



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Carlos Virgílio Rocha de Sousa Silva

**Distúrbios da diferenciação do sexo 46,XY: rastreamento de alterações  
patogênicas em uma série de casos**

Maceió

2023

CARLOS VIRGÍLIO ROCHA DE SOUSA SILVA

**Distúrbios da diferenciação do sexo 46,XY: rastreamento de alterações  
patogênicas em uma série de casos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Alagoas-UFAL, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Estudos clínicos e laboratoriais em ciências médicas

Linha de pesquisa: Genética clínica e experimental

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo José Petrolí

Coorientadoras: Profa. Dra. Isabella Lopes Monlleó

Profa. Dra. Débora de Paula Michelatto

Maceió

2023

**Catálogo na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586d Silva, Carlos Virgílio Rocha de Sousa.  
Distúrbios da diferenciação do sexo 46,XY : rastreamento de alterações  
patogênicas em uma série de casos / Carlos Virgílio Rocha de Sousa Silva. –  
2023.

71 f. : il.

Orientador: Reginaldo José Petrolí.

Co-orientadora: Isabella Lopes Monlleó.

Co-orientadora: Débora de Paula Michelatto.

Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal de  
Alagoas. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Médicas. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 45-53.

Apêndices: f. 54-58.

Anexos: f. 59-71.

1. Cariótipo DDS 46,XY. 2. Diagnóstico etiológico. 3. Sequenciamento  
completo do genoma. I. Título.

CDU: 575.113

A Deus e minha esposa, Maria Gabrielly,  
dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me sustentar em todos os momentos da minha vida acadêmica, dos momentos mais satisfatórios até os mais intensos e desgastantes. O mestrado foi uma prova que me testou em todos os âmbitos, se não fosse a mão do Senhor e as pessoas que Ele colocou em meu caminho, certamente eu teria parado no meio do percurso. Por isso, em referência a 1 Samuel 7:12 (Bíblia Sagrada), posso dizer: “Ebenézer”, pois até aqui nos ajudou o Senhor.

A Maria Gabrielly, minha esposa e fiel intercessora, que sempre me acompanha e que em todos os desafios tem me auxiliado, me impulsionado e me ajudado a superá-los. Obrigado por todos os momentos de apoio, cuidado, descontração, consolo, descanso; ou seja, pela felicidade de nosso casamento. Agradeço por tudo que tem feito em nossa construção familiar, juntos temos vivido e viveremos ainda mais do que Deus tem reservado para nós. Amo você.

Aos meus familiares. Meus pais, que sempre representarão um porto seguro em nossa vida. Minha irmã e cunhado, que em diversos momentos estiveram disponíveis com o apoio necessário. Assim como agradeço também a todos que fazem parte de meu círculo familiar e que tem acompanhado minha trajetória.

Ao Prof. Dr. Reginaldo, meu querido orientador, que de forma muito especial tem me ensinado o caminho de minha formação. Agradeço imensamente por sua paciência ao perceber minhas dificuldades e me direcionar a superação de cada uma delas.

Agradeço também às minhas co-orientadoras, Profa. Dra. Isabella Monlleó e Profa. Dra. Débora Michelatto, por excelentes contribuições que foram de grande importância durante todo o percurso do mestrado.

Aos queridos amigos e companheiros do Setor de Genética de nosso Hospital Universitário, Chrys, Thaysa, Karol, Marshall; “meninas da Genética”, Gabi, Thays, Mirele, Joyce, Fernanda, Yoná. Juntos temos crescido profissionalmente, compartilhado dificuldades e momentos de descontração, que fazem com que o processo de formação e trabalho seja mais leve e feliz.

Agradeço também a meus companheiros de bancada, que muito contribuíram para que eu pudesse realizar a etapa experimental de nossa pesquisa. Deixo aqui agradecimento especial a Diogo e Pomy (*in memoriam*), que tornaram possíveis as jornadas de sequenciamento dentro de nosso intenso cronograma.

Aos amigos do Banco de Sangue do HUPAA/UFAL, que por diversas vezes me cobriram nas jornadas de trabalho para que eu pudesse assistir às aulas, realizar experimentos e cumprir todas as demandas necessárias para minha formação. Tenho certeza de que o sucesso desta conquista tem muito do auxílio de vocês nos bastidores.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer ao companheirismo de minhas colegas e amigas de turma, setor e pesquisa, Camila e Mariana. Nesta caminhada, muitas foram as barreiras internas e externas até que pudéssemos alcançar a conclusão do mestrado. Ainda assim, em todos os momentos conseguimos encontrar apoio, encorajamento, descontração e alegria pelas conquistas neste companheirismo, mesmo em cenários adversos. Desejo muito sucesso na jornada de vocês, que Deus as abençoe imensamente.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O desenvolvimento sexual humano é um processo que depende do funcionamento íntegro de diversos genes e suas proteínas. Defeitos em algum desses componentes podem causar os distúrbios da diferenciação do sexo (DDS). Os DDS são condições congênitas em que alterações genéticas levam ao desenvolvimento atípico do sexo cromossômico, gonadal e/ou anatômico. O termo DDS, adotado a partir do *Consensus Statement on Management of Intersex Disorders*, substitui termos considerados pejorativos e estigmatizantes, tais como hermafroditismo, pseudo-hermafroditismo, entre outros. Os DDS podem resultar de variações em genes envolvidos na determinação e diferenciação sexual, acarretando em distúrbios na esteroidogênese gonadal e/ou adrenal, sendo classificados em três grupos, de acordo com o cariótipo: DDS 46,XY; DDS 46,XX; e DDS associados a anormalidades cromossômicas. O grupo DDS 46,XY, foco deste trabalho, é caracterizado por sua complexidade genética e sobreposição fenotípica, onde o esclarecimento etiológico desses casos é realizado através de investigação molecular em genes envolvidos na determinação e diferenciação do sexo. **OBJETIVO:** Realizar a investigação molecular em uma série de casos de DDS 46,XY sem etiologia esclarecida. **METODOLOGIA:** A partir de uma amostra de 58 casos de DDS 46,XY atendidos no Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA), foram selecionados 10 casos para estudo. Para a seleção das amostras, foram adotados os seguintes critérios: sequenciamento prévio dos genes *AR* e *SRD5A2*, não possuir alterações patogênicas identificadas nesses genes e amostra de DNA disponível para estudo. A primeira etapa da investigação molecular constituiu-se do sequenciamento do gene *HSD17B3* pelo método de Sanger, realizado no Laboratório de Genética Molecular Humana do HUPAA/UFAL. A segunda etapa, para aqueles casos em que não foram identificadas alterações patogênicas no gene *HSD17B3*, o sequenciamento de nova geração (NGS) de 18 genes relacionados com DDS 46,XY, foi realizado no Núcleo de Sequenciamento de Larga Escala da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Não foram identificadas alterações patogênicas no gene *HSD17B3* em nenhum dos casos selecionados. Já através do NGS, foram identificadas alterações em quatro casos. No caso DDSXY-03, foi identificada a hemizigose da alteração c.89G>T (p.Arg30Ile) no gene *SRY*; no caso DDSXY-04, foi identificada a heterozigose da alteração c.565C>T (p.Arg189Cys) no gene *FKBP4*; no caso DDSXY-07, foi identificada a heterozigose da alteração c.2389C>G (p.Leu797Val) no gene *DHX37*; e no caso DDSXY-10, foi identificada a heterozigose da alteração c.250C>G (p.Arg84Gly) no gene *NR5A1*. A alteração p.Arg84Gly não foi previamente descrita na literatura, a p.Leu797Val foi descrita como variante de significado incerto e a alteração p.Arg189Cys foi reportada em bases de dados, sem referência da condição clínica associada. Já a alteração p.Arg30Ile foi descrita em casos de disgenesia gonadal 46,XY. Nas análises preditivas *in silico*, as alterações p.Arg189Cys; p.Leu797Val e p.Arg84Gly se mostraram deletérias. De acordo com a literatura, a frequência de pacientes diagnosticados com DDS 46,XY sem etiologia esclarecida, pode variar entre 33%-80%, mesmo com os avanços nas ferramentas de elucidação diagnóstica. **CONCLUSÃO:** Neste estudo, 40% da amostra apresentou alterações em genes que são fundamentais na determinação/diferenciação do sexo e permanecem em investigação da possível correlação genótipo-fenótipo. Já 60% permanecem em investigação visando a identificação de alterações patogênicas que possam justificar o fenótipo. A análise funcional das alterações aqui identificadas, são necessárias para a correta correlação genótipo fenótipo em cada caso. Os resultados deste estudo reforçam a complexidade da elucidação etiológica dos DDS 46,XY.

Palavras-chave: DDS 46,XY, Diagnóstico Etiológico, Sequenciamento

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Human sexual development is a process that depends on the normal functioning of several genes and their proteins. Defects in these components can lead to disorders of sexual development (DSD). DSDs are congenital conditions in which genetic alterations lead to atypical development of chromosomal, gonadal, and/or anatomical sexual development. The term DSD, adopted from the Consensus Statement on Management of Intersex Disorders, replaces terms considered pejorative and stigmatizing, such as hermaphroditism, pseudohermaphroditism, and others. DSD can result from variations in genes involved in sexual determination and differentiation, resulting in disorders in gonadal and/or adrenal steroidogenesis. DSD 46,XY; DSD 46,XX; and DSD associated with chromosomal abnormalities are the classifications of DSD. The DSD 46,XY, focus of this research, is characterized by genetic complexity and phenotypic overlap, where the etiological diagnosis is carried out through molecular investigation. **AIM:** Molecular investigation in 46,XY DSD cases. **METHODS:** Ten cases were selected for the study. For sample selection, the following criteria were adopted: prior sequencing of the *AR* and *SRD5A2* genes, no pathogenic alterations identified in these genes, and DNA sample available for investigation. The first molecular analysis was the Sanger sequencing of *the HSD17B3* gene. The second was the next-generation sequencing (NGS) of 18 genes related to 46,XY DSD. **RESULTS AND DISCUSSION:** The *HSD17B3* sequencing was normal in all cases. The NGS revealed alterations in four cases: DDSXY-03 was identified as c.89G>T alteration hemizygoty in the *SRY* gene; in the DDSXY-04 case, the c.565C>T heterozygoty in the *FKBP4* gene; the DDSXY-07 revealed the heterozygoty of c.2389C>G (p.Leu797Val) in the *DHX37*; and the heterozygoty c.250C>G alteration in *NR5A1* in the DDSXY-10. The p.Arg84Gly alteration was not previously described in the literature, the p.Leu797Val was described as a variant of uncertain significance and the p.Arg189Cys alteration was reported in databases, without reference to the clinical condition associated. The p.Arg30Ile alteration has been described in 46,XY gonadal dysgenesis cases. The results of *in silico* predictive analyses of p.Arg189Cys; p.Leu797Val and p.Arg84Gly alterations were deleterious. According to the literature, 33%-80% of patients diagnosed with 46,XY DSD remain without etiology elucidated. **CONCLUSION:** In this study, 40% of the participants presented alterations in genes that are fundamental in the determination/differentiation of sexual development and remain under investigation of the possible genotype-phenotype correlation. Already 60% remain under investigation aimed at identifying pathogenic changes that may justify the phenotype. Functional analysis of the alterations here identified is necessary for the correct genotype-phenotype correlation. These results reinforce the complexity of the etiological elucidation of 46,XY DSD.

