

**Durval Damiani**  
**Vaé Dichtchekian**  
**Nuvarte Setian**

*Unidade de Endocrinologia  
Pediátrica, Instituto da Criança  
“Prof. Pedro de Alcântara”,  
Hospital das Clínicas da Faculdade  
de Medicina da Universidade  
de São Paulo, São Paulo, SP.*

*Recebido em 05/01/00  
Revisado em 19/04/00  
Aceito em 22/04/00*

**RESUMO**

Os autores revisam os vários fatores envolvidos no complexo processo de determinação gonadal, passando pelo já clássico SRY (fator de determinação testicular, no braço curto do cromossomo Y) e ressaltando os principais genes candidatos a participarem desta verdadeira “cascata” de determinação gonadal. Os genes candidatos se avolumam e têm mostrado os vários caminhos por que passa o processo-chave da diferenciação sexual, qual seja, a diferenciação de um testículo ou de um ovário. Genes localizados *upstream* em relação ao SRY (WT1, SF-1, DAX-1 e SOX9), suas interdependências e a ativação de promotores de outros genes, como o promotor do gene do hormônio anti-mülleriano são abordados neste artigo. Apesar de a lista de genes candidatos ter crescido, ainda restam muitas interrogações e ainda resta muito trabalho a ser desenvolvido para que se esclareça com maior precisão este passo crucial no mecanismo de diferenciação sexual. **(Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/3: 248-56)**

**Unitermos:** Determinação gonadal; Fator de determinação testicular; Testículo; Ovário; Intersexo; Cromossomo Y

**ABSTRACT**

This paper reviews the many steps involved in the complex process of gonadal differentiation, starting with the already “classic” SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and highlighting the main candidate genes to this “cascade” of sexual determination. The number of candidate genes has grown showing the complexity involved in the path from a bipotential gonad to reach its destiny as a testis or as an ovary. We discuss the interdependency of the genes located upstream of SRY, such as WT1, SF-1, DAX-1, and SOX9, and how one gene can activate the promoter of other genes in the process (SF-1 + WT1 activate the promoter of AMH). Although the list of candidate genes has increased, many questions remain unanswered and a lot of work is still needed to clarify this complex step of sexual differentiation, namely, gonadal determination. **(Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/3: 248-56)**

**Keywords:** Gonadal determination; Testis determining factor; Testis; Ovary; Intersex; Y chromosome

**D**ESDE OS TRABALHOS DE ALFRED JOST, publicados em 1947 e 1953, abordando aspectos da endocrinologia fetal em relação aos hormônios gonadais e hipofisários, bem como seus clássicos estudos sobre o efeito da castração de coelhos e sua repercussão na diferenciação sexual, muito se tem aprendido a respeito do evento-chave da diferenciação sexual, qual seja, a transformação da gônada bipotencial em testículo ou em ovário.

O interesse científico a respeito dos mecanismos de determinação sexual vem dos tempos de Aristóteles (384-322 AC). Em 355 AC, Aristóteles postulava que o dimorfismo sexual surgia de diferenças na tem-

peratura do sêmen no momento da copulação: sêmen mais aquecido geraria indivíduos do sexo masculino, enquanto que em temperatura mais baixa, sexo feminino. No início do século, admitia-se que fatores nutricionais fossem os determinantes do sexo, em analogia ao que ocorre com répteis, nos quais a temperatura de incubação do ovo determina o sexo. Nos anfíbios e peixes o sexo genético é facilmente revertido em qualquer direção se a larva for exposta a esteróides. De forma semelhante, os pássaros usam um sistema de determinação sexual onde os esteróides desempenham um papel importante e podem mesmo reverter tal processo. Tais situações são conhecidas como “determinação sexual ambiental”. Difícil, no entanto, é compreendermos o que ocorre com um tipo de peixe encontrado na Califórnia (*sheepshead*) que vive em cardumes de cerca de 20 peixes com um líder, macho, geralmente o maior do grupo. No caso desse líder desaparecer, o segundo em tamanho sofre uma modificação de sua gônada, que se transforma de ovário a testículo, com modificação fenotípica para macho, assumindo o comando do cardume. A dinâmica do grupo, que inclui sinais hormonais e/ou visuais, está implicada nesse processo de diferenciação sexual (1).

Foi somente na década de 50 que o papel do cromossomo Y começou a ser ressaltado. A princípio, acreditava-se que o cromossomo Y fosse necessário e suficiente para a determinação do testículo, mas logo a experiência clínica incumbiu-se de mostrar situações em que, apesar do Y, o testículo não se desenvolvia (mulher XY). Por outro lado, sua ausência não impedia o desenvolvimento testicular (homem XX). Passasse, então, à “fase do antígeno HY” (2), um antígeno de histocompatibilidade descoberto em transplante de pele em ratos isogênicos e que parecia, num primeiro momento, preencher as características do fator de determinação testicular (TDF). Com o passar do tempo e com o acúmulo de experiência clínica, logo vai ficando claro que também o HY não resolvia o enigma da determinação gonadal. A descoberta de uma região no braço curto do cromossomo Y (região 1 A 1, com 35kb), por técnicas de biologia molecular, vem finalmente desvendar a região de determinação testicular (SRY) há muito procurada (3-5). No entanto, o que parecia ser o final de um longo e árduo caminho para desvendar os mecanismos de determinação gonadal, era, na verdade, o início de uma nova era de descobertas de uma verdadeira cascata de diferenciação sexual, implicando genes ligados ao cromossomo X e genes autossômicos.

