatação de baixa expressão dos receptores de andrógenos nas células de Sertoli poderia ser a explicação para o HAM e a testosterona elevados (43). Mesmo assim, a testosterona ainda tem efeito inibitório sobre HAM nos primeiros dias de vida, já que neonatos com defeitos de síntese de andrógenos (aplasia de Leydig ou deficiência de enzima da esteroidogênese) ou com insensibilidade androgênica apresentam valores séricos de HAM mais elevados (41,44).

Após 1 ano de idade, apesar da testosterona diminuir, a concentração de HAM também se reduz, mesmo nos casos de defeito de síntese ou ação dos andrógenos. Nestas situações o HAM volta a aumentar na puberdade. No tratamento da puberdade precoce ocorre diminuição de testosterona com aumento de HAM, de 3 a 6 meses após a diminuição de testosterona, sugerindo um mecanismo indireto da testosterona sobre as células de Sertoli na regulação da secreção de HAM (41). Talvez o outro fator aí envolvido seja o FSH, mas até agora não foram encontrados elementos de resposta da célula de Sertoli ao FSH. Poderia ainda existir um fator parácrino de regulação, já que em algum momento do período neonatal a expressão do receptor de andrógenos ainda está ausente nas células de Sertoli, mas presente nas células peritubulares. É também possível que exista uma regulação direta da própria célula germinativa (8,43-46).

Anteriormente aos ensaios de HAM, a dosagem de testosterona sérica era a única maneira de se verificar a presença de testículo em crianças com criptorquidismo

ou a função testicular, no caso, das células de Leydig, em crianças com ambigüidade genital, sendo necessário muitas vezes o estímulo prolongado com gonadotrofina coriônica humana (hCG), especialmente após os primeiros 6 a 9 meses de vida até o início da puberdade (47). Atualmente temos a opção de avaliar as células de Sertoli com a dosagem de HAM e inibina B.

A inibina B também pode ser dosada em mulheres, com valores séricos mais elevados na fase folicular (48). No homem, apresenta elevação do nascimento até o 1º ano de vida, com queda progressiva no 2º ano, permanecendo em valores baixos até a puberdade quando torna a se elevar, mantendo pico entre 20 e 29 anos, diferentemente do HAM que diminui com a puberdade. Tem relação inversa com FSH, principalmente após a puberdade, período em que exerce inibição sobre FSH (49). Um estudo com crianças criptorquídicas de até 4 anos de idade mostrou valores basais elevados de FSH e baixos de inibina em relação aos controles, sendo que, após os estímulos com hCG e hMG, as crianças criptorquídicas apresentavam relação inibina/FSH mais baixa que os controles (50).

A presença de HAM detectável sugere existência de tecido testicular, porém o oposto não necessariamente é verdadeiro. Os resultados negativos devem ser interpretados com precaução pois podem ocorrer variações individuais, mostrando-se, ocasionalmente, negativos em meninos normais após 2 anos de idade e em disgenesias testiculares severas (51). Assim, pode-se diferenciar pseudo-hermafroditismo feminino de hermafroditismo verdadeiro em indivíduos 46,XX com a dosagem sérica de HAM. Os valores de HAM aparecem elevados nos casos de insensibilidade androgênica ou deficiência de síntese de testosterona, e, como estão diminuídos nos casos de disgenesia gonadal, são de grande utilidade na investigação diagnóstica dos casos

de pseudo-hermafroditismo masculino (51-56).

Nos casos de síndrome de persistência dos derivados de Müller, caracterizada freqüentemente por hérnia inguinal contendo útero, trompas e testículo criptorquídico em pacientes do sexo masculino com genitália externa adequadamente virilizada, a dosagem do HAM é extremamente útil, guiando a investigação molecular. Podemos observar que metade dos casos tem níveis de HAM normais ou elevados e outra metade tem níveis muito baixos ou indetectáveis. A análise molecular mostrou presença de mutação no gene do receptor tipo II do HAM no primeiro grupo (chamado HAM-positivo) e no segundo grupo foi observado mutação no gene do HAM (chamado HAM-negativo) (24). Cerca de 25% dos casos HAM-positivos apresentam uma deleção de 27 pares de base no éxon 10 do receptor tipo II do HAM (57).