Keywords: 46,XY DSD, Etiology, DNA Sequence Analysis

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Visão concisa da diferenciação sexual.....	19
<b>Quadro 2.</b> Outros genes relacionados ao desenvolvimento sexual masculino.....	24
<b>Quadro 3.</b> Genes analisados por meio do sequenciamento de nova geração.....	30
<b>Quadro 4.</b> Alterações encontradas por meio do sequenciamento de nova geração.....	35
<b>Quadro 5.</b> Classificação da alteração p.Arg189Cys, no gene <i>FKBP4</i> , conforme algoritmos utilizados.....	38
<b>Quadro 6.</b> Classificação da alteração p.Leu797Val, no gene <i>DHX37</i> , conforme algoritmos utilizados.....	40
<b>Quadro 7.</b> Classificação da alteração p.Arg84Gly, no gene <i>NR5A1</i> , conforme algoritmos utilizados.....	42

### FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Visão simplificada do desenvolvimento sexual humano.....	18
<b>Figura 2.</b> Síntese dos esteróides a partir do colesterol.....	24
<b>Figura 3.</b> Classificação para ambiguidade genital conforme Quigley.....	25
<b>Figura 4.</b> Visão geral das etapas para o sequenciamento do gene <i>HSD17B3</i> .....	28
<b>Figura 5.</b> Classificação de Quigley.....	33
<b>Figura 6.</b> Heredograma referente ao caso DDSXY-03.....	36
<b>Figura 7.</b> Heredograma do caso DDSXY-04.....	37
<b>Figura 8.</b> Heredograma do caso DDSXY-07.....	39
<b>Figura 9.</b> Heredograma do caso DDSXY-10.....	41

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Genes que interagem com a proteína SF1 ..... 21

**Tabela 2.** Descrição dos casos selecionados com diagnóstico clínico de Distúrbios da Diferenciação do Sexo 46,XY ... 33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg	Arginina
AMH	<i>Anti-mullerian Hormone</i>
AG	Ambiguidade Genital
AR	<i>Androgen Receptor</i>
C	Citosina
Cys	Cisteína
<i>DHX37</i>	<i>DEAH-Box Helicase 37</i>
DDS	Distúrbios da Diferenciação do Sexo
DHT	Dihidrotestosterona
FKBP4	<i>FK506-Binding Protein 4</i>
HAM	Hormônio Anti-Mülleriano
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HMG	<i>high Mobility group</i>
<i>HSD17B3</i>	<i>17-beta hydroxysteroid dehydrogenase III</i>
HUPAA	Hospital Universitário Professor Alberto Antunes
Ile	Isoleucina
G	Guanina
Gly	Glicina
Leu	Leucina
LGMH	Laboratório de Genética Molecular Humana
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
<i>NR5A1</i>	<i>Nuclear Receptor Subfamily 5, Group A, Member 1</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
Q	Quigley
SF-1	<i>Steroidogenic factor 1</i>
SGC	Serviço de Genética Clínica
SIA	Síndrome da Insensibilidade Androgênica
SIPA	Síndrome da Insensibilidade Parcial aos Andrógenos
<i>SOX9</i>	<i>SRY-Related HMG-Box Gene 9</i>
<i>SRD5A2</i>	<i>Steroid 5-alpha-reductase 2</i>
<i>SRY</i>	<i>Sex-determining Region Y chromosome</i>
STAR	<i>Steroidogenic Acute Regulatory Protein</i>

T	Timina
TESCO	<i>testis-specific enhancer of Sox9 core</i>
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
Val	Valina
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
WT1	<i>Wilms tumour 1</i>
17-beta-HSD3	17-beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 3

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	14
2 OBJETIVOS .....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos .....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 Desenvolvimento sexual humano... ..	17
3.2 Genes envolvidos na determinação e diferenciação sexual masculina... ..	18
4 METODOLOGIA .....	27
4.1 Tipo de estudo e aspectos éticos... ..	27
4.2 Local do estudo... ..	27
4.3 Amostra... ..	27
4.4 Ensaio Laboratoriais... ..	27
4.4.1 Da amplificação dos fragmentos ao sequenciamento do gene <i>HSD17B3</i> .....	28
4.4.1.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene <i>HSD17B3</i> .....	29
4.4.1.2 Purificação e Quantificação dos produtos de PCR... ..	29
4.4.1.3 Sequenciamento de Sanger... ..	29
4.4.2 Sequenciamento de Nova Geração - Painel de Genes... ..	30
4.5 Análises preditivas <i>in silico</i> .....	30
4.5.1 <i>SIFT</i> .....	31
4.5.2 <i>PolyPhen-2</i> .....	31
4.5.3 <i>Mutation Taster</i> .....	31

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Caracterização da Amostra.....	32
5.2 Sequenciamento do gene <i>HSD17B3</i> .....	34
5.3 Resultados do Painel Gênico.....	34
5.3.1 Caso DDSXY-03.....	35
5.3.2 Caso DDSXY-04.....	37
5.3.3 Caso DDSXY-07.....	39
5.3.4 Caso DDSXY-10.....	41
5.4 Casos de DDS 46,XY sem etiologia esclarecida.....	42
6 CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICES.....	54
Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 2016 - 2018.....	54
Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para responsáveis 2021 - 2026.....	55
Apêndice C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participantes 2021 - 2026.....	57
ANEXOS.....	59
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa CAAE: 59929716.8.0000.5013.	59
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa CAAE: 40078620.4.0000.5013. ...	63

## 1 INTRODUÇÃO

Os distúrbios da diferenciação do sexo (DDS) são condições congênitas heterogêneas, onde alterações genéticas resultam no desenvolvimento atípico do sexo cromossômico, gonadal e/ou anatômico (Hughes *et al.*, 2006; Hiort *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016; Wisniewski *et al.*, 2019). Essas condições são classificadas em três grandes grupos de acordo com o cariótipo: DDS 46,XY, DDS 46,XX e DDS associados a anomalias nos cromossomos sexuais (Lee *et al.*, 2006).

Embora não seja encontrada informação suficiente sobre a incidência dos DDS, especialmente aqueles caracterizados por ambiguidade genital, estima-se uma incidência mundial de aproximadamente 1:4.500-5.500 nascidos vivos (Sax, 2002; Lee *et al.*, 2016) e uma prevalência global de 1-2:10.000 (Woodward; Patwardhan, 2010; Gazzaneo *et al.*, 2016). Assim, os DDS são reconhecidos como doenças raras, sendo portanto foco de políticas de atenção à saúde em genética no Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil (Brasil, 2014).

Devido à sua complexidade, tanto diagnóstica como no que diz respeito ao acompanhamento, a atenção aos pacientes com DDS requer uma equipe multidisciplinar a fim de proporcionar assistência adequada e minimizar prejuízos causados por essas condições (Hughes *et al.*, 2006; Hughes, 2008; Hiort *et al.*, 2014; Gazzaneo *et al.*, 2016). Dentre as especialidades que colaboram entre si para proporcionar atenção adequada aos pacientes com DDS, estão: a pediatria, genética, endocrinologia, ginecologia, urologia, andrologia, psicologia, serviço social, enfermagem, cirurgia e ética médica (Hiort *et al.*, 2014; Achermann *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2016; Cools *et al.*, 2018).

Em Alagoas, a atenção à saúde em casos de DDS se tornou expressiva a partir de 2008, com a criação de ambulatório integrado de genética e psicanálise do Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA-UFAL). Antes disso, os atendimentos eram realizados de forma fragmentada e sem comunicação entre as diferentes especialidades (Zanotti e da Silva Xavier, 2011; Omena Filho, 2021).

Inicialmente, o ambulatório dos DDS no HUPAA-UFAL integrava em sua abordagem especialistas em genética e psicologia. Com seu desenvolvimento, a partir de 2016, foi formado o grupo multidisciplinar de assistência aos casos de DDS, passando a contar com profissionais de diversas especialidades, tais como: geneticistas, endocrinologistas, cirurgiões, psicólogos, entre outros; oferecendo, assim, assistência com estratégia diagnóstica e

abordagem clínica holística, fruto de discussões integradas entre os profissionais envolvidos (Omena Filho, 2021).

Até o momento, desde sua criação, pouco mais de 300 pacientes passaram por atendimento neste ambulatório, o que tem proporcionado constante desenvolvimento de assistência especializada em genética bem como robustas contribuições em pesquisas no meio acadêmico.

Em relação ao presente trabalho, buscou-se esclarecer a etiologia de diferentes quadros clínicos de DDS 46,XY. Essa condição representa significativa parcela dos pacientes atendidos no ambulatório especializado do Serviço de Genética Clínica e entender suas causas representa um grande desafio. Assim, nossa motivação em realizar este trabalho foi contribuir nessa busca pelo esclarecimento etiológico dos casos estudados; colaborar com o grupo multidisciplinar de assistência aos casos de DDS de Alagoas; além de contribuir com o fortalecimento da pesquisa realizada no HUPAA-UFAL.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Realizar investigação molecular em casos selecionados de DDS 46,XY de Alagoas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Averiguar o envolvimento do gene *HSD17B3* em casos de DDS 46,XY que não possuem alterações patogênicas nos genes *AR* e *SDR5A2*;
- Expandir a investigação molecular nos casos que não apresentaram alteração patogênica no *HSD17B3*, bem como no *AR* e *SRD5A2*;
- Realizar análise preditiva *in silico* para as alterações patogênicas novas identificadas;
- Estabelecer a correlação genótipo-fenótipo para os casos com alterações identificadas.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### Desenvolvimento sexual humano