Os estudos de mapeamento gênico do cromossomo Y defrontam-se com dificuldades únicas, devidas

a propriedades distintas de três tipos de material genético presentes no Y. O primeiro tipo corresponde às regiões pseudo-autossômicas (PAR), localizadas nas pontas dos braços curto e longo que permitem um correto pareamento e segregação dos cromossomos sexuais durante a meiose. Tal região apresenta material de DNA compartilhado pelos cromossomos X e Y. Um segundo tipo de material genético consiste de DNA satélite repetitivo, visível sob coloração específica e que, no homem, responde por 70% do DNA do Y. Aparentemente, tal região não carrega informação necessária para a determinação sexual. O terceiro tipo de material genético é único no Y e não sofre recombinação com o cromossomo X. Portanto, essa região não pode ser analisada por métodos genéticos convencionais que dependem da frequência de recombinação para a determinação da distância entre os *loci*. Ao invés disso, esta região é estudada através de correlação entre a presença de marcadores específicos de Y com alterações citogenéticas. Mapas com base em hibridação de DNA e em deleções que ocorrem naturalmente em pacientes têm permitido não somente a pesquisa dos genes envolvidos na determinação sexual, mas também têm auxiliado na localização de genes envolvidos na espermatogênese e facilitado a compreensão da estrutura e função desse cromossomo (6). Graves desenvolveu uma interessante teoria segundo a qual os genes no cromossomo Y, incluindo o SRY, são resultado de um processo através do qual o cromossomo Y derivou-se do cromossomo X por um progressivo mecanismo de adição e perda de material genético. Nesta linha, acredita que os genes no Y são dispensáveis e estão em vários estágios de degradação ou têm sido selecionados porque adquiriram uma função na determinação sexual masculina ou na espermatogênese (7).

### O FATOR DE DETERMINAÇÃO TESTICULAR (TDF)

Após muitas tentativas de se identificar o fator que sinaliza para a gônada indiferenciada seguir seu caminho para testículo, chegou-se a um segmento no braço curto do cromossomo Y (segmento 1 A 1), localizado entre o gene *ZFY* (*zinc-finger protein*, inicialmente caracterizado como o TDF) e a região pseudo-autossômica. Uma sub-região de 35kb nesse segmento, contém um gene com um único exon, que codifica uma proteína de 223 aminoácidos, com um domínio de ligação ao DNA de 80 aminoácidos com homologia aos fatores de transcrição nuclear humanos, pertencente ao grupo de proteínas de alta mobilidade (*High Mobility Group - HMG*). Após ligar-se a uma proteína nuclear chamada SIP-1 (*SRY-interacting-*

*protein 1*), o SRY provoca um encurvamento de 82° no DNA, o que media seus efeitos. A identificação do TDF foi o auge de uma busca intensiva que se iniciou em 1959 quando Jacobs e Strong, bem como Ford e col. demonstraram que a presença do cromossomo Y era determinante do sexo masculino humano (8,9).

Várias são as evidências que confirmam ser o SRY o TDF:

O gene SRY é específico do cromossomo Y, jogando um papel dominante no determinismo do testículo, com qualquer número de cromossomos X;

Localiza-se numa pequena região do braço curto distal do cromossomo Y e este fragmento de DNA é o mínimo requerido para a reversão do sexo;

O perfil de expressão do SRY está de acordo com a função do TDF: os RNAm do SRY são detectados na gônada fetal no momento preciso da diferenciação testicular, quando se observa o aparecimento dos primeiros túbulos de células de Sertoli (a partir de 10,5 dias no rato, 29 dias no carneiro e na sexta semana no homem);

Em alguns casos de mulheres XY, mutação de ponto no SRY é tida como causadora da transformação da gônada indiferenciada em *streak* (banda fibrosa, sem características histológicas de tecido ovariano ou testicular) e não em testículo (10,11).

No entanto, algumas perguntas cabem neste momento: o SRY é necessário para diferenciar o testículo humano? O SRY atua sozinho ou necessita de outros genes para dirigir a determinação sexual (12)?

Partido-se do pressuposto de que o SRY atue sozinho, não se consegue explicar todos os casos de anomalias de diferenciação sexual descritos. Na síndrome de Swyer (mulheres XY), somente 20% apresentam mutação no gene SRY. Até 1996, 18 pacientes com disgenesia gonadal 46,XY apresentavam mutação no quadro de leitura do SRY (13-15). Mais de 10 tipos de mutações têm sido encontradas no SRY e, exceto deleções 5' no quadro de leitura do SRY, todas as outras caem no interior da região que codifica a proteína HMG. Nos homens XX, em 20% dos casos não se detecta SRY. Mais curioso, no entanto, é o que tem sido observado com hermafroditas verdadeiros (HV): em 90% dos pacientes não se consegue demonstrar a presença de SRY e, ainda assim, tecido testicular (juntamente com ovariano) se desenvolve (16,17).