Rey e cols. (58) demonstraram recentemente uma grande utilidade da dosagem do HAM em pacientes com intersexo em um trabalho onde foram analisados 107 pacientes. Nos casos com diferenciação testicular anormal observou-se HAM indetectável nos casos de disgenesia gonadal pura, porém nos casos de disgenesia gonadal parcial, disgenesia gonadal assimétrica ou hermafroditismo verdadeiro ocorreu grande variabilidade dos valores séricos de HAM, desde muito baixos nos casos de disgenesia testicular grave coexistindo com remanescentes müllerianos presentes, até valores quase normais nos casos de disgenesias menos graves, sem persistência dos ductos de Müller. Já nos casos de diminuição da secreção de testosterona ou da sua ação, observou-se valores aumentados de HAM no primeiro ano de vida nos casos de aplasia de Leydig, defeitos da esteroidogênese, ou insensibilidade androgênica. Na infância (1-9 anos de idade) os valores de HAM retornam a valores normais, mas ainda assim

Tabela 1. Valores de hormônio anti-Mülleriano sérico (HAM) em homens normais agrupados por idade e desenvolvimento puberal.

Idade	n	HAM (pmol/L)	
		Média ± 1 DP	Varição
< 15 dias	6	229 ± 59	76 - 381
15 dias -1 ano	22	465 ± 93	251 - 679
1,01 - 4 anos	17	499 ± 66	360 - 638
4,01 - 7 anos	16	438 ± 61	309 - 566
7,01 - 9 anos	14	336 ± 47	234 - 438
> 9 anos ¹			
estádio I	22	249 ± 26	194 - 304
estádio II	25	159 ± 25	107 - 211
Estádio III	8	79 ± 28	12 - 145
Estádio IV-V	8	48 ± 14	14 - 81
Adulto	21	30 ± 4	22 - 38

¹ desenvolvimento puberal de acordo com Marshall & Tanner (59).

mais elevados que os valores encontrados na disgenesia gonadal. Na puberdade os valores de HAM se elevam nos casos com aplasia de Leydig e insensibilidade total aos andrógenos. Os casos de insensibilidade parcial apresentam níveis significativamente mais altos que os controles. Não houve nenhum caso de deficiência de 5 α -redutase tipo 2 neste trabalho.

Os indivíduos portadores de deficiência de 5 α -redutase tipo 2 caracterizam-se por ambigüidade genital em pacientes com cariótipo 46,XY, com valores séricos normais ou pouco elevados de testosterona e gonadotrofinas. A testosterona (T) precisa ser metabolizada a dihidrotestosterona (DHT), pela enzima 5 α -redutase tipo 2 para diferenciação normal da genitália externa masculina. Quando o gene que codifica esta enzima está alterado, o feto é incompletamente virilizado. Na puberdade, maior quantidade de testosterona é transformada em DHT pela isoforma tipo 1 da 5 α -redutase expressa nos tecidos não-genitais (45,60). O diagnóstico desta doença é às vezes difícil, não podendo ser descartada somente com a

falta de uma relação T/DHT elevada.

Realizamos recentemente um estudo no qual foram avaliadas 24 crianças com ambigüidade genital e cariótipo 46,XY, com dosagem sérica do HAM realizada no Laboratório da Dra. Nathalie Josso sob os cuidados do Dr. Rodolfo A. Rey na *École Normale Supérieure* em Montrouge (França), com técnica e resultados semelhantes aos de Rey e cols. (58). A metodologia aplicada foi a técnica de Elisa utilizada no Laboratório, que consiste naquela descrita em 1990, utilizando anticorpos policlonais obtidos por HAM bovino purificado (35), que foi modificada em 1992, quando passou-se a utilizar anticorpos monoclonais, obtidos diretamente de HAM humano recombinante em fase sólida e segundo anticorpo policlonal anti-HAM humano recombinante obtido de coelho, com visualização da reação com anticorpo anti-coelho (IgG de cabra) marcado com fosfatase (61).

No entanto, neste estudo observamos que nos 4 casos de deficiência de 5 α -redutase tipo 2 os níveis do HAM foram baixos ou normais tendendo a baixos (62), o que não

Tabela 2. Avaliação hormonal de 24 pacientes com genitália ambígua e cariótipo XY (Perez, 1999).