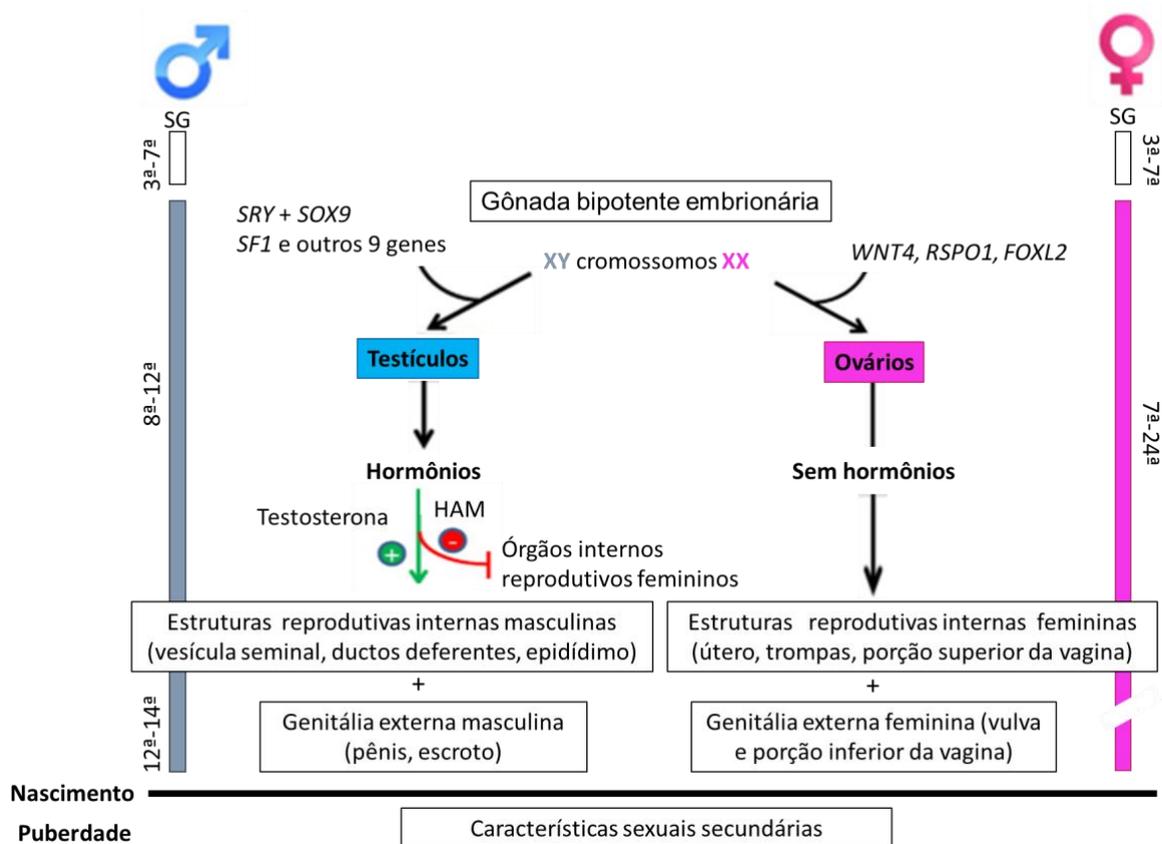
O desenvolvimento sexual humano é um processo intrinsecamente associado à presença ou ausência do cromossomo Y e pode ser dividido em duas etapas principais: (i) determinação sexual e (ii) diferenciação sexual (Arboleda; Sandberg; Vilain, 2014). A determinação sexual ocorre no momento da fertilização, ao ser estabelecido o sexo cromossômico como XX ou XY. Já a diferenciação sexual, seja masculina ou feminina, é o processo orientado pela determinação sexual no qual as gônadas bipotentes se diferenciam em ovários ou testículos, seguido da diferenciação da genitália interna e externa sob ação hormonal (Hughes, 2001; Lucas-Herald; Bashamboo, 2014; Bashamboo *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2022).

Até a 6<sup>a</sup> semana de vida embrionária, temos um período chamado de estágio indiferenciado ou bipotencial do desenvolvimento gonadal. Neste período, indivíduos XX ou XY apresentam gônadas indiferenciadas aparentemente idênticas que poderão se diferenciar em ovários ou testículos, a depender da determinação sexual (Rey; Josso; Racine, 2020).

Em indivíduos com sexo cromossômico masculino (46,XY), o gene *SRY* (do inglês, *sex-determining region Y chromosome*), localizado no cromossomo Y, dá início ao processo de diferenciação das gônadas em testículos (Sinclair *et al.*, 1990; Berta *et al.*, 1990). Em seguida, outros genes e fatores de transcrição, como o *SF-1* (do inglês, *steroidogenic factor 1*) e o *SOX9* (do inglês, *SRY-related HMG-box gene 9*), são expressos e dão continuidade ao desenvolvimento testicular (Biason-Lauber; Chaboissier, 2015). Diversos genes são envolvidos na diferenciação sexual masculina, esses e outros serão abordados no decorrer desta revisão.

Diante da formação de testículo, as células de Sertoli produzem Hormônio Anti-Mülleriano (HAM) e as células de Leydig, Testosterona, levando a regressão dos ductos de Müller (primórdios dos genitais internos femininos) e a diferenciação dos ductos de Wolff (primórdios dos genitais internos masculinos) em epidídimo, ductos deferente e vesícula seminal. A diferenciação da genitália interna masculina se dá célula a célula mediante ação parácrina desses hormônios, enquanto a genitália externa é formada pela concentração necessária de andrógenos na corrente sanguínea (Biason-Lauber; Chaboissier, 2015; Michelatto, 2016).

Por outro lado, na ausência do *SRY*, indivíduos com sexo cromossômico feminino (46,XX) passam por uma via de diferenciação gonadal direcionada pela expressão ativa de outros genes, tais como *WNT4* (do inglês, *wingless type MMTV integration site family, member 4*), *RSPO1* (do inglês, *R-spondin 1*) e *FOXL2* (do inglês, *forkhead box L2*). Esses genes são importantes para o desenvolvimento ovariano, diferenciação dos ductos de Müller, supressão da diferenciação masculina, entre outros processos resultantes da determinação ovariana (Figura 1) (Bian-Lauber; Chaboissier, 2015; Bashamboo; McElreavey, 2015; Michelatto, 2016).



**Figura 1.** Visão simplificada do desenvolvimento sexual humano. SG: semana gestacional. *SRY*: *sex determining region Y*; *SOX9*: *SRY-related HMG-box gene 9*; *WNT4*: *wingless-type MMTV integration site family member 4*; *RSPO1*: *R-spondin 1*. Fonte: Michelatto, 2016 *apud* Bion-Lauber; Chaboissier, 2015.

### Genes envolvidos na determinação e diferenciação sexual masculina

Embora, desde a metade do século passado houvesse o entendimento de que a diferenciação sexual era definida apenas pela presença ou ausência do cromossomo Y, atualmente sabe-se que tanto a diferenciação feminina como a masculina dependem de uma

cascatas de genes que conduzem as ações hormonais fundamentais desse processo (Quadro 1) (Biaison-Lauber; Chaboissier, 2015; Maciel-Guerra; Guerra-Junior, 2019).

**Quadro 1.** Visão concisa da diferenciação sexual.

<b>Cariótipo</b>	<b>46,XY</b>	<b>46,XX</b>
<b>Gônadas</b>	Testículos	Ovários
<b>Ações</b>	<p>Células de Leydig: secreção de Testosterona e DHT</p> <p>↳ responsáveis pela virilização da genitália externa e manutenção dos ductos de Wolff</p> <p>Células de Sertoli: produção de hormônio antimülleriano (HAM)</p> <p>↳ regressão dos ductos de Müller</p>	<p>Não produção de Testosterona e HAM</p> <p>↳ regressão dos ductos de Wolff</p> <p>↳ diferenciação dos ductos de Müller no genitais internos femininos</p> <p>↳ desenvolvimento da genitália externa feminina</p>

DHT - Dihidrotestosterona; HAM - hormônio antimülleriano

Fonte: de autoria própria a partir de Maciel-Guerra; Guerra-Junior, 2019.

O gene *SRY*, localizado no braço curto do cromossomo Y (Yp11.2), foi o primeiro a ser identificado como responsável por iniciar a diferenciação das gônadas bipotentes em testículos, sendo considerado o fator determinante para o desenvolvimento das gônadas masculinas em humanos (Sinclair *et al.*, 1990; Berta *et al.*, 1990). O *SRY* (OMIM \*480000) é constituído por um único éxon e codifica uma proteína de 204 aminoácidos, onde encontra-se um domínio de ligação ao DNA de 80 aminoácidos bem conservados da família *HMG-box* (do inglês, *high mobility group*). A proteína *SRY* é expressa nas células pré-Sertoli no fim da segunda semana de gestação, sendo um importante fator de transcrição que intensifica a expressão de outra proteína necessária ao início da diferenciação das gônadas em testículos, a *SOX9*. Segundo o *The Human Gene Mutation Database (HGMD)*, até agosto de 2023 foram descritas 110 alterações patogênicas no gene *SRY*, sendo a maioria relacionada a quadros de disgenesia gonadal completa 46,XY (Sinclair *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991; Sekido *et al.*, 2004; Maciel-Guerra; Guerra-Júnior, 2019).

O gene *SOX9* (do inglês, *SRY-related HMG-box gene 9* - OMIM \*608160), localizado no braço longo do cromossomo 17 (*locus* 17q24.3), é responsável pela produção de prostaglandina D2, molécula lipídica importante para a transformação das células pré-Sertoli. A proteína *SRY* liga-se especificamente a uma região regulatória do *SOX9* denominada *TESCO* (do inglês, *testis-specific enhancer of SOX9 core*), que leva à diferenciação e à proliferação das células de Sertoli. Alterações patogênicas no *SOX9* estão ligadas a síndromes

de malformações esqueléticas e casos de disgenesia gonadal 46,XY, em que é observada genitália externa ambígua ou de aspecto feminino (Wilhelm; Palmer; Koopman, 2007; Sekido; Lovell-Badge, 2008; Gonen *et al.*, 2018).

Outro gene fundamental para a diferenciação testicular é o *NR5A1* (do inglês, *nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1* - OMIM \*184757), *locus* 9q33.3, que codifica a proteína SF1 (do inglês, *steroidogenic factor-1*), um fator de transcrição que assim como o *SRY*, se liga ao TESCO do gene *SOX9*, o auxiliando a interagir com seu próprio promotor. Nessa interação é gerado então um *feedback* positivo nas células de Sertoli, que garante sua expressão em altos níveis e contribui fundamentalmente tanto na esteroidogênese como no desenvolvimento sexual, além de ser um regulador em etapas do desenvolvimento adrenal e gonadal (Sekido; Lovell-Badge, 2008; Achermann *et al.*, 2002; Maciel-Guerra; Guerra-Júnior, 2019).

Ainda acerca do *NR5A1*, a proteína SF1 atua tanto na determinação testicular como na diferenciação sexual masculina. Sua primeira ação ocorre na crista urogenital, marcando o início da diferenciação adrenal e gonadal, onde as gônadas bipotentes são estimuladas a se diferenciar em testículos. A SF1 também interage com a GATA4 (do inglês, *gata-binding protein 4*), um fator de transcrição que atua na gônada indiferenciada, ocasião em que ambos se acoplam a região promotora do *SRY* e o auxiliam no aumento de sua expressão no início da diferenciação testicular. Nas células de Sertoli presentes nos testículos já diferenciados, a SF1 regula a expressão do gene *AMH* (do inglês, *anti-mullerian hormone*), guiando o processo de regressão dos ductos de Müller. Já nas células de Leydig, essa proteína regula a expressão de genes importantes para a síntese de testosterona, como *STAR* (do inglês, *steroidogenic acute regulatory protein*) e o gene *DHH* (do inglês, *desert hedgehog*), conduzindo à manutenção dos ductos de Wolff e à virilização da genitália externa (Ozisik; Achermann; Jameson, 2002; Viger *et al.*, 2008; Lin; Achermann, 2008; Karpova *et al.*, 2015).