Em 1987, De La Chapelle aventou várias hipóteses para explicar a presença de testículos em homens XX sem detecção de fragmento de Y: ou haveria um pequeno fragmento de Y capaz de promover a determinação testicular e esse fragmento não seria detectado pelas técnicas empregadas, ou a determi-

nação testicular poderia ocorrer por outros mecanismos, que não incluiriam a ação do TDF. Neste caso, ocorreria a presença de um mosaicismos envolvendo uma linhagem celular contendo o cromossomo Y que dispararia a determinação testicular mas não seria detectável por ser limitado ao tecido gonadal, ou mesmo por ser eliminado durante o desenvolvimento. Apesar de ser uma hipótese difícil de ser testada, não tem havido evidências a seu favor. Uma outra possibilidade seria através da mutação de um gene autossômico ou ligado ao X que se tornaria um gene determinante de testículo (18). Vários casos familiares, em que tanto HV 46,XX quanto homens XX aparecem na mesma irmandade, reforçam ainda mais a possibilidade de transmissão autossômica desses distúrbios da diferenciação sexual. Nas famílias em que coexistem HV XX e homem XX é comum a ausência de SRY, chamando a atenção para um espectro de apresentações que vai desde a mulher normal, 46,XX, passando por graus variados de desenvolvimento de tecido testicular (os HV XX) até chegar ao "extremo" em que somente tecido testicular se diferencia (homem XX). Nesses casos, em geral o homem XX apresenta-se com ambigüidade genital. Dentre 21 indivíduos afetados coletados por De La Chapelle, somente dois são homens XX sem ambigüidade genital, enquanto seis são homens XX com ambigüidade genital ou hipospádia e 13 são hermafroditas verdadeiros. Particularmente na família relatada por Seboun e col., há forte sugestão de que o tecido testicular não tenha sido o resultado da atuação do TDF mas de uma mutação (19).

### GENES DE REVERSÃO SEXUAL, SENSÍVEIS A DOSE (DSS)

A partir da detecção de casos clínicos de reversão sexual em indivíduos 46,XY com duplicação de parte do braço curto do cromossomo X (20), chegou-se ao mapeamento do *locus* DSS, inicialmente numa região de 15Mb, descobrindo-se posteriormente que a região crítica tem 160kb em Xp21, localizando-se distalmente 0,4 e 1Mb ao gene da deficiência de glicerol quinase (GK) e ao da distrofia muscular de Duchenne, respectivamente. A região DSS contém vários genes, incluindo o gene para hipoplasia adrenal congênita (AHC), que condiciona adrenais hipoplásicas ou ausentes e hipogonadismo hipogonadotrófico (HHG). Esse conjunto de genes tem sido chamado DAX-1 (DSS-AHC no cromossomo X, gene 1). O DAX-1 parece ser um fator crítico para o desenvolvimento do córtex adrenal e expressa-se também na crista genital, durante o desenvolvimento embrionário

(21). Deleções na região Xp21 em indivíduos 46,XY levam à síndrome dos genes contíguos, em que AHC, HHG, retardo mental, deficiência de GK, perda auditiva e distrofia muscular de Duchenne podem estar presentes no mesmo indivíduo. Mesmo com a deleção completa da região DSS, a genitália masculina é normal, com completa regressão dos derivados müllerianos, o que evidencia que o DSS não joga um papel maior no desenvolvimento testicular (22).

O fato de que a duplicação dessa região leva a reversão sexual numa grande porcentagem de indivíduos 46,XY levanta a possibilidade de uma interação entre DAX-1 e SRY, sugerindo que o nível de expressão de SRY encontra-se num patamar crítico de equilíbrio com o DAX-1. Num estudo de ratos transgênicos, Swain e col. conseguiram uma completa reversão sexual quando uma dose aumentada de DAX-1 coexistia com um alelo "fraco" de Sry (*Sry Poschiavinus*, obtido do *Mus domesticus poschiavinus* – Y<sup>POS</sup>). Embriões com o cromossomo Y<sup>POS</sup> numa base genética C57BL/6 invariavelmente mostram reversão sexual, produzindo fêmeas com disgenesia gonadal pura XY ou hermafroditas verdadeiros (23). O alelo *poschiavinus* parece apresentar um nível de expressividade mais baixo, o que provoca um retardo na formação dos cordões sexuais. Dependendo da base genética dos animais, alguns podem ter sua determinação gonadal a testículo, outros a ovário ou ovotétis. Dentre 14 animais XY<sup>POS</sup> transgênicos para Dax (Dax:Dax), três eram fenotipicamente femininos, três eram hermafroditas verdadeiros e oito eram machos. Todos os animais que não eram transgênicos desenvolveram-se como machos (16 animais), o que mostra que o cromossomo Y<sup>POS</sup> é eficiente na determinação gonadal masculina, desde que não haja Dax em dose elevada. Nesta linha de raciocínio, é possível que o SRY humano funcione num nível crítico assim como o *Sry poschiavinus*.

### FATOR ESTEROIDOGÊNICO (SF-1)

A distribuição tecidual do DAX-1 (córtex adrenal, gônadas, hipotálamo e hipófise) é a mesma de outro receptor nuclear órfão, o SF-1 (fator esteroideogênico). O fato de sítios de fixação de SF-1 serem encontrados nos promotores de genes que codificam enzimas esteroideogênicas ligadas ao citocromo P450 sugere fortemente que tal fator regule a esteroideogênese. Em experiências com ratos, onde se provoca mutação do SF-1, demonstra-se que os animais nascem com ausência total das glândulas adrenais e agenesia gonadal.

