

Insensibilidade Completa aos Andrógenos em Pacientes Brasileiras Causada Pela Mutação P766A no Gene do Receptor Androgênico

Rafaela V. Corrêa
João C. Wey
Ana E.C. Billerbeck
Karla F.S. Melo
Berenice B. Mendonça
Marta V. Wey
Ivo J.P. Arnhold

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento (RVC, AECB, KFSM, BBM & IJPA), Disciplina de Endocrinologia, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM-42, Universidade de São Paulo, HCFMUSP, São Paulo, SP; e Faculdade de Medicina da PUC-SP (JCW & MVW), Sorocaba, SP.

Recebido em 05/11/04
Aceito em 17/11/04

RESUMO

A síndrome de insensibilidade aos andrógenos é uma doença rara ligada ao X, causada por mutações no gene do receptor androgênico (AR), associada a uma variedade de fenótipos em indivíduos 46,XY. Avaliamos duas irmãs gêmeas de 23 anos com sexo social feminino encaminhadas por amenorréia primária, e que apresentavam gônadas palpáveis na região inguinal e cariótipo 46,XY. A ultra-sonografia pélvica não evidenciou útero. As dosagens basais revelaram concentrações elevadas de LH (35 e 42U/L), normais de FSH (7,9 e 7,8U/L) e altas de testosterona (1330 e 1660ng/dl). O estudo molecular identificou uma rara mutação *missense* no exon 5 do gene do AR com a troca de uma prolina por uma alanina na posição 766 da proteína. O aminoácido prolina 766 do AR é altamente conservado entre as espécies e situa-se em região correspondente ao domínio de ligação ao andrógeno. (Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/1:98-102)

Descritores: CAIS (CAIS - *Complete form of Androgen Insensitivity Syndrome*); Genitália ambígua; Pseudo-hermafroditismo masculino (PHM); Receptor androgênico (AR - *Androgen Receptor*); Síndrome de insensibilidade aos andrógenos (AIS - *Androgen Insensitivity Syndrome*)

ABSTRACT

Complete Form of Androgen Insensitivity Syndrome in Brazilian Patients Due to P766A Mutation in the Androgen Receptor.

Androgen insensitivity syndrome (AIS) is a rare X-linked disorder, caused by mutations in the androgen receptor gene (AR), associated with a variety of phenotypes in 46,XY individuals. We studied two 23 year-old twin-sisters with female social sex referred due to primary amenorrhea, who exhibited bilateral palpable gonads in the inguinal region and a 46,XY karyotype. The uterus was absent in pelvic sonograms. Basal LH levels were elevated (35 and 42U/L), with normal FSH (7.9 and 7.8U/L) and high testosterone levels (1330 and 1660ng/dl). The molecular analysis identified a missense mutation in exon 5 of AR gene that changed a proline to an alanine at position 766 of the protein. Proline 766 is a highly conserved amino acid in the AR of several species and is located in the androgen binding domain. (Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/1:98-102)

Keywords: Androgen insensitivity syndrome (AIS); Androgen receptor (AR); Ambiguous genitalia; CAIS (Complete form of Androgen Insensitivity Syndrome); Male pseudohermaphroditism (MPH)

OS ANDRÓGENOS SÃO IMPORTANTES HORMÔNIOS esteróides com funções específicas na expressão do fenótipo masculino. Estes hormônios têm participação fundamental no processo de diferenciação sexual masculina, além do seu papel no desenvolvimento e manutenção dos caracteres sexuais secundários, e durante a iniciação e manutenção da espermatogênese. Os principais andrógenos circulantes em mamíferos são a testosterona e seu

derivado 5 α reduzido, a dihidrotestosterona, que atuam no mesmo receptor. A ação dos andrógenos é mediada pelo receptor androgênico (AR), que é codificado por um gene localizado no braço longo do cromossomo X (banda Xq11-12).