O *NR5A1* possui mais de 218 alterações patogênicas descritas (segundo dados do *HGMD* consultados em agosto de 2023) relacionadas em sua maioria com casos de DDS 46,XY. Os fenótipos associados às alterações são extremamente variados, podendo estar relacionados à defeitos na produção de andrógenos; disgenesia gonadal (com ou sem derivados de Müller); hipospádia; anorquia bilateral; entre outros (Fabbri *et al.*, 2016; Fabbri-Scallet *et al.*, 2017; Robevska *et al.*, 2018).

É importante destacar que na literatura há diversas alterações patogênicas descritas em genes que interagem com a SF1, resultando em fenótipos variados de DDS 46,XY (Tabela 1) (Nishi *et al.*, 2012; Yüksel *et al.*, 2013; Werner *et al.*, 2015; Sreenivasan *et al.*, 2018).

**Tabela 1.** Genes que interagem com a proteína SF1.

Gene	Localização	N.º de alterações patogênicas (HGMD)*	Fenótipo frequentemente associado
<i>AMH</i> (OMIM *600957)	19p13.3	95	Síndrome da persistência dos ductos de Müller
<i>STAR</i> (OMIM *600617)	8p11.23	85	Hiperplasia Adrenal Congênita Lipóide
<i>DHH</i> (OMIM *605423)	12q13.12	22	Disgenesia Gonadal 46,XY
<i>GATA4</i> (OMIM *600576)	8p23.1	157	Defeitos cardíacos congênitos / Disgenesia Gonadal 46,XY
<i>SOX9</i> (OMIM *608160)	17q24.3	153	Displasia Campomélica / DDS 46,XY

*AMH* – do inglês, *anti-müllerian hormone*; *STAR* – do inglês, *steroidogenic acute regulatory protein*; *DHH* – do inglês, *desert hedgehog*; *GATA4* – do inglês, *GATA-binding protein 4*; *SOX9* – do inglês, *SRY-related HMG-box gene 9*.

\*Informações de números de alterações patogênicas extraídas do *The Human Gene Mutation Database*, consultados em agosto de 2023.

Além desses, o gene *WT1* (do inglês, *wilms tumour 1* - OMIM \*607102), *locus* 11p13, é essencial para o desenvolvimento gonadal e renal. O RNA mensageiro deste gene pode ser detectado a partir da 6ª semana de gestação em embriões humanos, sua expressão se dá juntamente com o *NR5A1* nas saliências das gônadas bipotentes antes da sua diferenciação. Após diferenciação testicular, a transcrição do *WT1* segue nas células de Sertoli do testículo fetal (Kreidberg *et al.*, 1993; Hastie, 2017; Maciel-Guerra; Guerra-Júnior, 2019). Foram descritas cerca de 193 alterações patogênicas neste gene (HGMD, julho de 2023), as quais podem levar a enfermidades renais, tais como: tumor de Wilms e síndromes como de WAGR (do inglês, *wilms tumor, aniridia, genitourinary anomalies, and mental retardation syndrome*), além das síndromes de Denys-Drash e síndrome de Frasier, que apresentam problemas renais associados com a presença de gônadas disgenéticas e genitália ambígua (ou feminina) em indivíduos 46,XY (Andrade *et al.*, 2008; Guaragna *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2021a).

Dos genes que possuem relação direta com a proteína WT1, é interessante destacar o *NR0B1* (do inglês, *nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1*), também conhecido por *DAX1*, *locus* Xp21.2 em uma região chamada DSS (do inglês, *dosage sensitive sex reversal*). O *NR0B1* (OMIM\*300473) é expresso principalmente nas glândulas adrenais e nos testículos. Deleções ou alterações patogênicas neste gene podem levar a doenças de herança ligada ao cromossomo X, como casos de hipoplasia adrenal congênita e hipogonadismo

hipogonadotrófico. Além de que a sua duplicação resulta em disgenesia gonadal XY com fenótipo feminino, devido à sua super expressão que é suficiente para impedir a determinação testicular (Barbaro *et al.*, 2007; Suntharalingham *et al.*, 2015; Bertalan *et al.*, 2019).

Outros dois genes localizados no cromossomo X estão relacionados com fenótipos de DDS 46,XY em casos de alterações patogênicas, são eles o *ATRX* (do inglês, *alpha-thalassemia/mental retardation syndrome, X-linked*) e o *MAMLD1* (do inglês, *mastermind-like domain-containing protein 1*).

O gene *ATRX* (OMIM\*300032), chamado também de *XH2* (do inglês, *Helicase 2, X-Linked*), está localizado em Xq21.1 e codifica a proteína *ATRX*, que regula negativamente a transcrição de vários genes, incluindo os da alfa-globina. A expressão do *ATRX* acontece durante a diferenciação testicular principalmente, enquanto ocorre a maturação das células de Leydig. Alterações patogênicas nesse gene podem levar a síndrome *ATRX*, onde indivíduos afetados apresentam  $\alpha$ -talassemia, deficiência intelectual grave e múltiplas anomalias congênitas, como a ambiguidade genital (Tang *et al.*, 2004; Hutson *et al.*, 2014; Takagi *et al.*, 2017).

O gene *MAMLD1* (OMIM\*300120), também denominado de *CXorf6*, *locus* Xq28, é expresso nas células de Leydig fetais em conjunto com o *NR5A1* auxiliando a modulação da produção de testosterona. De acordo com o HGMD, cerca de 20 alterações patogênicas foram descritas no *MAMLD1* (HGMD, agosto de 2023), estando associadas principalmente com casos de DDS 46,XY. (Ogata *et al.*, 2012; Maciel-Guerra; Guerra-Júnior, 2019; Miyado; Fukami; Ogata, 2021).

Além dos genes já abordados neste tópico, é importante dizer que para a virilização do fenótipo masculino é necessário concentrações adequadas de andrógenos, bem como a funcionalidade ideal de seus receptores. Neste processo, alguns genes são ligados diretamente a ação e conversões enzimáticas, tais como *AR*, *SRD5A2* e *HSD17B3*. Alterações patogênicas nesses genes frequentemente justificam fenótipos de DDS 46,XY.

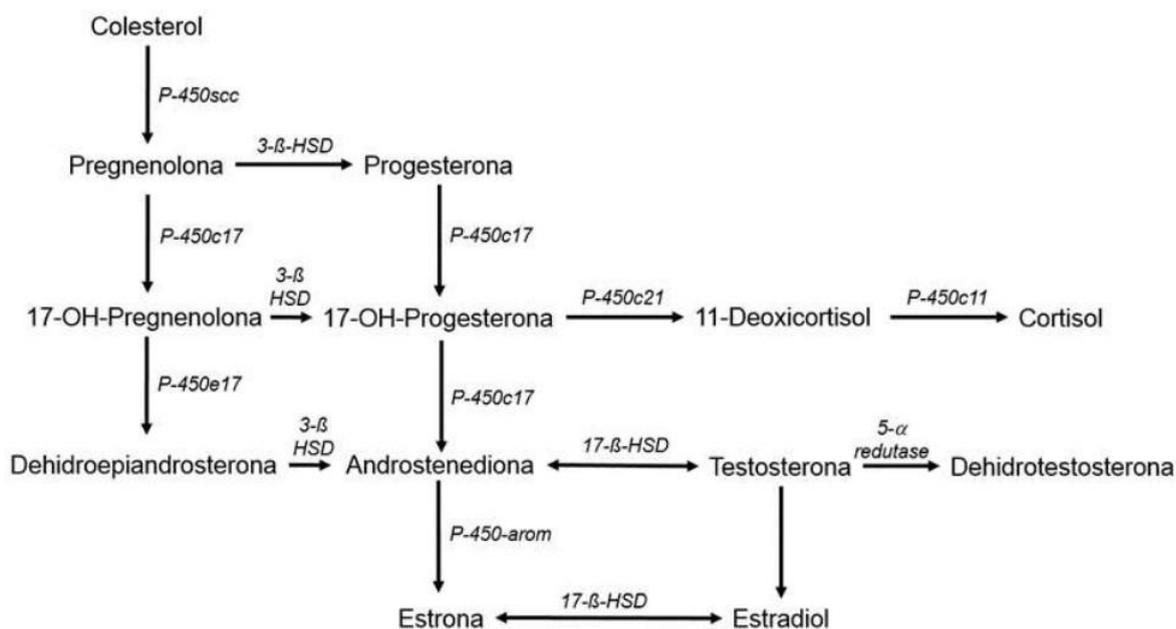
O gene *AR* (do inglês, *androgen receptor*, OMIM \*313700), *locus* Xq12, codifica o receptor de andrógeno, um fator de transcrição que, quando ativado por ligante, regula a expressão de genes responsivos a andrógenos nos tecidos-alvo. Alterações patogênicas no *AR* levam à Síndrome da Insensibilidade Androgênica (SIA), um distúrbio monogênico recessivo ligado ao cromossomo X caracterizado pela resistência à ação dos andrógenos. A depender do grau de resistência e, conseqüentemente, da subvirilização observada, a SIA pode ser classificada como completa, parcial ou branda (Petroli, 2010; Hughes *et al.*, 2012; Chen *et al.*,

2023). Cerca de 635 alterações patogênicas foram descritas no *AR*, sendo sua maioria associada a SIA (*HGMD*, agosto de 2023).

O gene *SRD5A2* (do inglês, *steroid 5-alpha-reductase 2*, OMIM \*607306), localizado em 2p23, codifica a proteína 5 alfa-redutase tipo 2, expressa principalmente nos epidídimos, vesículas seminais, próstata e pele genital. Sua função é converter a Testosterona em Dihidrotestosterona (DHT), responsável pelo desenvolvimento sexual masculino. A perda de função da 5 alfa-redutase tipo 2 resulta na deficiência de DHT, levando ao prejuízo da diferenciação da genitália externa masculina, uretra e próstata. Até o momento, o *SRD5A2* possui cerca de 136 alterações patogênicas descritas e associadas com a Deficiência de 5 alfa-redutase tipo 2 (*HGMD*, agosto 2023) (Zhang *et al.*, 2017; Sata *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2022).

O gene *HSD17B3* (do inglês, *17-beta hydroxysteroid dehydrogenase III*, OMIM \*605573), *locus* 9q22, abrange cerca de 60kb, possui 11 éxons e codifica a enzima 17-beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 3 (17-beta-HSD3) (Phelan *et al.*, 2015; Mendonca *et al.*, 2017). O *HSD17B3* é expresso em tecidos periféricos, principalmente nos testículos, onde a enzima 17beta-HSD3 converte andrógenos adrenais em hormônios sexuais mais potentes, a saber androstenediona e estrona em testosterona e estradiol, respectivamente (Figura 2) (Gonçalves *et al.*, 2022; Çiftci *et al.*, 2022).

Alterações patogênicas em homozigose ou heterozigose composta no *HSD17B3* causam deficiência de 17beta-HSD3, havendo comprometimento da síntese de esteróides, sem prejuízos da síntese de mineralocorticoides e glicocorticoides adrenais. Indivíduos 46,XY com deficiência de 17beta-HSD3, apresentam diferentes graus de subvirilização da genitália externa (Geissler *et al.*, 1994; Andersson *et al.*, 1996; Mendonca *et al.*, 2017). Até o momento mais de 65 alterações patogênicas foram descritas (*HGMD*, agosto de 2023), incluindo alterações *missense*, *nonsense*, *stop codon*, *frameshift*, alterações em sítio de *splicing*, deleções, inserções e duplicações, associadas a DDS 46,XY devido a deficiência de 17beta-HSD3.