O gene SF-1 atua antes do SRY, localizando-se *upstream* na cascata de regulação da determinação

gonadal. O gene supressor de tumor de Wilms (WT1) e SF-1 atuam nos primeiros estádios da formação gonadal, mas a expressão de cada um deles não depende da presença do outro. Esta interação WT1 (isoforma – KTS) com SF-1 seria deslocada em presença de uma relação DAX-1 alterada, quer por duplicação do braço curto do X (Xp21), quer por mutação do WT1 (*Denys-Drash*, por exemplo). Como o WT1 é um gene autossômico enquanto o DAX-1 é ligado ao X, a relação normal seria de 2:1. No caso de duplicação do DSS, a relação passa a ser 2:2, enquanto em casos de mutação de WT1, a relação passa a ser 1:1 e em ambas as situações, compromete-se a seqüência normal de determinação testicular, podendo ocorrer reversão sexual (Figura 1) (24).

Ito e col. estudaram se o DAX-1 e o SF-1 poderiam interagir na regulação dos genes-alvo responsivos a SF-1. Foi mostrado que o DAX-1 interage diretamente com SF-1 em estudos de ligação protéica *in vitro*. Todavia, ele não interfere com a ligação do SF-1 ao DNA em ensaios de mudança de mobilidade em gel. A transativação do SF-1 é inibida pelo DAX-1, indicando que nem o domínio de ligação ao DNA do SF-1 nem os sítios de ligação do SF-1 são requeridos para a inibição pelo DAX-1. Duas mutações de ponto que ocorrem naturalmente no DAX-1 exibiam inibição alterada do SF-1. Os autores concluem que o DAX-1 pode inibir a atividade transcricional do SF-1 e sugerem que a perda desta propriedade inibitória do DAX-1 pode responder em parte pelo fenótipo da hipoplasia adrenal congênita (25).

Embora genes específicos que dirigem o desenvolvimento ovariano não tenham ainda sido identificados, especula-se que o DSS possa ser requerido para a diferenciação ovariana, de modo que sua ação deve ser reprimida nos primeiros estádios da determinação gonadal em indivíduos do sexo masculino (26) ou alternativamente, o DSS pode ser um regulador negativo da determinação do sexo masculino, sem qualquer papel na determinação ovariana (27). Estudos de deleção do exon 2 do gene AHC murino (*AhchDelta2*) sugerem que o gene *Ahch* não tem papel na determinação ovariana, como proposto por Swain, mas que ele seja essencial ao desenvolvimento da função testicular (28,29). É possível que o DSS seja um gene de determinação ovariana com importante função na cascata de determinação sexual (22).

### O GENE SOX9 (SRY-LIKE HMG BOX)

Se por um lado a dose dupla de DSS evita a determinação testicular, a haploinsuficiência do gene SOX9,

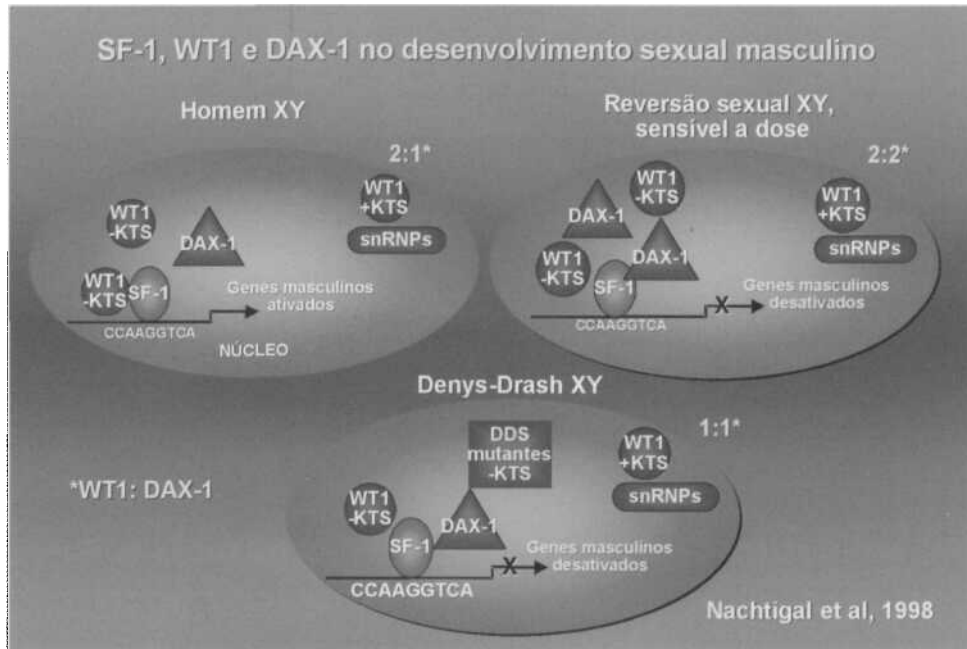


Figura 1. Relação entre DAX-1 e WT1 (isoforma -KTS) em um homem normal (1:2), na síndrome de Denys-Drash (1:1) e nas duplicações de braço curto de X (Xp21) (2:2).