O cDNA do AR humano foi clonado em 1988, sendo o gene do AR composto por 8 exons que codificam uma proteína de 110KDa (1). O AR é membro da superfamília de receptores nucleares e apresenta a estrutura clássica dos demais receptores de esteróides, composta por 4 domínios distintos: um domínio N-terminal regulador da transcrição, um domínio de ligação ao DNA (DBD) com os clássicos dedos de zinco proximal e distal, uma região “dobradiça” e um domínio de ligação ao andrógeno (LBD) (revisado na ref. 2). Na presença do andrógeno, o AR se liga com regiões específicas do DNA formando homodímeros, recrutando coativadores e ativando a transcrição gênica.

Distúrbios na função do AR resultam em diferentes afecções: síndrome de insensibilidade aos andrógenos (AIS); atrofia muscular bulbar espinhal (SBMA – *Spinal and Bulbar Muscular Atrophy* ou Doença de Kennedy) e câncer de próstata. AIS é uma condição rara com uma incidência estimada entre 1:40.800 e 1:99.000, com herança recessiva ligada ao cromossomo X. Esta síndrome é causada por mutações no gene do AR e apresenta um amplo espectro de fenótipos, variando desde o fenótipo feminino (forma completa – CAIS) a fenótipos com graus variáveis de virilização (forma parcial – PAIS), ou mesmo apenas esterilidade (revisado nas refs. 3,4).

A forma completa de insensibilidade aos andrógenos (CAIS) foi descrita inicialmente como *síndrome dos testículos feminilizantes* e é caracterizada pela presença de genitália externa feminina, vagina ausente ou curta terminando em fundo cego, genitália interna com ausência dos derivados dos dutos de Wolff e de Müller, desenvolvimento de ginecomastia na puberdade e ausência de pêlos pubianos ou axilares. Os testículos estão localizados no abdome ou canal inguinal, ou menos freqüentemente nos grandes lábios. Na histologia, os testículos apresentam características de testículos criptórcicos, sem espermatogênese. CAIS é considerada em algumas casuísticas a terceira causa mais freqüente de amenorréia primária.

Na forma parcial de insensibilidade aos andrógenos (PAIS) encontram-se diversos fenótipos, desde indivíduos com aparência predominantemente feminina (genitália externa feminina com discreta clitoromegalia, ou fusão posterior de pequenos lábios, desenvolvimento discreto de pêlos pubianos na puberdade) a indivíduos com genitália ambígua e fenótipo

predominantemente masculino com graus variáveis de virilização com micropênis, hipospádia perineal, ou criptorquismo (síndrome de Reifenstein). Os derivados dos dutos de Wolff podem se desenvolver parcialmente, e os de Müller estão ausentes. O desenvolvimento de ginecomastia na puberdade é comum, com presença de pêlos axilares e pubianos e diminuição dos pêlos faciais e torácicos. Os testículos estão localizados no canal inguinal ou nos grandes lábios, ou menos freqüentemente no abdome.

Até o momento mais de 300 mutações responsáveis pela AIS já foram descritas no gene do AR e estão compiladas no banco de dados do AR (<http://ww2.mcgill.ca/androgendb/>) (5). São de diversos tipos: mutações de ponto resultando em substituições de aminoácidos ou códons de terminação prematuros, os chamados *stop codons* (forma mais comum, encontrada em 81% dos casos), inserções ou deleções de nucleotídeos ocasionando uma alteração no quadro de leitura (*frameshift*) e terminação prematura da proteína (7%), deleções gênicas parciais (7%) ou completas (1%) e mutações intrônicas (2%) (5).