**Figura 2.** Síntese dos esteróides a partir do colesterol. Pode-se observar o ponto de conversão de Testosterona em DHT pela 5  $\alpha$ -redutase tipo 2; e a conversão de Androstenediona em Testosterona, bem como Estrona em Estradiol pela 17  $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 3 (Retirado de Monteiro *et al.*, 2018).

Além dos supracitados, outros genes atuam no desenvolvimento sexual masculino e determinação testicular, alguns deles estão apresentados no Quadro 2 (Tannour-Louet *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2021b; Ivell *et al.*, 2022; Hart; Gutiérrez; Biason-Lauber, 2022).

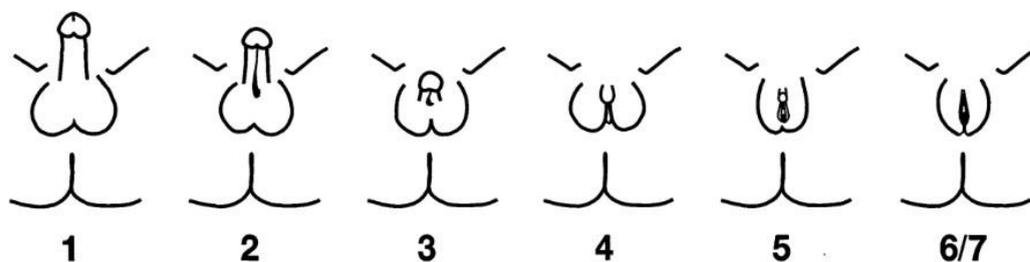
**Quadro 2.** Outros genes relacionados ao desenvolvimento sexual masculino.

Gene	Localização	Fenótipo frequentemente associado
<i>DMRT1</i> e <i>DMRT2</i> (OMIM*602424 e OMIM*604935)	9p24.3	Disgenesia Gonadal 46,XY
<i>CBX2</i> (OMIM*602770)	17q25.3	DDS 46,XY
<i>MAP3K1</i> (OMIM*600982)	5q11.2	Disgenesia Gonadal 46,XY
<i>WWOX</i> (OMIM*605131)	16q23.2-q23.2	DDS 46,XY
<i>INSL3</i> (OMIM*146728)	19p13.2-p2	Criptorquidismo

*DMRT1* e *DMRT2* - do inglês, *doublesex- and mab3-related transcription factor 1 e 2*; *CBX2* - do inglês, *chromobox homolog 2, drosophila polycomb class*; *MAP3K1* - do inglês, *mitogen-activated kinase kinase kinase 1*; *WWOX* - do inglês, *WW domain-containing oxidoreductase*; *INSL3* - do inglês, *insulin-like 3*.

Quando alterações patogênicas acontecem nos genes acima citados, estamos diante de uma caso de DDS 46,XY, que caracterizam-se por variados graus de subvirilização da genitália externa, classificadas conforme Quigley (Figura 3) (Quigley *et al.*, 1995), e

diferentes graus de desenvolvimento de estruturas derivadas dos ductos de Wolff e Müller (Mendonca *et al.*, 2009; Wisniewski *et al.*, 2019).



**Figura 3.** Classificação para ambiguidade genital conforme Quigley (Quigley *et al.*, 1995). Grau 1: genitália com aspecto masculino normal; grau 2: fenótipo masculino com distúrbios leves, como hipospádia; grau 3: fenótipo masculino com subvirilização grave; graus 4-7: representados por genitália ambígua, onde o grau mais avançado (6/7) inclui casos com aspecto feminino típico.

Fonte: Quigley *et al.*, 1995 (Adaptado).

Os DDS 46,XY podem ser decorrentes de: (i) deficiências na síntese de testosterona e/ou di-hidrotestosterona (DHT); ou (ii) prejuízo da ação androgênica nos tecidos-alvos. Em casos de DDS 46,XY com virilização parcial, o diagnóstico frequentemente ocorre ao nascimento, diante de uma incongruência genital. Quadros mais brandos podem apresentar hipospádia, localização atípica do meato uretral. Em outros casos, observa-se a presença de ambiguidade genital. A maioria dos afetados possuem testículos, contudo, em alguns casos não é encontrado tecido gonadal. Observa-se, ainda, genitália externa de aspecto típico feminino em casos de completa ausência de virilização, o que retarda o diagnóstico até a puberdade, quando é apontada amenorreia primária e/ou a ausência de desenvolvimento mamário como queixa clínica (Domenice *et al.*, 2016; Kutney *et al.*, 2016; Markosyan; Ahmed, 2017; Domenice *et al.*, 2022).

O desenvolvimento sexual masculino é um processo complexo e variações nos genes envolvidos neste processo podem resultar nos DDS 46,XY (Bashamboo *et al.*, 2017).

O sequenciamento de genes únicos é um método historicamente escolhido para o esclarecimento etiológico dos DDS. A partir do levantamento de características fenotípicas e hormonais por exames físicos, de imagem, solicita-se o sequenciamento de genes candidatos que possam esclarecer a etiologia do quadro clínico observado (Barseghyan; Délot; Vilain, 2018).

O diagnóstico molecular por meio de sequenciamento genético de primeira geração, como é o método de Sanger (Sanger; Coulson, 1975), é amplamente utilizado para elucidação de casos de DDS 46,XY. O método de Sanger faz uso de didesoxinucleotídeos de terminação

de cadeia marcados com fluorescência, proporcionando fragmentos de DNA de até 1000 pares de base de resolução (Barseghyan; Délot; Vilain, 2018). A depender dos aspectos clínicos e hormonais, pode-se sugerir em DDS 46,XY o sequenciamento de alguns genes como: *AR*, *SRD5A2*, *HSD17B3*, *NR5A1*, *SRY* e *WT1* (Wisniewski *et al.*, 2019; Mazen *et al.*, 2021).

Entretanto as técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS – do inglês, *Next-Generation Sequencing*), como painel de genes, sequenciamento de exoma completo (WES – do inglês, *Whole Exome Sequencing*) e sequenciamento de genoma completo (WGS – do inglês, *Whole Genome Sequencing*), têm permitido uma melhora significativa na elucidação diagnóstica de casos de DDS 46,XY. Em vantagem ao sequenciamento de genes individuais, estas técnicas identificam simultaneamente diversas alterações em genes conhecidos, bem como novos genes candidatos que possam ser relacionados a DDS (Achermann *et al.*, 2015; Eggers *et al.*, 2016; Hughes *et al.*, 2019).

Com a redução dos custos com NGS, sua aplicabilidade tem se tornado cada vez mais difundida no diagnóstico de DDS. A possibilidade de sequenciar simultaneamente vários genes relacionados a esses distúrbios, atrelada à investigação clínica e bioquímica inicial, pode levar a elucidação etiológica com brevidade. O diagnóstico etiológico dos casos de DDS é de grande importância, pois permite aconselhamento genético adequado, além de nortear o tratamento personalizado de pacientes, melhor planejamento estratégias de intervenção e melhor prognóstico (Ahmed *et al.*, 2013; Hughes *et al.*, 2019).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Tipo de estudo e aspectos éticos

Trata-se de um estudo descritivo, observacional, com amostra oriunda da casuística do ambulatório de DDS/HUPAA/UFAL. Este estudo possui aprovação pelo comitê de ética em pesquisa da UFAL (CAAE: 59929716.8.0000.5013; 40078620.4.0000.5013; Anexos A e B, respectivamente).

### 4.2 Local do estudo

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA), pertencente à Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e no Laboratório de Sequenciamento de Larga Escala (SELA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP).

### 4.3 Amostra

A amostra estudada foi obtida da casuística do Serviço de Genética Clínica (SGC/HUPAA/UFAL). Foram selecionados casos de DDS com cariótipo 46,XY, que possuem avaliação molecular completa dos genes *AR* (do inglês, *Androgen Receptor*, OMIM \*313700) e *SRD5A2* (do inglês, *Steroid 5-alpha-reductase 2*, OMIM \*607306) sem identificação de alterações patogênicas, além de DNA disponível para investigação molecular.

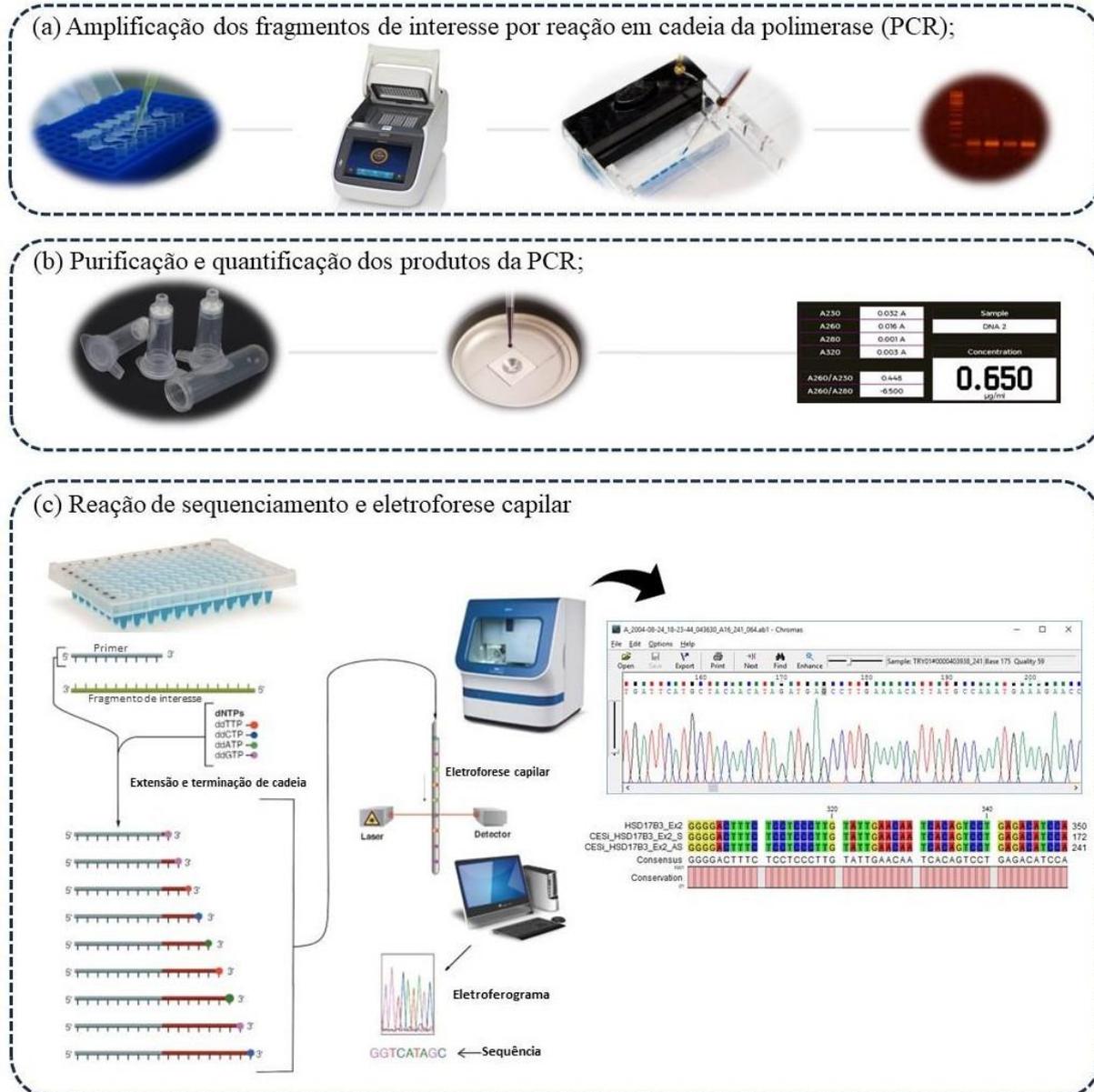
### 4.4 Ensaio Laboratoriais

Primeiramente, os participantes desta pesquisa tiveram suas amostras submetidas a estudo do gene *HSD17B3* por meio de sequenciamento automático pelo método de Sanger (Sanger; Coulson, 1975). Não encontrando alterações patogênicas no *HSD17B3*, as amostras foram submetidas ao sequenciamento de Nova Geração (em inglês, *Next-generation Sequencing*).