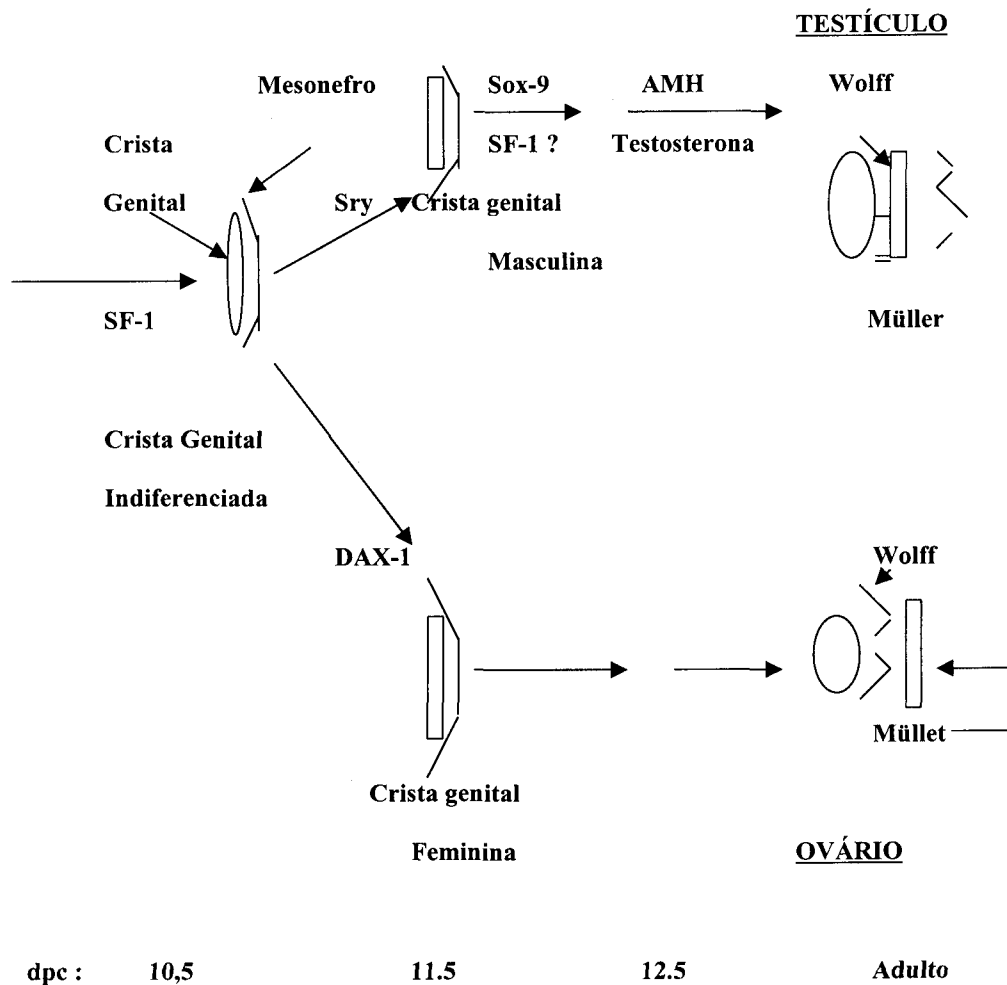
localizado no cromossomo 17, causa displasia campomélica e também reverte a determinação do sexo masculino para o feminino (30,31). Os genes SOX codificam proteínas com domínios característicos de fatores de transcrição e expressam-se numa variedade de tecidos em desenvolvimento. Até o momento, cerca de 20 proteínas SOX foram identificadas, muitas delas associadas a eventos que regulam a especialização celular durante o desenvolvimento. Embora a organização de domínios funcionais dentro da proteína SOX varie, a subfamília SOX caracteriza-se por um quadro de leitura HMG que se liga ao DNA, altamente conservado. É provável que esta subfamília apresente a mesma preferência para a sequência AACAA(A/T) encontrada para o SRY. O que poderia distinguir uma proteína SOX da outra seria o momento de sua síntese durante os estádios de desenvolvimento, ou o papel que outros domínios dentro da proteína SOX desempenham para construir um complexo regulador num promotor específico, ou ambos (32). Enquanto a reversão sexual observada em pacientes com displasia campomélica sugere fortemente um papel para o SOX9 na determinação sexual, não se sabe como ele contribui na via genética de desenvolvimento testicular e vários modelos têm sido propostos: 1. poderia atuar como um fator de transcrição para a expressão do SRY; 2. a proteína do SOX 9 poderia interagir com o SRY para formar um complexo que iniciaria o desenvolvimento tes-

ticular; 3. o SOX9 poderia ser direta ou indiretamente responsivo ao SRY; 4. o SOX9 poderia atuar na diferenciação, mais que na determinação testicular, talvez como um fator de transcrição para genes envolvidos na síntese de hormônios esteróides ou genes importantes para a arquitetura testicular (33).

O esquema abaixo (Figura 2), baseado em Swain e col. mostra, em embrião de rato, como poder-se-ia processar a determinação gonadal, levando-se em conta que o DAX-1 não é necessário para a determinação testicular mas pode ter papel na determinação ovariana (23). Nesse esquema, o gene WT1, bem como a possível atuação de outros fatores autossômicos, não está sendo levada em consideração.

### GENE SUPRESSOR DO TUMOR DE WILMS (WT1)

Há algum tempo conhece-se a associação entre anomalias renais e o desenvolvimento sexual. Pacientes portadores da síndrome de Denys-Drash apresentam um pseudohermafroditismo masculino, com cariótipo 46,XY, ao lado de uma especial suscetibilidade ao desenvolvimento de tumor de Wilms. A síndrome designada WAGR é a associação de tumor de Wilms, aniridia, anomalias urogenitais e retardo mental. Em ambas as situações, o gene supressor do tumor de Wilms, localizado no cromossomo 11 e chamado WT1, tem sido implicado na sua etiologia (34,35). A



**Figura 2.** Alguns produtos gênicos envolvidos na diferenciação sexual do embrião de rato (23).

dpc - dias pós-coito  
 AMH - hormônio anti-mülleriano

síndrome de Frasier, uma doença rara caracterizada por pseudohermafroditismo masculino e glomerulopatia progressiva apresenta-se com genitália externa feminina, gônadas em fita, cariótipo 46,XY e os pacientes desenvolvem gonadoblastoma com bastante frequência. A alteração gênica encontrada envolve o intron 9 do gene WT1.