	Idade ¹	LH (mUI/mL)	FSH (mUI/mL)	TT (ng/mL)	DHT (ng/mL)	HAM (pMol/L)	Diagnóstico
1	10m	0,7	4,7	AE: <0,1	AE: 0,02	91	DG
2	1a 8m	0,6	4,5	AE: <0,1	AE: 0,02	70	DG
3	3a 9m	0,5	3,5	AE: <0,1	AE: 0,02	186	DG
4	5a 4m	0,7	3,9	AE: <0,1	AE: 0,02	22	DG
5	5a 8m	0,4	2,4	AE: <0,1	AE: 0,02	25	DG
6	5a 10m	0,9	3,3	AE: <0,1	AE: 0,02	72	DG
7	10a GIPI	0,6	4,7	AE: <0,1	AE: 0,02	52	DG
8	1a 9m	0,8	5,0	AE: 0,7	AE: 0,04	196	DG-SDD
9	3a 4m	2,3	0,7	AE: 0,3	AE: 0,02	436	D3 β HSD
10	5a 3m	1,9	0,8	AE: 0,2	AE: 0,02	511	D3 β HSD
11	7a GIPIII	4,2	0,5	AE: 0,7	AE: 0,05	503	D3 β HSD
12	6m	8,6	4,1	B: 1,8	B: 0,05	468	IPA
13	1a 1m	4,2	1,5	AE: 1,8	AE: 0,05	538	IPA
14	3a 6m	2,8	0,4	AE: 2,2	AE: 0,06	439	IPA
15	8a 7m	3,5	1,2	AE: 1,5	AE: 0,04	472	IPA
16	13a MIIP1	7,9	3,7	B: 5,5	B: 0,15	996	ICA
17	0,5m	1,9	1,5	B: 1,9	B: 0,02	139	DSRD5A2
18	5m	1,1	0,5	B: 2,2	B: 0,03	292	DSRD5A2
19	10m	3,3	3,9	AE: 2,6	AE: 0,04	64	DSRD5A2
20	16a GIPIII	4,3	4,8	B: 4,9	B: 0,06	16	DSRD5A2
21	4a 1m	0,7	0,4	AE: 1,5	AE: 0,09	464	idiopático
22	4a 2m	0,5	0,3	AE: 1,5	AE: 0,09	428	idiopático
23	6a 1m	0,8	0,1	AE: 1,6	AE: 0,09	353	idiopático
24	7a 4m	0,7	0,8	AE: 1,5	AE: 0,08	382	idiopático

¹ em meses (m) e anos (a) e estádios de desenvolvimento de mama (M), genital (G) e pêlos pubanos (P) de acordo com Marshall & Tanner (59).

TT = testosterona total, DHT = dihidrotestosterona, B = basal, AE = após estímulo com hCG DG = disgenesia gonadal, SDD = síndrome de Denys-Drash; D3 β HSD = deficiência de 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase, IPA = insensibilidade parcial aos andrógenos, ICA = insensibilidade completa aos andrógenos, DSRD5A2 = deficiência de 5 α -redutase tipo 2.

Valores normais: LH basal: pré-puberal: 0,6 - 1,0, puberal: 0,8 - 8,7;

FSH basal: pré-puberal: 0,1 - 1,4, puberal: 0,6 - 4,9;

Testosterona total basal: pré-puberal: < 0,1 - 0,7, homem adulto: 2,2 - 18,0

Testosterona total após estímulo com hCG: normal \geq 1,5ng/mL.

havia sido demonstrado em nenhum estudo anterior.

Neste estudo os 4 pacientes com deficiência da 5 α -redutase 2 apresentaram valores séricos de gonadotrofinas e testosterona normais, não sendo possível a realização do diagnóstico diferencial com os casos de insensibilidade androgênica. Este último grupo possuía ainda a relação T/DHT pouco acima do normal, dificultando ainda mais essa diferenciação diagnóstica. Nos pacientes com deficiência da 5 α -redutase 2, diferentemente dos casos de insensibilidade androgênica, observamos que o HAM não está elevado, indicando que a testosterona não necessita ser metabolizada em DHT para modular a sua produção pelas células de Sertoli (62).