A correlação genótipo-fenótipo é bem estabelecida na ocorrência de grandes deleções ou terminações prematuras da proteína, ocasionando um comprometimento grave da função do AR e causando a forma completa de AIS. Nas famílias com CAIS geralmente há concordância do genótipo com o fenótipo, e as mesmas mutações ocasionam o mesmo fenótipo. Nas famílias com PAIS esta relação não é encontrada tão freqüentemente, e em algumas famílias a presença da mesma mutação pode ocasionar diferentes fenótipos. Este achado pode estar relacionado a alterações individuais no metabolismo da testosterona ou em fatores transcricionais que interagem com o AR. Nas substituições de aminoácidos nem sempre tal correlação é possível, e existe uma ampla variação do fenótipo nestes casos. Cerca de 80% das trocas de aminoácidos ocorre na região de ligação aos andrógenos (LBD) e os demais 20% no domínio de ligação ao DNA (DBD) (4,6,7).

Neste trabalho são descritas duas irmãs gêmeas monozigóticas com quadro clínico, laboratorial e molecular compatível com CAIS.

PACIENTES E MÉTODOS

Foram avaliadas duas pacientes com forma completa de insensibilidade aos andrógenos. As pacientes 1 (III-9, figura 1) e 2 (III-10) são gêmeas monozigóticas de 20 anos que foram encaminhadas ao Ambulatório de Ginecologia do Hospital de Sorocaba para investi-

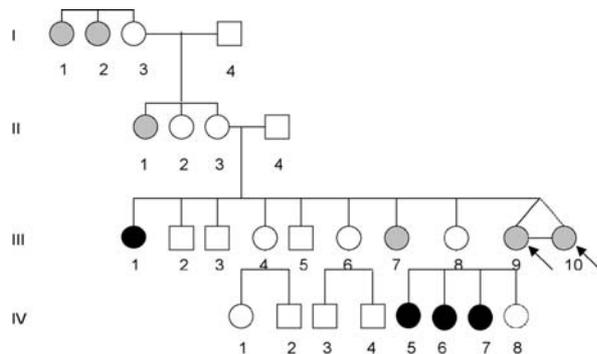


Figura 1. Heredograma da família com a mutação P766A. As pacientes 1 (III-9) e 2 (III-10) são gêmeas univitelinas estudadas com a forma completa da síndrome de insensibilidade aos andrógenos nas quais foi identificada a mutação P766A. Uma tia (II-1) e duas tias-avós (I-1 e I-2) também apresentavam amenorréia primária.

gação de amenorréia primária. Ambas relatavam telarca aos 13 anos e pubarca aos 16, sem quaisquer outras queixas. Nasceram de parto normal, tendo a primeira gêmea (paciente 1) pesado 3.500g e a segunda (paciente 2) 3.000g; ambas tiveram desenvolvimento neuro-psicomotor adequado. Eram filhas de casamento não consanguíneo e relatavam que uma tia (II-1) e duas tias-avós (I-1 e I-2), todas pelo lado materno, também apresentavam amenorréia primária. A mãe teve menarca aos 16 anos.

Ao exame físico apresentavam desenvolvimento sexual secundário feminino, sendo identificada a presença de gônadas palpáveis bilateralmente em região inguinal. As dosagens hormonais mostraram níveis elevados de LH e normais de FSH, e níveis altos de testosterona e baixos de estrógenos (tabela 1). A ultrasonografia pélvica revelou a presença de imagens com-

patíveis com gônadas em região de canal inguinal e ausência de útero. Após o diagnóstico clínico e hormonal da forma completa de síndrome de insensibilidade aos andrógenos, as pacientes foram submetidas a gonadectomia bilateral. Após o procedimento foi iniciada a reposição hormonal estrogênica.

As análises cromossômicas realizadas a partir de metafases de linfócitos de sangue periférico com a técnica de bandamento G e resolução de 400 bandas revelaram o cariótipo 46,XY em ambas as pacientes.