O gene WT1 é composto por 10 introns, codifica uma proteína com quatro *zinc-finger motives* e apresenta atividade transcricional e supressora tumoral. Um *splicing* alternativo gera quatro isoformas: o exon 5 pode ou não estar presente e um sítio de *splicing* alternativo no intron 9 permite a adição de três aminoácidos (KTS - lisina, treonina e serina) entre o terceiro e o quarto “dedos de zinco”. Na síndrome de

Frasier, uma mutação no sítio de *splicing* no intron 9 faz perder a isoforma com os três aminoácidos entre o terceiro e o quarto dedos de zinco (+KTS), o que provoca uma diminuição da relação das isoformas +KTS/-KTS nesses pacientes (35).

O gene WT1 foi isolado pela primeira vez em 1990. Mutação no WT1 impede o desenvolvimento renal e gonadal pela falta de diferenciação da crista genital (36). Uma característica proeminente nessas três síndromes (Denys-Drash, WAGR e Frasier) é a alta incidência de defeitos uro-genitais. Embora defeitos no trato genital e reprodutivo possam variar amplamente, a maior parte das mulheres (46,XX) parece normal, enquanto a maioria dos indivíduos 46,XY exibem ambigüidade genital ou pseudo-her-

mafroditismo masculino. Portanto, o gene WT1 atua antes do SRY, localizando-se *upstream* na cascata de determinação sexual. Em mais de 60% dos pacientes com síndrome de Denys-Drash, mutações *missense* no WT1 de células germinativas agrupam-se no exon 9, que codifica o terceiro dedo de zinco (37).

### OUTROS GENES CANDIDATOS A INTEGRAREM A CASCATA DE DETERMINAÇÃO GONADAL

Uma das anormalidades cromossômicas mais frequentemente detectadas na espécie humana tem sido as que envolvem o cromossomo 9, na forma de alterações estruturais, particularmente as inversões pericêntricas da região heterocromática. As deleções parciais do cromossomo 9 acompanham-se geralmente de trigonocefalia, fendas palpebrais côncavas, pescoço curto, nariz achatado, hipertelorismo e epicanto. Em 70% dos pacientes 46,XY, estão presentes órgãos genitais anormais e seis casos extremos de reversão sexual foram publicados (38). Rossodivita e col. relatam dois casos de alterações no cromossomo 9 com hipogonadismo secundário e grave insuficiência testicular (39). A disfunção testicular nestes casos poderia estar relacionada às fases iniciais da determinação sexual, cujos fatores controladores ainda não são bem conhecidos. A razão por que deleções na região distal do cromossomo 9 (9p24) têm sido associadas a anomalias da diferenciação sexual em indivíduos 46,XY tem sido explicada com a suposição de um retardonoinício da diferenciação das pregas genitais, através do “desmascaramento” de um alelo recessivo ou de uma haploinsuficiência. Como recomenda Rossodivita, não devemos subestimar os polimorfismos do cromossomo 9, já que podem estar envolvidos nas fases iniciais da determinação sexual.

Deleções no braço longo do cromossomo 10 (10q<sup>-</sup>) também podem levar indivíduos 46,XY a terem disgenesia testicular e ambigüidade genital (40).

Em 1997, Mortlock e Innis publicaram uma mutação *nonsense* do gene HOXA 13, localizado no cromossomo 7 (7p15-p14,2), responsável pela síndrome mão-pé-genital (*HFG - hand-foot-genital*) e que trouxe o gene HOX para a lista de candidatos autossômicos à determinação gonadal. A mutação HOXA 13 produz uma proteína truncada, que perde os últimos 20 aminoácidos na porção carboxi-terminal. Esta porção dobra-se em pelo menos três alfa hélices. A hélice é crítica para a ligação ao DNA e contém um dos mais conservados aminoácidos encontrados no homeodomínio. O único aminoácido invariavelmente presente em todas as proteínas homeo-

domínio conhecidas é justamente o triptofano, mutado nesta família (41). Os genes HOX codificam fatores de transcrição que contêm um domínio de 60 aminoácidos que se ligam ao DNA e são chamados domínio homeo (ou homeodomínio). No homem, existem 4 grupamentos de genes HOX (A, B, C e D) e cada grupamento é numerado de 1 a 13. Todavia, no ser humano (e em ratos), existem somente 39 genes HOX, o que significa que cada grupamento não contém os 13 HOX possíveis. Os genes Hox controlam o padrão de muitas estruturas embrionárias, incluindo o esqueleto, membros, prega genital, trato digestivo e sistema nervoso central. Houve uma época em que se pensava que as mutações dos genes HOX fossem letais, mas duas síndromes estão atualmente associadas a mutações HOXA 13 e HOXD 13, a síndrome HFG e a simpodactilia, respectivamente. Pelo menos três mutações diferentes em HOXA 13 foram documentadas em famílias com a síndrome HFG. As anormalidades de membros são caracterizadas pela redução do primeiro metacarpeano e primeiro metatarsiano, bem como fusão carpal/tarsal (42).