#### 4.4.1 Da amplificação dos fragmentos ao sequenciamento do gene *HSD17B3*

Para a realização do sequenciamento do gene *HSD17B3*, foi necessário realizar diferentes processos, desde a amplificação dos fragmentos através da PCR; purificação e quantificação deste material e a reação de sequenciamento (Figura 4).

### Etapas para reação de sequenciamento do gene *HSD17B3*



**Figura 4.** Visão geral das etapas para o sequenciamento do gene *HSD17B3*. (a) amplificação dos fragmentos de interesse por reação em cadeia da polimerase (PCR); (b) purificação e quantificação dos fragmentos amplificados; (c) reação de sequenciamento e eletroforese capilar, para gerar as sequências a serem analisadas.

Fonte: imagens retiradas do Google Imagens e de acervo próprio do autor.

A seguir, será explanado um pouco de cada um desses processos:

#### 4.4.1.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene *HSD17B3*

A amplificação dos 11 éxons e regiões intrônicas flanqueadoras do gene *HSD17B3* se deu por meio de PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*). O método adotado foi realizado conforme descrito por Leme de Calais, 2010.

#### 4.4.1.2 Purificação e Quantificação dos produtos de PCR

A purificação dos fragmentos amplificados foi realizada com o kit *ReliaPrep<sup>TM</sup> DNA Clean-up and Concentration System* (PROMEGA) conforme instruções do fabricante.

Após a purificação, a quantificação deu-se com a utilização de espectrofotômetro de ultravioleta visível BioDrop TOUCH PC da *BioDrop Ltd*. A quantificação dos produtos de PCR purificados se deu da seguinte forma: foi utilizado 1µL de água ultrapura como referência (branco), o mesmo volume do produto foi pipetado no dispositivo para análise, os valores obtidos foram utilizados para avaliação da concentração de DNA no material, além da pureza, para que fosse seguida as demais etapas.

#### 4.4.1.3 Sequenciamento de Sanger

As reações de sequenciamento foram realizadas com *BigDye<sup>TM</sup> Terminator v3.1* da *applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific*, conforme instruções do fabricante.

Após a reação de sequenciamento, os produtos foram submetidos a purificação com kit *BigDye<sup>®</sup> X-Terminator<sup>TM</sup> Purification Kit* da *applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific*, conforme instruções do fabricante.

Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese capilar no analisador de DNA ABI3500 (*Thermo Fisher Scientific*). As sequências obtidas foram analisadas com programas de livre acesso e comparadas com sequência de referência (ENSG00000130948), para que fosse rastreada qualquer variação entre as sequências obtidas e a sequência selvagem de referência.

#### 4.4.2 Sequenciamento de Nova Geração - Painel de Genes

A amostra de DNA genômico daqueles participantes que não apresentaram alteração patogênica no gene *HSD17B3*, foram enviadas ao laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP), onde foram submetidas ao sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês, *Next-generation sequencing*) para análise dos genes *AMH*, *ATRX*, *CBX2*, *DHH*, *DHX37*, *DMRT1*, *DMRT2*, *FKBP4*, *GATA4*, *INSL3*, *MAMLD1*, *MAP3K1*, *NR0B1*, *NR5A1*, *SOX9*, *SRY*, *WT1* e *WWOX*, todos relacionados a DDS 46,XY (Quadro 3).

**Quadro 3.** Genes analisados por meio do sequenciamento de nova geração.

Nome do Gene		OMIM*
<i>AMH</i>	<i>Anti-mullerian hormone</i>	600957
<i>ATRX</i>	<i>ATRX chromatin remodeler</i>	300382
<i>CBX2</i>	<i>Chromobox 2</i>	602770
<i>DHH</i>	<i>Desert hedgehog signaling molecule</i>	605423
<i>DHX37</i>	<i>DEAH-box helicase 37</i>	617362
<i>DMRT1</i>	<i>Doublesex- and MAB3-related transcription factor 1</i>	602424
<i>DMRT2</i>	<i>Doublesex- and MAB3-related transcription factor 2</i>	604935
<i>FKBP4</i>	<i>FK506-binding protein 4</i>	600611
<i>GATA4</i>	<i>GATA-binding protein 4</i>	600576
<i>INSL3</i>	<i>Insulin-like 3</i>	146738
<i>MAMLD1</i>	<i>Mastermind-like domain-containing protein 1</i>	300120
<i>MAP3K1</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>	600982
<i>NR0B1</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 0, Group B, Member 1</i>	300473
<i>NR5A1</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 5, Group A, Member 1</i>	184757
<i>SOX9</i>	<i>SRY-box 9</i>	608160
<i>SRY</i>	<i>Sex-determining region Y</i>	480000
<i>WT1</i>	<i>WT1 transcription factor</i>	607102
<i>WWOX</i>	<i>WW domain-containing oxidoreductase</i>	605131

\*OMIM: do inglês, *Online Mendelian Inheritance in Man*.

#### 4.5 Análises preditivas *in silico*

Para variantes novas, a análise preditiva foi realizada utilizando os seguintes *softwares* de livre acesso: *SIFT* (*Sorting Intolerant From Tolerant*) (<http://sift-dna.org>); *PolyPhen-2* (*Polymorphism Phenotyping*) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>); *Mutation Taster*

(<http://www.mutationtaster.org/>). Por meio destes algoritmos, foi possível prever o efeito da alteração na proteína em estudo (Richards *et al.*, 2015).

#### 4.5.1 SIFT

O *SIFT* é um programa que busca prever modificações na atividade proteica devido a substituições de aminoácidos e como provavelmente afetará o fenótipo investigado, possuindo precisão de 60% em suas previsões. O programa utiliza algoritmos para prever o comprometimento da proteína, considerando o local e o tipo da troca de aminoácidos. Alterações em regiões mais conservadas na proteína, tendem a ser classificadas como deletérias (SIM *et al.*, 2012). O *score* classifica as variantes em tolerantes ( $>0,05$ ) ou intolerante/deletérias ( $<0,05$ ).

#### 4.5.2 PolyPhen-2

O *score* do *PolyPhen-2* avaliou o impacto na troca de aminoácidos predizendo a alteração da função e estrutura da proteína. Sua precisão é de 81% (Adzhubei *et al.*, 2010). O *PolyPhen-2* possui um *score* variando de 0.0 a 1.0, sendo classificadas as substituições em:

- 0.0 a 0.15 - Benignas
- 0.15 a 0,85 - Possivelmente deletérias.
- 0,85 a 1.0 - Maior probabilidade de ser deletérias ou provavelmente deletérias.

#### 4.5.3 Mutation Taster

*Mutation Taster* diferiu dos demais porque inclui em seu banco de dados, SNPs (do inglês, *Single nucleotide polymorphisms*) publicamente disponíveis e inserções/deleções do projeto *1000 Genomas*, assim como variantes patogênicas descritas no “*ClinVar*” e “*HGMD*”. Possui *score* que varia entre 0.0 e 215, quanto mais próximo de 0.0 a variante é considerada neutra e quanto mais próxima de 215, mais deletéria. Este *software* possui precisão de 86%. (Schwarz *et al.*, 2014).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização da Amostra

Após a aplicação dos critérios adotados para seleção da amostra, a saber: casos de DDS 46,XY com avaliação molecular completa dos genes *AR* e *SRD5A2*, sem a identificação de alterações patogênicas nesses genes e DNA disponível para estudo; obtivemos uma amostra de dez casos.

Os participantes compreenderam crianças de seis dias a um ano e três meses de vida na primeira consulta, onde sete desses participantes passaram pelo atendimento em idade adequada (<90 dias). Quanto à procedência, dois casos foram oriundos da capital e oito de outros municípios de Alagoas. Mesmo sendo uma amostra pequena, esses dados de procedência parecem refletir o contexto geral dos casos de ambiguidade genital atendidos no serviço de referência do estado. Um estudo transversal e descritivo realizado por Omena Filho (2021), demonstrou que aproximadamente 80% dos casos de ambiguidade genital atendidos no SGC/HUPAA/UFAL são procedentes do interior do estado.

Três participantes possuíam registro civil como sexo masculino, quanto ao sexo social, oito foram masculino e dois feminino. Questões acerca do registro civil e a atribuição do sexo de criação para pessoas com DDS são de particular importância, decisões neste aspecto necessitam de análises abrangentes para que haja apropriada atribuição e subsequente registro civil (Gazzaneo *et al.*, 2016).

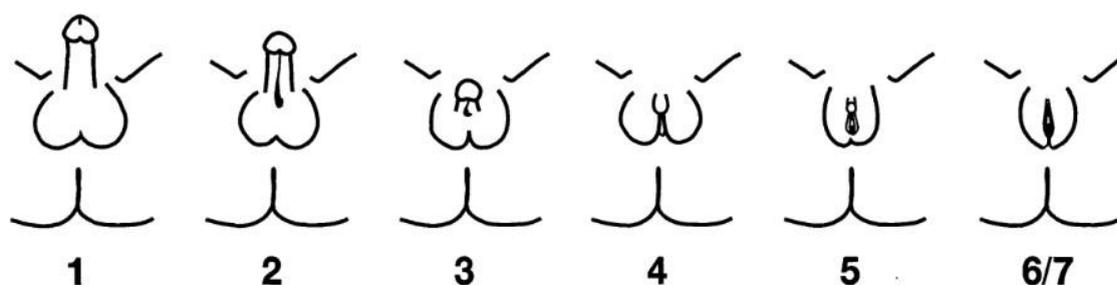
Sobre os aspectos clínicos, todos os participantes apresentavam ambiguidade genital (AG), que foi classificada conforme Quigley *et al.* (1995), com aparência genital externa de Q2 a Q4, e gônadas palpáveis unilateral ou bilateral (Tabela 2). Em nenhum deles observou-se útero ou rudimentos mullerianos por meio de exames de imagem. E com base nesses achados, todos se encontravam em investigação para defeito na síntese ou ação dos andrógenos.