O DNA foi extraído a partir de leucócitos de sangue periférico de acordo com os procedimentos padrão (8). Toda a região codificadora e as regiões flanqueadoras exon-intron do gene do receptor androgênico foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico, segundo protocolo previamente descrito (7). A seqüência de oligonucleotídeos e os protocolos de PCR estão disponíveis quando solicitados. Os produtos de PCR foram pré-tratados com uma combinação de enzimas fosfatase alcalina de camarão e exonuclease I (United States Biochemical Corp, Cleveland, OH) e diretamente seqüenciados usando o *BigDye™ terminator cycle sequencing ready reaction kit* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) num seqüenciador automático ABI PRISM 31 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

RESULTADOS

A análise do gene do AR usando DNA genômico obtido a partir de leucócitos de sangue periférico revelou uma substituição de uma citosina por uma guanina no

Tabela 1. Resultado das dosagens hormonais basais e pós-gonadectomia das pacientes 1 e 2.

| Dosagens Hormonais | Paciente 1 | | Paciente 2 | | Valores normais |
|------------------------------|------------|------------------|------------|------------------|-----------------|
| | Basal | Pós-gonadectomia | Basal | Pós-gonadectomia | |
| T ₃ (ng/dl) | 123 | 104 | 112 | 120 | 80 - 220 |
| T ₄ (ug/dl) | 10,8 | 9 | 9,5 | 9,5 | 5 - 13 |
| TSH (mul/ml) | 1,27 | 2,86 | 1,29 | 2,37 | 0,5 - 5,1 |
| LH (mul/ml) | 35 | 35 | 42 | 30 | 0,4 - 5,7* |
| FSH (mul/ml) | 7,9 | 62 | 7,8 | 56 | 1,1 - 13,5* |
| Testosterona (ng/dl) | 1330 | 48 | > 1600 | < 20 | 360 - 990* |
| LH x testosterona (ng x U/L) | 461,51 | | 675,2 | | |
| 17-OH Progesterona (ng/ml) | 0,67 | 0,9 | 0,85 | 1,23 | 0,7 - 3,6* |
| Androstenediona (ng/ml) | 2,45 | 1,24 | 2,4 | 1,26 | 0,8 - 2,2* |
| S-DHEA | 146,3 | - | 198,2 | - | 80 - 560* |
| Estradiol (pg/ml) | < 20 | < 20 | 48,4 | < 20 | Nd - 44* |
| Progesterona (ng/ml) | 0,5 | 0,45 | 0,5 | 0,22 | 0 - 4,0* |

* valores normais para o sexo masculino

nucleotídeo 2658 (CCT>GCT) do exon 5, resultando numa troca do aminoácido prolina por alanina na posição 766 da proteína (figura 2).

DISCUSSÃO

As duas irmãs gêmeas monozigóticas avaliadas por amenorréia primária tinham quadro clínico e laboratorial compatível com o diagnóstico de pseudo-hermafroditismo masculino pela forma completa da síndrome de insensibilidade aos andrógenos (CAIS) (genitais externos femininos com gônadas na região inguinal, níveis elevados de LH e testosterona e cariótipo 46,XY). A identificação em ambas de uma mutação do tipo *missense*, P766A, na região de ligação ao hormônio do receptor androgênico confirmou o diagnóstico a nível molecular.

Apesar de terem sido relatadas na literatura mais de 300 mutações no gene do AR, somente três casos clínicos foram descritos em gêmeas com AIS, e destes apenas um foi confirmado como tendo mutação no gene do AR (9). Mongan e cols. descreveram em 2002 duas mutações *missense de novo*, F856L e S865P, no exon 7 do AR, região *hot spot* do LBD, em gêmeas monozigóticas com a forma completa de AIS (9). Os estudos funcionais destas mutações evidenciaram que a mutação F856L se comporta de forma semelhante ao receptor *wild type*, sem prejuízo na capacidade de ligação ou ativação da transcrição. Já a mutação S865P abole completamente a capacidade de ligação e a ativação da transcrição do AR, justificando assim a forma completa de AIS nestas pacientes. Esta foi a primeira descrição confirmada de gêmeas monozigóticas com CAIS e mutação no AR.