### O HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO (AMH)

O gene do AMH foi clonado em 1986 (43). Consta de cinco exons expressos como um mRNA de 2kb e é mapeado no braço curto do cromossomo 19 (19p13.2-13.3). Seu papel “clássico” é a regressão dos ductos de Müller, impedindo o desenvolvimento de trompas, útero e  $1/3$  proximal da vagina num processo de apoptose. No feto humano, os sinais de regressão ductal são irreversíveis no 51º dia pós-ovulação. Isto significa que fetos menores que 25mm com tecido testicular regridem os ductos de Müller, enquanto nos fetos maiores de 30mm tal regressão não mais ocorre (44,45). No entanto, o AMH apresenta tantas outras funções que o termo descritivo “hormônio anti-mülleriano” não lhe faz justiça. Quando um feto feminino é inapropriadamente exposto ao AMH, o ovário sofre alterações morfológicas, mudando a diferenciação para testículo, um efeito possível de ser reproduzido em cultura de órgão (46). Graças à inibição da aromatase, o AMH induz o ovário a produzir testosterona, ao invés de estradiol, o que significa uma verdadeira “reversão sexual endócrina”. Além disso, diminui o número de receptores de LH e opõe-se à biossíntese de progesterona induzida pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) (47). A ausência do AMH é crítica para a esteroidogênese ovariana normal. Acredita-se que o promotor do AMH seja ativado pela interação entre SF-1 e WT1.

Como se pode ver, cada vez mais os processos que levam uma gônada indiferenciada a seguir seu caminho para testículo ou ovário vão sendo esclarecidos e ficamos cada vez mais distantes da hipótese inicial de que bastaria a presença do Y para o testículo desenvolver-se.

Nesse complexo jogo, em que vários genes autossômicos estão envolvidos, em que genes ligados aos cromossomos sexuais participam ativamente, em que um determinado gene atua ativando o promotor de outros genes, como é o caso do SF-1 que, talvez agindo em consonância com WT1, ativa o promotor de AMH, e levando-se em conta que nem todas as estruturas estão sensíveis a determinados hormônios, a não ser numa estreita janela temporal, o fator TEMPO não pode ser desvinculado desse processo de determinação e diferenciação sexual. Um estímulo adequado num tempo inadequado equivale a um estímulo incompleto ou mesmo ausente. Portanto, deve haver um controle cronológico, possivelmente comandado por um ou mais genes, que permite que todo o processo embriológico que se inicia na célula-ovo e culmina com um indivíduo normal, masculino ou feminino ocorra sem intercorrências. Em dois pacientes apresentados por Fuqua e col., os cariótipos são 46,XY, ocorre ambigüidade genital com ductos müllerianos bem desenvolvidos, sendo testículos as gônadas presentes, contendo calcificações luminiais de etiologia e significado desconhecidos, que interferem com a produção ou com a ação da testosterona *in utero*. Os autores propõem que poderia ter havido um retardo na diferenciação da prega gonadal, de modo que a determinação testicular se atrasasse, sem que a determinação ovariana tivesse ocorrido. A produção atrasada de testosterona e de AMH é incapaz de promover uma adequada masculinização da genitália externa e supressão dos ductos müllerianos, respectivamente (48). Defeitos associados a mutações do gene WT1 e os associados a anormalidades da porção distal do braço curto do cromossomo 9 poderiam levar a um retardo na diferenciação da prega gonadal.

## REFERÊNCIAS

- Francis RC, Soma K, Fernald RD. Social regulation of the brain-pituitary-gonadal axis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993;90:7791-8.
- Eichwald EJ, Silmsler CR. Communication. **Transplant Bull** 1955;2:148.
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryologically expressed genes. **Nature** 1990;346:245-50.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MH et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature** 1990;346:240-4.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. **Nature** 1991;351:117-21.
- Haqq CM, Donahoe PK. Regulation of sexual dimorphism in mammals. **Physiol Rev** 1998;76:1-33.
- Graves JAM. The evolution of mammalian sex chromosomes and the origin of sex determining genes. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 1995;350:305-12.
- Jacobs P, Strong J. A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. **Nature** 1959;183:302-3.
- Ford C, Polani P, Briggs J, Bishops P. A presumptive human XXY/XX mosaic. **Nature** 1959;183:1030-1.
- Barboux S, Vilain E, McElreavey K, Fellous M. Le point sur le déterminisme du sexe chez les mammifères. **m/s** 1995;11:529-36.
- Damiani D, Dichtchekian V, Setian N. Papel do cromossomo Y na diferenciação gonadal. **Arq Bras Endocrinol Metab** 1995;39:116-21.
- Copelli S, Targovnik H, Bergada C. La determinación sexual a nivel molecular. Implicancia en el diagnóstico de patologías gonadales. **Medicina (B Aires)** 1995;55:705-11.
- Affara NA, Chalmers IJ, Ferguson-Smith MA. Analysis of the SRY gene in 22 sex reversed XY females identifies four new point mutations in the conserved DNA binding domain. **Hum Mol Genet** 1993;2:785-9.
- McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Costa JM, Souleyreau N, Kucheria K et al. XY sex reversal associated with a deletion 5' to the SRY "HMG box" in the testis determining region. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992;89:11016-20.
- Hawkins JR. Mutational analysis of SRY in XY females. **Hum Mutat** 1993;2:347-50.
- McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993;90:3368-72.
- Damiani D, Fellous M, McElreavey K, Barboux S, Barreto ESA, Dichtchekian V et al. True hermaphroditism: clinical aspects and molecular studies in 16 cases. **Eur J Endocrinol** 1997;136:201-4.
- De La Chapelle A. The Y-chromosomal and autosomal testis-determining genes. **Development** 1987;101:33-8.
- Seboun E, Leroy P, Casanova M, Magenis E, Boucekkine C, Disteche C et al. A molecular approach to the study of the human Y chromosome and anomalies of sex determination in man. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 1986;51:237-48.
- Baumstark A, Barbi G, Djalali M, Geerkens C, Mitulla B, Mattfeldt T et al. Xp-duplications with and without sex reversal. **Hum Genet** 1996;97:79-86.
- Ferguson-Smith MA. Clinical contributions towards understanding the genetics of sex differentiation. **Front Endocrinol** 1996;49:11-31.