**Tabela 2.** Descrição dos casos selecionados com diagnóstico clínico de Distúrbios da Diferenciação do Sexo 46,XY.

<b>Paciente</b>	<b>Idade na 1ª consulta</b>	<b>Classificação da genitália/gônadas</b>
DDSXY-01	1a3m	Q4/gônadas bilateral palpáveis
DDSXY-02	6d	Q2/gônadas bilateral palpáveis
DDSXY-03	23d	Q3/gônadas bilateral palpáveis
DDSXY-04	3m6d	Q2/gônadas bilateral palpáveis
DDSXY-05	15d	Q4/gônada unilateral palpável
DDSXY-06	27d	Q3/gônadas bilateral palpáveis
DDSXY-07	11m26d	Q3/gônadas bilateral palpáveis
DDSXY-08	1m13d	Q3/gônadas bilateral palpáveis
DDSXY-09	6d	Q4/gônada unilateral palpável
DDSXY-10	22d	Q4/gônadas bilateral palpáveis

Legenda: a - anos; m - meses; d - dias; Q: classificação de Quigley seguido do grau de subvirilização.

Ao falarmos na classificação de Quigley, nos referimos a categorização proposta por Quigley *et al.* (1995) para a classificação dos diferentes aspectos fenotípicos da genitália externa em casos de Síndrome da Insensibilidade Androgênica (SIA). Esta proposta classifica os diferentes fenotípicos da genitália externa em sete categorias de acordo com o grau de subvirilização observado no indivíduo (Figura 5). Embora sua concepção original tenha sido direcionada a SIA, a classificação de Quigley é amplamente usada em casos de DDS 46,XY.



**Figura 5.** Classificação de Quigley (Quigley *et al.*, 1995). Grau 1: genitália com aspecto masculino típico; grau 2: fenótipo masculino com distúrbios leves, como hipospádia; grau 3: fenótipo masculino com subvirilização grave; graus 4-5: representados por genitália ambígua, (6/7) inclui casos com genitália feminina, onde 6 caracteriza genitália feminina com pilificação e 7 genitália feminina sem pilificação. Fonte: Quigley *et al.*, 1995 (Adaptado).

## 5.2 Sequenciamento do gene *HSD17B3*

Dentre os 10 casos selecionados para sequenciamento, não foi detectada nenhuma alteração patogênica no gene *HSD17B3*. Permitindo, assim, desconsiderar o envolvimento desse gene com o quadro clínico dos participantes desta pesquisa. Todavia, a escolha do *HSD17B3* como gene candidato para rastreamento de alterações patogênicas nesta casuística se deu por sua relação significativa com os DDS 46,XY.

O *HSD17B3* representa uma das principais causas de deficiência na síntese dos andrógenos (Mendonca *et al.*, 2017). O fenótipo observado em casos de deficiência na sua proteína, a 17-beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 3 (17-beta-HSD3), frequentemente não difere do observado na SIPA ou a deficiência da enzima 5-alfa-redutase tipo 2 (Ahmed *et al.*, 2021). Devido a sobreposição fenotípica, a investigação etiológica através do sequenciamento de Sanger de casos de DDS 46,XY com defeito de síntese ou ação de andrógenos, inicia-se com o estudo dos genes *AR* e *SRD5A2*, quando não identificadas alterações nesses genes, realiza-se o sequenciamento do gene *HSD17B3* como estratégia para elucidação etiológica (Delót *et al.*, 2018; Barseghyan; Délot; Vilain, 2018; Akcan *et al.*, 2022).

Estudos recentes com uso de NGS têm identificado alterações patogênicas no *HSD17B3* em casuísticas de DDS 46,XY, sobretudo na ausência de alterações nos genes *AR* e *SRD5A2* (Yu *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2022).

Descartando a hipótese de deficiência da enzima HSD17B3 nos participantes desta pesquisa, expandimos a investigação para o sequenciamento de nova geração.

## 5.3 Sequenciamento de nova geração

Dos dez casos submetidos ao NGS, que investigou dezoito genes relacionados a DDS 46,XY (Quadro 4), quatro participantes apresentaram alterações e seis participantes não apresentaram alterações que pudessem ter relação com os fenótipos observados.

As alterações identificadas pelo NGS serão apresentadas no quadro 2.

**Quadro 4.** Alterações encontradas por meio do sequenciamento de nova geração.

Paciente	Locus / Transcrito	Gene	Tipo de alteração	Exon	posição no cDna	posição na Proteína	Genótipo
DDSXY-03	Y:2655556:C:A / NM_003140	<i>SRY</i>	<i>Missense</i>	1	c.89G>T	p.Arg30Ile	Hemizigose
DDSXY-04	12:2908304:C:T / NM_002014	<i>FKBP4</i>	<i>Missense</i>	5	c.565C>T	p.Arg189Cys	Heterozigose
DDSXY-07	12:125441301:G:C / NM_032656	<i>DHX37</i>	<i>Missense</i>	18	c.2389C>G	p.Leu797Val	Heterozigose
DDSXY-10	9:127262989:G:C / NM_004959	<i>NR5A1</i>	<i>Missense</i>	4	c.250C>G	p.Arg84Gly	Heterozigose

Os participantes que não apresentaram alterações (DDSXY-01, DDSXY-02, DDSXY-05, DDSXY-06, DDSXY-08 e DDSXY-09), permanecerão em investigação. Para esses casos, o sequenciamento do exoma completo (WES, do inglês, *whole exome sequencing*) pode ser uma possibilidade para a elucidação etiológica.

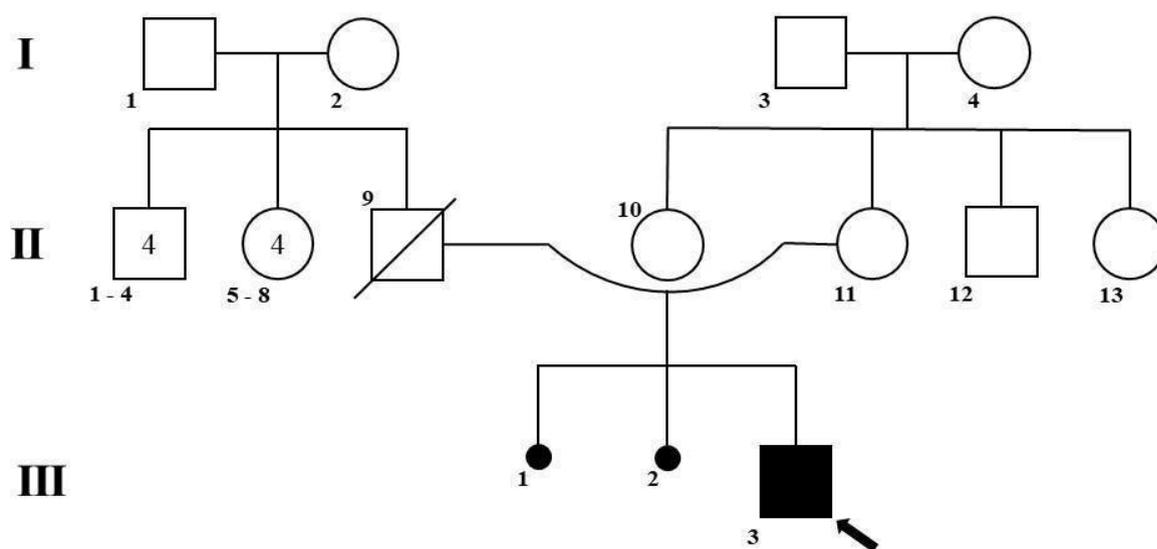
O NGS é uma técnica utilizada para o rastreamento de múltiplas alterações patogênicas em vários distúrbios genéticos (De Koning *et al.*, 2015). O NGS direcionado é eficaz na cobertura aprofundada de genes selecionados, uma vez que captura sequências nucleotídicas em regiões genômicas específicas, como éxons, íntrons e sequências reguladoras, o que permite descoberta de alterações descritas e não descritas na literatura (Mak *et al.*, 2018).

Os quatro participantes que apresentaram alterações no NGS serão discutidos a seguir.

### 5.3.1 Caso DDSXY-03

A primeira consulta deste participante no ambulatório de genética se deu aos 23 dias de vida, encaminhado com diagnóstico de ambiguidade genital (Q3) com gônadas bilaterais palpáveis na bolsa escrotal.

Filho único, após dois abortamentos de primeiro trimestre, o participante não possui fatores de risco importantes para condições clínicas de etiologia genética (Figura 6).



**Figura 6.** Heredograma referente ao caso DDSXY-03. Caso índice - III-3; as duas gestações que resultaram em abortamento de 1º trimestre estão indicadas em III-1 e III-2.

Com relação ao NGS, foi identificada uma hemizigose da alteração c.89G>T no gene *SRY*, que resulta na substituição de uma arginina por isoleucina no aminoácido 30 da proteína *SRY* (p.Arg30Ile). Esta alteração está reportada no dbSNP (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism Database*), registro rs141855441, e no HGMD (do inglês, *The Human Gene Mutation Database*). Além disso, é considerada patogênica segundo informações contidas no ClinVar, onde é associada à disgenesia gonadal 46,XY.

Essa alteração foi descrita pela primeira vez por Assumpção *et al.* (2002) a partir de uma família com três indivíduos afetados, sendo dois meninos diagnosticados com Disgenesia Gonadal Parcial 46,XY e uma irmã com Disgenesia Gonadal Pura 46,XY. Além desses indivíduos com fenótipo atípico, essa alteração foi encontrada no genitor e em mais três irmãos com fenótipo típico de indivíduos 46,XY, indicando uma expressividade variável da mesma alteração genética.

Um outro relato desta alteração foi publicado por Santalha *et al.* (2014), em um caso de indivíduo fenotipicamente feminino com Disgenesia Gonadal Pura 46,XY, apresentando puberdade precoce aos 4 anos de idade.

A alteração p.Arg30Ile na proteína *SRY* está associada a disgenesia gonadal pura 46,XY e disgenesia gonadal parcial (Assumpção *et al.*, 2002).