Apesar do pequeno número de pacientes, estes achados sugerem que a determinação do HAM pode ser útil para distinguir entre insensibilidade androgênica e deficiência de 5 α -redutase tipo 2 nos pacientes com ambigüidade genital que apresentam valores normais de testosterona.

Portanto, podemos concluir que o uso combinado de um marcador sérico da função tubular testicular, como o HAM, com as determinações séricas de gonadotrofinas e testosterona amplia a possibilidade diagnóstica etiológica nos estados intersexuais com cariótipo 46,XY, confirmando a previsão (63) que a determinação sérica do HAM pode ser útil em endocrinologia pediátrica, agora que se torna amplamente disponível com a comercialização de kit diagnóstico específico.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração do Dr. Rodolfo Rey, *Unité de Recherches sur l'Endocrinologie du Développement* - INSERM - *École Normale Supérieure* - Montrouge - France, na realização das determinações séricas de HAM e nas sugestões deste trabalho, bem como a todos os demais membros do Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo (GIEDDS) - UNICAMP.

REFERÊNCIAS

1. Jost A. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 1947;36:271-315.
2. Jost A. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog Horm Res* 1953;8:379-418.
3. Picon R. Action du testicule foetal sur le développement in vitro des canaux de Müller chez le rat. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 1969;58:1-19.
4. Josso N. Interspecific character of the Müllerian-inhibiting substance: action of the human fetal testis, ovary and adrenal on the fetal rat Müllerian duct in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;32:404-9.
5. Josso N. Evolution of the Müllerian-inhibiting activity of the human testis. *Biol Neon* 1972;20:368-79.
6. Josso N. Permeability of membranes to the Müllerian-inhibiting substance synthesized by the human fetal testis in vitro: a clue to its biochemical nature. *J Clin Endoc* 1972;34:265-70.
7. Josso N. In vitro synthesis of Müllerian inhibiting substance hormone by seminiferous tubules isolated from the calf fetal testis. *Endocrinology* 1973;93:829-34.
8. Jégou B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int Rev Cytol* 1993;147:25-96.
9. Blanchard MG, Josso N. Source of the anti-Müllerian hormone synthesized by the fetal testis: Müllerian-inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in tissue culture. *Pediatr Res* 1974;8:968-71.
10. Tran D, Meusy-Dessolle N, Josso N. Anti-Müllerian hormone is a marker of foetal Sertoli cells. *Nature* 1977;269:411-2.
11. Donahoe PK, Ito Y, Morikawa Y, Hendren WH. Müllerian inhibiting substance in human testes after birth. *J Pediatr Surg* 1997;12:323-30.
12. Donahoe PK, Ito Y, Hendren WH. A graded organ culture assay for the detection of Müllerian inhibiting substance. *J Surg Res* 1977;23:141-3.
13. Picard JY, Tran D, Josso N. Biosynthesis of labelled anti-Müllerian hormone by fetal testes: evidence for the glycoprotein nature of the hormone and for its disulfide-bonded structure. *Mol Cell Endocrinol* 1978;12:17-30.
14. Vigier B, Picard JY, Josso N. A monoclonal antibody against bovine anti-Müllerian hormone. *Endocrinology* 1982;110:131-7.
15. Picard JY, Josso N. Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol Cell Endocrinol* 1984;34:23-39.
16. Pepinsky BR, Sinclair LK, Chow EP, Mattaliano RJ, Mangano TF, Donahoe PK, et al. Proteolytic processing of Müllerian inhibiting substance produces a transforming growth factor- β -like fragment. *J Biol Chem* 1988;263:18.961-4.
17. Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 1986;45:685-98.
18. Picard JY, Benarous R, Guerrier D, Josso N, Nahn A. Cloning and expression of cDNA for anti-Müllerian hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5464-8.
19. Cohen-Hauguenauer O, Picard JY, Mattéi MG, Serero S, Nguyen VC, De Tand MF, et al. Mapping of the gene for anti-Müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet* 1987;44:2-6.
20. Wilson CA, Di Clemente N, Ehrenfels C, Pepinsky RB, Josso N, Vigier B, et al. Müllerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activi-