Embora a região LBD (exons 4 a 8) seja um *hot spot* para mutações nesse gene e apesar do grande

número de mutações já descritas, apenas um caso semelhante ao descrito no presente trabalho havia sido relatado previamente. Boehmer e cols. descreveram em 2001 uma família composta por uma tia e duas sobrinhas com CAIS com essa mesma mutação, mas que devido a uma numeração distinta foi descrita como P757A (4). Essas pacientes, assim como as gêmeas descritas aqui, apresentavam genitália externa feminina, pêlos pubianos rarefeitos e pouco desenvolvimento mamário, caracterizando o diagnóstico da forma completa de AIS. Os ensaios de ligação de células inteiras com o andrógeno sintético R1881 revelaram uma capacidade de ligação normal, mas uma constante de dissociação elevada (4). A proteína de 110kDa estava presente em quantidade muito diminuída (4).

Neste mesmo códon (766) só foram descritas até o momento duas substituições do aminoácido prolina: por serina em duas famílias (6,10) e por alanina em outras duas (4 e presente estudo). Em todos os casos relatados, a forma clínica é sempre de CAIS, sugerindo uma importante participação do aminoácido prolina no códon 766 na ação do AR. Marcelli e cols. relataram em 1994 uma paciente com CAIS com a substituição por serina no códon 766. Com esta troca, a capacidade de ligação do AR ao andrógeno era anormal e havia uma rápida dissociação do ligante (10).

O aminoácido prolina na posição 766 é altamente conservado em outras espécies (*Pan troglodytes* – chimpanzé; *Sus scrofa* – porco; *Canis familiaris* – cão; *Rattus norvegicus* – rato; *Mus musculus* – camundongo). O fato de situar-se na região corresponde ao domínio de ligação ao andrógeno, responsável pela interação andrógeno-receptor, fundamental para a ação androgênica, é compatível com o grave comprometimento da função androgênica nas pacientes descritas.

O aminoácido prolina tem características físico-químicas do tipo hidrofílico, sendo o único aminoácido essencial cíclico; o aminoácido alanina, por sua vez, apresenta propriedades hidrofóbicas, apolares. Além disso, a substituição da prolina por qualquer outro aminoácido sempre resulta em alteração na direção da cadeia polipeptídica. Estas diferenças entre os aminoácidos sugerem alterações significativas na estrutura protéica do AR, que resulta na forma completa de AIS.

As dosagens hormonais destas gêmeas foram, em geral, semelhantes às das pacientes com CAIS descritas por Melo e cols. em 2003 (7). As dosagens de testosterona, no entanto, encontravam-se muito mais elevadas (1330 a 1600ng/dl; valores normais para o sexo masculino: 360 a 990ng/dl). A média

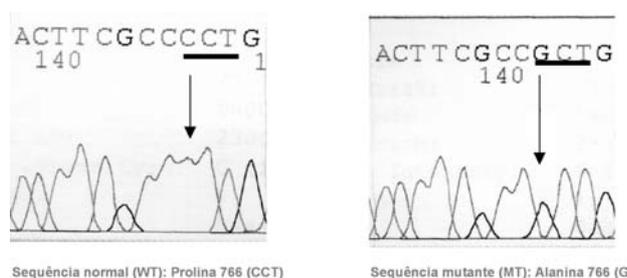


Figura 2. Eletroesferograma da seqüência de DNA de indivíduo normal (Wild type-WT) e paciente com CAIS (mutante-MT) hemizigota para a mutação no nucleotídeo 2658 (CCT>GCT) do exon 5 do AR.

desses valores (1465ng/dl) é bastante superior à dos pacientes pós-púberes com diagnóstico de CAIS descritas por Melo e cols. (342ng/dl). Estes níveis elevados de testosterona favorecem o diagnóstico de AIS e descartam os defeitos de síntese de testosterona.