22. Dubovic B, Calvari V, Bardoni B, Zanaria E, Fraccaro M, Zuffardi O et al. A genetic link between adrenal and gonadal development? **Front Endocrinol** 1996;20:13-21.
23. Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R. DAX-1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. **Nature** 1998;391:761-7.
24. Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-Vanhouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. **Cell** 1998;93:445-54.
25. Ito M, Yu R, Jameson JL. DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal congenital hypoplasia. **Mol Cell Biol** 1997;17:1476-83.
26. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Florida G, Worley KC, Tonini G et al. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. **Nat Genet** 1994;7:497-501.
27. Ogata T, Matsuo N. Testis determining gene(s) on the X chromosome short arm: chromosomal localization and possible role in testis determination. **J Med Genet** 1994;31:349-50.
28. Yu RN, Achermann JC, Ito M, Jameson JL. The role of DAX-1 in reproduction. **Trends Endocrinol Metab** 1998;9:169-75.
29. Kopp P. Targeted disruption of the Ahch (Dax-1) gene: knockout of old concepts. **Eur J Endocrinol** 1999;140:291-2.
30. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kowk G, Weller PA, Stevanovic M et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. **Nature** 1994;372:525-30.
31. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J et al. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. **Cell** 1994;79:1111-20.
32. Werner MH, Huth JR, Gronenborn AM, Clore GM. Molecular determinants of mammalian sex. **Trends Biochem Sci** 1996;21:302-8.
33. Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. **Development** 1996;122:2813-22.
34. Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Gosden G, Bard J et al. The candidate Wilms' tumor gene is involved in genitourinary development. **Nature** 1990;346:194-7.
35. Junien C. Un gène candidat pour la tumeur de Wilms. **Méd Sci** 1990;6:464-9.
36. Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC, Grünfeld JP, Jaubert F, Kuttann F et al. Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. **Nat Genet** 1997;17:467-70.
37. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D et al. WT1 is required for early kidney development. **Cell** 1993;153:2-10.
38. Little M, Wells C. A clinical overview of WT1 gene mutations. **Hum Mutat** 1997;9:209-25.
39. Bennet CP, Docherty Z, Robb AS, Ramani P, Hawkins JR, Grant D. Deletion 9p and sex reversal. **J Med Genet** 1993;30:518-20.
40. Rossodivita A, Radicioni A, Spera G, Colabucci F. Structural variants of chromosome 9: a possible association with hypogonadotropic hypogonadism. **J Pediatr Endocrinol Metab** 1997;10:419-24.
41. Wilkie AOM, Campbell FM, Daubeny P, Grant DB, Daniels RJ, Mullarkey M et al. Complete and partial XY sex reversal associated with terminal deletion of 10q: report of 2 cases and literature review. **Am J Med Genet** 1993;46:597-600.
42. Mortlock DP, Innis JW. Mutation of HOXA 13 in hand-foot-genital syndrome. **Nat Genet** 1997;15:179-80.
43. Bamshad M, Watkins WS, Dixon ME, Le T, Roeder AD, Dramer BE et al. Reconstructing the history of human limb development: lessons from birth defects. **Pediatr Res** 1999;45:291-9.
44. 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.
45. Taguchi O, Cunha GR, Lawrence WD, Robboy SJ. Timing and irreversibility of Müllerian duct inhibition in the embryonic reproductive tract of the human male. **Dev Biol** 1984;106:394-8.
46. Josso N, Picard JY, Tran D. The anti-Müllerian hormone. **Rec Prog Horm Res** 1977;33:117-60.
47. Vigier B, Watrin F, Magre S, Tran D, Josso N. Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro. **Development** 1987;100:43-55.
48. Kim JH, Seibel MM, Maclaughlin DT, Donahoe PK, Ransil BJ, Hametz PA et al. The inhibitory effects of Müllerian-inhibiting substance on epidermal growth factor induced proliferation and progesterone production of human granulosa-luteal cells. **J Clin Endocrinol Metab** 1992;75:911-7.
49. Fuqua JS, Sher ES, Perlman EJ, Urban MD, Ghahrenami M, Pelletier J et al. Abnormal gonadal differentiation in two subjects with ambiguous genitalia, Müllerian structures, and normally developed testes: evidence for a defect in gonadal ridge development. **Hum Genet** 1996;97:506-11.

**Endereço para correspondência:**

Durval Damiani  
Rua Bela Cintra 2117, apto. 9  
01415-002 São Paulo, SP.