- ty, a novel finding within the transforming growth factor- β superfamily. **Mol Endocrinol** 1993;7:247-57.
21. Josso N, Picard JY, Imbeaud S, Carré-Eusèbe D, Zeller J, Aamsbaum C. The persistent Müllerian duct syndrome: a rare cause of cryptorchidism. **Eur J Pediatr** 1993;152 (Suppl 2):S76-8.
 22. Di Clemente N, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R, et al. Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. **Mol Endocrinol** 1994;8:1006-20.
 23. Imbeaud S, Faure E, Lamarre I, Mattéi MG, Di Clemente N, Tizard R, et al. Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor. **Nat Genet** 1995;11:382-8.
 24. Josso N, Picard JY, Imbeaud S, Di Clemente N, Rey R. Clinical aspects and molecular genetics of the persistent Müllerian duct syndrome. **Clin Endocrinol** 1997;47:137-44.
 25. Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. **Endocrinology** 1984;114:1315-20.
 26. Bézard J, Vigier B, Tran D, Mauléon P, Josso N. Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. **J Reprod Fert** 1987;80:509-16.
 27. Takahashi M, Koide SS, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance as oocyte meiosis inhibitor. **Mol Cell Endocrinol** 1986;47:225-34.
 28. Vigier B, Forest MG, Eychenne B, Bézard J, Garrigou O, Robel P. Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. **Proc Natl Acad Sci USA** 1989;86:3684-8.
 29. Di Clemente N, Ghaffari S, Pepinsky RB, Pieau C, Josso N, Cate RL, et al. A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-Müllerian hormone: the fetal ovary aromatase assay. **Development** 1992;114:721-7.
 30. Gustafson ML, Lee MM, Scully RE, Moncure AC, Hirakawa T, Goodman A, et al. Müllerian inhibiting substance as a marker for ovaries sex-cord tumor. **N Engl J Med** 1992;326:466-71.
 31. Rey RA, Lhommé C, Marcellac I, Lahlou N, Duvillard P, Josso N, et al. Antimüllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumors of ovary: Comparative study with serum α -inhibin and estradiol. **Am J Obstet Gynecol** 1996;174:958-65.
 32. Donahoe PK, Swann DA, Hayashi A, Sullivan MD. Müllerian duct regression in the embryo correlated with cytotoxic activity against human ovarian cancer. **Science** 1979;205:913-5.
 33. Baker ML, Metcalfe AS, Hutson JM. Serum levels of Müllerian inhibiting substance in boys from birth to 18 years, as determined by enzyme immunoassay. **J Clin Endocrinol Metab** 1990;70:11-5.
 34. Hudson PL, Douglas I, Donahoe PK, Cate RL, Epstein J, Pepinsky RB, et al. An immunoassay to detect human Müllerian inhibiting substance in males and females during normal development. **J Clin Endocrinol Metab** 1990;70:16-22.
 35. Josso N, Legeai L, Forest MG, Chaussain JL, Brautner R. An enzyme linked immunoassay for anti-Müllerian hormone: a new tool for the evaluation of testicular function in infants and children. **J Clin Endocrinol Metab** 1990;70:23-7.
 36. Schwindt B, Doyle LW, Hutson JM. Serum levels of Müllerian inhibiting substance in preterm and term male neonates. **J Urol** 1997;158:610-2.
 37. Josso N, Fékété C, Cachin O, Nezelof C, Rappaport R. Persistence of Müllerian pseudohermaphroditism, and its relationship to cryptorchidism. **Clin Endocrinol** 1983;19:247-58.
 38. Hutson JM, Donahoe PK. The hormonal control of testicular descent. **Endoc Ver** 1986;7:270-83.
 39. Miller WL. Immunoassays for human Müllerian inhibitory factor (MIF): new insights into the physiology of MIF. **J Clin Endocrinol Metab** 1990;70:8-10.
 40. Lee MM, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. **Endocr Rev** 1993;14:152-64.
 41. Rey RA, Lordereau-Richard I, Carel JC, Barbet P, Cate RL, Roger M, et al. Anti-Müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. **J Clin Endocrinol Metab** 1993;77:1220-6.
 42. Rey RA, Mebarki F, Forest MG, Mowazowics I, Cate RL, Morel Y, et al. Anti-Müllerian hormone in children with androgen insensitivity. **J Clin Endocrinol Metab** 1994;79:960-4.
 43. Majdic G, Millar MR, Saunders PTK. Immunolocalisation of androgen receptor to interstitial cells in fetal rat testes and to mesenchymal and epithelial cell of associated ducts. **J Endocrinol** 1995;147:285-93.
 44. Rey RA, Josso N. Regulation of anti-Müllerian hormone secretion. **Eur J Endocrinol** 1996;135:144-52.
 45. Lindzey J, Kumar MV, Grossman M, Young C, Tindall DJ. Molecular mechanisms of androgen action. **Vit Horm** 1994;49:383-432.
 46. Shan LX, Zhu LJ, Bardin CW, Hardy MP. Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig cell and Sertoli cells by *in situ* hybridization. **Endocrinology** 1995;136:3856-62.
 47. Grant DB, Laurance BM, Atherden SM, Ryness J. HCG stimulation test in children with abnormal sexual development. **Arch Dis Child** 1976;51:596-601.
 48. Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M. Measurement of dimeric inhibin-B throughout the human menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab** 1996;81:1401-5.
 49. Byrd W, Bennett MJ, Carr BC, Dong Y, Wlans F, Rainey W. Regulation of biological active dimeric inhibin A and B from infancy to adulthood in male. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83:2849-54.
 50. Longui CA, Arnhold IJP, Mendonça BB, D'Ostvaldo AF, Bloise W. Serum inhibin levels before and after gonadotropin stimulation in cryptorchid boys under age 4 years. **J Pediatr Endocrinol Metab** 1998;11:687-92.
 51. Josso N, Boussin L, Kinbelmann B, Nohoul-Fékété C, Picard JY. Anti-Müllerian hormone and intersex states. **Trends Endocrinol Metab** 1991;2:227-33.
 52. Harbisson MD, Magid ML, Josso N, Mininberg DT, New MI.