Os valores de LH também encontravam-se elevados, e o produto da dosagem de testosterona X LH também mostrou-se elevado nestas pacientes, confirmando o diagnóstico hormonal clássico de AIS. Curiosamente, os níveis estrogênicos encontravam-se elevados apenas na paciente 2, com níveis indetectáveis na paciente 1. Embora alguns trabalhos descrevam níveis estrogênicos elevados em pacientes com AIS (11), níveis normais ou baixos também foram descritos (7).

Em conclusão, descrevemos os casos de duas gêmeas portadoras da forma clínica completa da síndrome de insensibilidade aos andrógenos (CAIS) com a mutação *missense* P766A contida na região de ligação ao andrógeno (LBD) do receptor androgênico. Dezenove mutações distintas no *AR* já haviam sido descritas em 31 pacientes brasileiros portadores de AIS, porém não incluíam a P766A (7,12-14). Apesar de mutações neste gene serem bastante freqüentes, este é o segundo relato de diagnóstico molecular em gêmeas com AIS e a segunda família descrita com esta mutação na literatura.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos Drs. Iramaia O. Chaguri e Genessy B. Junior pelo auxílio no tratamento clínico e cirúrgico das pacientes e toda a equipe do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo pela colaboração com o estudo molecular.

REFERÊNCIAS

1. Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Williard HF, French FS, Wilson EM. Sequence of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. **Science** 1988;240:327-30.
2. Quigley CA, Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. **Endocr Rev** 1995;16:271-322.
3. Brinkmann AO. Molecular basis of androgen insensitivity. **Mol Cell Endocrinol** 2001;179:105-9.
4. Boehmer AL, Brinkmann O, Bruggenwirth H, van Assendelft C, Offen BJ, Verleun-Mooijman MC, et al. Genotype versus phenotype in families with androgen insensitivity syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:4151-60.
5. AR database: <http://ww2.mcgill.ca/androgendb/>
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;85:658-65.
7. Melo KF, Mendonça BB, Billerbeck AE, Costa EM, Inacio M, Silva FA, et al. Clinical, hormonal, behavioral, and genetic characteristics of androgen insensitivity syndrome in a Brazilian cohort: five novel mutations in the androgen receptor gene. **J Clin Endocrinol Metab** 2003;88:3241-50.
8. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, editors. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor; 1989.
9. Mongan NP, Jaaskelainen J, Green K, Schwabe JW, Shimura N, Dattani M, et al. Two *de novo* mutations in the AR gene cause the complete androgen insensitivity syndrome in a pair of monozygotic twins. **J Clin Endocrinol Metab** 2002;87:1057-61.
10. Marcelli M, Zoppi S, Wilson CM, Griffin JE, McPhaul J. Amino acid substitutions in the hormone-binding domain of the human androgen receptor alter the stability of the hormone receptor complex. **J Clin Invest** 1994;94:1642-50.
11. MacDonald PC, Madden JD, Brenner PF, Wilson JD, Sifteri PK. Origin of estrogen in normal men and women with testicular feminization. **J Clin Endocrinol Metab** 1979;49:905-16.
12. Ribeiro ML, Cabral DF, Maciel-Guerra AT, Guerra-Junior G, Hackel C. A novel mutation in the steroid-binding domain of the androgen receptor gene in a boy with ambiguous genitalia and hypergonadotrophic hypogonadism. **J Endoc Genet** 1999;1:91-3.
13. Cabral DF, Maciel-Guerra AT, Hackel C. Mutations of androgen receptor gene in Brazilian patients with male pseudohermaphroditism. **Braz J Med Biol Res** 1998;31:775-8.
14. Melo KFS, Latronico AC, Costa EMF, Billerbeck AEC, Mendonça BB, Arnhold IJP. A novel point mutation (R840S) in the androgen receptor in a Brazilian family with partial androgen insensitivity syndrome. **Hum Mut** 1999;14:353.

Endereço para correspondência:

Ivo J. P. Arnhold
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 155, PAMB, 2º andar, Bl 6
05403-900 São Paulo, SP
E-mail: iarnhold@usp.br