- Anti-Müllerian hormone in three intersex conditions. **Ann Génét** 1991;3-4:226-32.
53. Josso N. Anti-Müllerian hormone and Sertoli cell function. **Horm Res** 1992;38(Suppl 2):72-6.
54. Gustafson ML, Lee MM, Asmundson L, Maclaughlin DT, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance in the diagnosis and management of intersex and gonadal abnormalities. **J Pediatr Surg** 1993;28:439-44.
55. Josso N, Rey R. L'hormone anti-Müllérienne en clinique humaine. **Contracept Fert Sex** 1994;22:661-3.
56. Josso N. Paediatric applications of anti-Müllerian hormone research. **Horm Res** 1995;43:243-8.
57. Imbeaud S, Belville C, Messika-Zeltoun L, Rey R, Clemente N, Josso N, et al. A 27 base-pair deletion of the anti-Müllerian type II receptor gene is the most common cause of the persistent Müllerian duct syndrome. **Hum Mol Genet** 1996;5:1269-77.
58. Rey RA, Belville C, Nihoul-Fékété C, Michel-Calemard L, Forest MG, Lahlou N, et al. Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum antimüllerian hormone measurement. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:627-31.
59. Marshall WA, Tanner JM. Variation in pattern of pubertal changes in boys. **Arch Dis Child** 1969;44:291-303.
60. Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey ML, McConnell JD, Russel DW. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 α -reductase isozyme expression. **J Clin Invest** 1993;92:903-10.
61. Carré-Eusèbe D, Imbeaud S, Harbison M, New MI, Josso N, Picard JY. Variants of the anti-Müllerian hormone gene in a compound heterozygote with the persistent Müllerian duct syndrome and his family. **Hum Genet** 1992;90:389-94.
62. Perez EGS. Avaliação funcional das células de Leydig e de Sertoli em 24 casos de ambigüidade genital com cariótipo 46,XY. Campinas, 1999 (Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas).
63. Forest MG. Serum Müllerian inhibiting substance assay - a new diagnostic test for disorders of gonadal development. **N Engl J Med** 1997;336:1519-21.

Endereço para correspondência:

Gil Guerra Júnior
Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
Departamento de Pediatria - FCM - UNICAMP
Caixa Postal 6111
13.083-970 Campinas, SP
Fone/Fax: (19) 788-8260
e.mail: gilguer@bestway.com.br