No que diz respeito ao gene *SRY*, localizado em Yp11.2, este é responsável por dar início a diferenciação das gônadas bipotentes em testículos e é considerado o fator determinante para o desenvolvimento das gônadas masculinas em humanos (Sinclair *et al.*, 1990; Berta *et al.*, 1990). Constituído por um único éxon, o *SRY* codifica uma proteína de 204

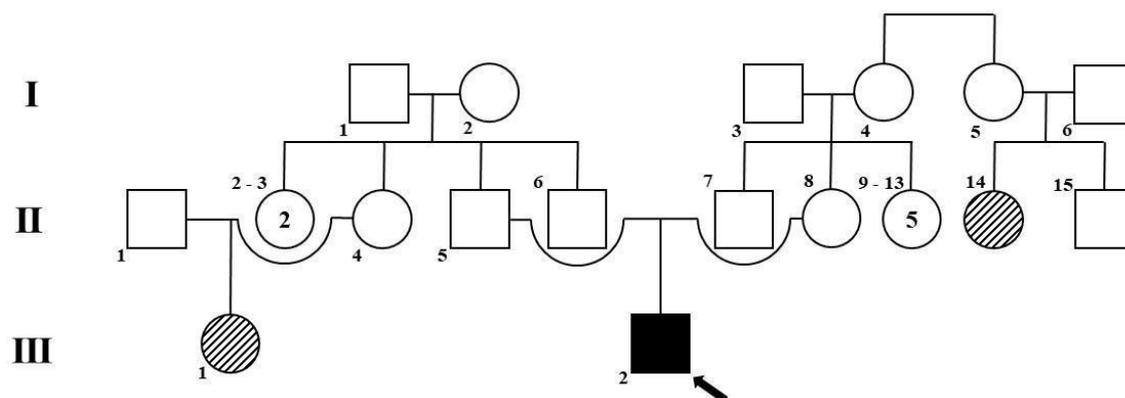
aminoácidos, onde está contido um domínio de ligação ao DNA de 80 aminoácidos bem conservados da família *HMG box* (do inglês, *high mobility group*). O gene *SRY* também regula a função de outros genes envolvidos na diferenciação sexual masculina, como o *SOX9*, e a presença de alterações patogênicas podem estar relacionadas com quadros de disgenesia gonadal 46,XY (Sinclair *et al.*, 1990; Pivnick *et al.*, 1992; Cameron; Sinclair, 1997).

Embora os exames de imagem não revelaram derivados Mullerianos, que é um determinante para casos de disgenesia gonadal, não podemos descartar a alteração c.89G>T(p.Arg30Ile) no *SRY* e sua relação com o fenótipo do caso DDSXY-03. A biópsia gonadal pode ser um exame importante na elucidação desse caso.

Como o caso DDSXY-03 apresenta AG, descartamos a possibilidade de disgenesia gonadal pura 46,XY. No entanto, a disgenesia gonadal parcial não pode ser descartada neste caso.

### 5.3.2 Caso DDSXY-04

O primeiro atendimento deste participante por médico geneticista se deu aos 3 meses de vida, ocasião em que a genitora relatou a presença de micropênis e hipospádia. O participante é filho único de genitores não consanguíneos sem recorrência familiar de AG, e foi relatado Síndrome de Down na família de ambos os genitores (Figura 7).



**Figura 7.** Heredograma do caso DDSXY-04. Caso índice - III-2. Indivíduos II-14 e III-1 - Síndrome de Down.

Ao exame físico, a genitália externa foi classificada em Q2, apresentando gônadas palpáveis bilaterais localizadas em bolsa escrotal. Juntamente com o cariótipo 46,XY, ausência de derivados mullerianos e dosagens hormonais, foi atribuída a categoria diagnóstica DDS 46,XY, com deficiência na síntese e/ou ação dos andrógenos.

O NGS revelou a alteração c.565C>T em heterozigose no gene *FKBP4*, que resulta na substituição de uma arginina por cisteína no aminoácido 189 de sua proteína (p.Arg189Cys). Esta alteração está reportada no dbSNP (rs141855441), embora sem a descrição da condição clínica associada e não está reportada no HGMD e ClinVar.

O gene *FKBP4* está associado com a via de sinalização do AR, onde a proteína FKBP4 interage com o AR e chaperona HSP90 (do inglês, *heat shock protein 90*), aumentando a ligação androgênica e regulando a transcrição mediada pelo receptor de andrógenos (Nair *et al.*, 1996; Cheung-Flynn *et al.*, 2005; Leon *et al.*, 2011). As principais chaperonas relacionadas à ação androgênica são HSP70, HSP90, HSP40 e FKBP4, estas são essenciais para o estabelecimento da ligação do complexo hormônio/receptor, translocação do complexo do citoplasma para seu sítio de ação nuclear, acelerar a transcrição mediada pelo AR e manutenção da proteína AR (Nitsche; Hiort, 2000; Heemers; Tindall, 2007). Estas chaperonas têm sido estudadas em relação à sua atuação nos mecanismos de atividade androgênica (Cheung-Flynn *et al.*, 2005; Beleza-Meireles *et al.*, 2007).

Ilaslan *et al.* (2020) propuseram que o gene *FKBP4* é um forte candidato à Síndrome da Insensibilidade Parcial aos Andrógenos (SIPA) em casos sem alterações patogênicas no gene *AR*. Os autores descreveram um caso clínico com uma alteração em heterozigose no *FKBP4* (c.956T>C / p.Leu319Pro) para a qual a análise preditiva, juntamente com características clínicas e dosagem hormonal, os levou a inferir que esta seja a provável causa para SIPA neste paciente, que possui o gene *AR* sem alterações.

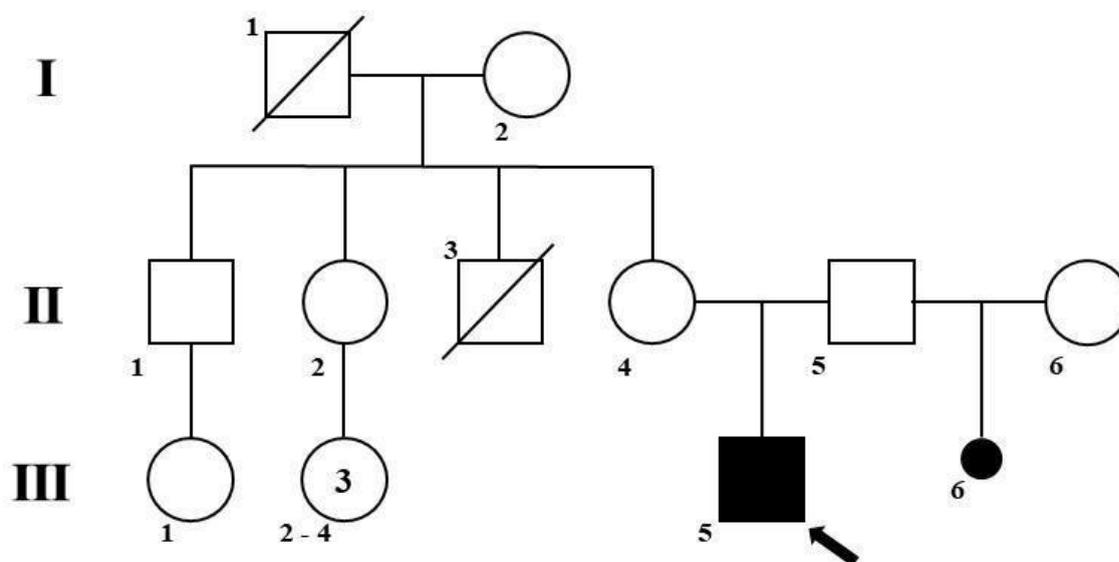
**Quadro 5.** Classificação da alteração p.Arg189Cys, no gene *FKBP4*, conforme algoritmos utilizados.

Algoritmo	Resultado	Classificação/Score	
		Deletéria	Neutra
SIFT	0,01	<0,05	>0,05
PolyPhen-2	0,4	1.0	0.0

As análises preditivas *in silico* (Quadro 5) revelaram que a alteração p.Arg189Cys é provavelmente patogênica e que afeta a função da proteína, sendo uma possível causadora da condição clínica apresentada pelo paciente. Com esses resultados, podemos inferir que a alteração identificada no gene *FKBP4* do caso DDSXY-04 pode estar relacionada com o fenótipo do paciente, que é compatível com SIPA. Entretanto, somente a análise funcional da proteína FKBP4 alterada poderá confirmar o real efeito da alteração p.Arg189Cys.

## 5.3.3 Caso DDSXY-07

A primeira consulta deste participante no ambulatório de genética se deu aos 11 meses de vida, ocasião em que a genitora apresentou queixa acerca da presença de micropênis, hipospádia e criptorquidia. O participante é filho único de genitores não consanguíneos e não há relato de casos semelhantes na família (Figura 8).



**Figura 8.** Heredograma do caso DDSXY-07. Paciente afetado indicado em III-5.

No exame físico, foi observada ambiguidade genital (Q3) e gônadas palpáveis bilaterais localizadas na bolsa escrotal. Na ocasião, também foi observada prega epicântica e ponte nasal baixa sem outras alterações. A hipótese diagnóstica foi de Síndrome da Insensibilidade Parcial aos Andrógenos ou Deficiência do 5- $\alpha$  redutase tipo II, sendo descartada após o sequenciamento dos genes *AR* e *SRD5A2*.

Através do NGS, foi identificada uma heterozigose no éxon 18 do gene *DHX37*, a alteração c.2389C>G, que resulta na substituição de uma leucina por valina no aminoácido 797 (p.Leu797Val) da proteína DHX37. Essa alteração está reportada no dbSNP (rs372590008) e relatada no ClinVar como uma variante de significado incerto, porém não está reportada no HGMD.

O gene *DHX37* codifica uma helicase de RNA que desempenha importante papel na biogênese ribossomal, influenciando a função essencial do ribossomo de traduzir o mRNA em proteínas. A DHX37, semelhante a outras helicases de DNA, atua no recrutamento ou

dissociação de proteínas ribossômicas, assim como de fatores de ligação (McElreavey; Pailhoux; Bashambo, *et al.* 2022).

De uma forma geral, as helicases de RNA não possuem especificidade para um único substrato, elas podem trabalhar em associação com diversos cofatores para o recrutamento de moléculas específicas de RNA (Sloan; Bohnsack, 2018). Há duas formas das helicases desempenharem seu papel: nos complexos pré-ribossomais, realizando a remoção de snoRNA (do inglês, *Small Nucleolar RNA*) específicos; e durante a formação do ribossomo, dando início às mudanças estruturais nas subunidades ribossomais, necessárias para seu processamento (Martin *et al.*, 2014).

Recentemente, alterações não sinônimas em heterozigose no gene *DHX37* foram relacionadas à quadros de DDS 46,XY. Da Silva *et al.* (2019), sugeriu existir evidência da relação deste gene com disgenesia gonadal 46,XY, ao encontrar alterações *missense* raras, em heterozigose, classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas em 5 famílias e 6 casos esporádicos.

Em 2020 McElreavey *et al.* identificou alterações patogênicas, em heterozigose, no gene *DHX37*, em indivíduos 46,XY com androgenização reduzida e concluíram que este gene é uma nova causa genética autossômica dominante para DDS 46,XY. Por fim, em 2023, Oliveira *et al.* (2023) sugeriram significativa relação do gene *DHX37* com DDS 46,XY sustentada através da análise preditiva *in silico*.

**Quadro 6.** Classificação da alteração p.Leu797Val, no gene *DHX37*, conforme algoritmos utilizados.

Algoritmo	Resultado	Classificação/Score	
		Deletéria	Neutra
SIFT	0,01	<0,05	>0,05
PolyPhen-2	1.0	1.0	0.0
Mutation Taster	32	215	0.0

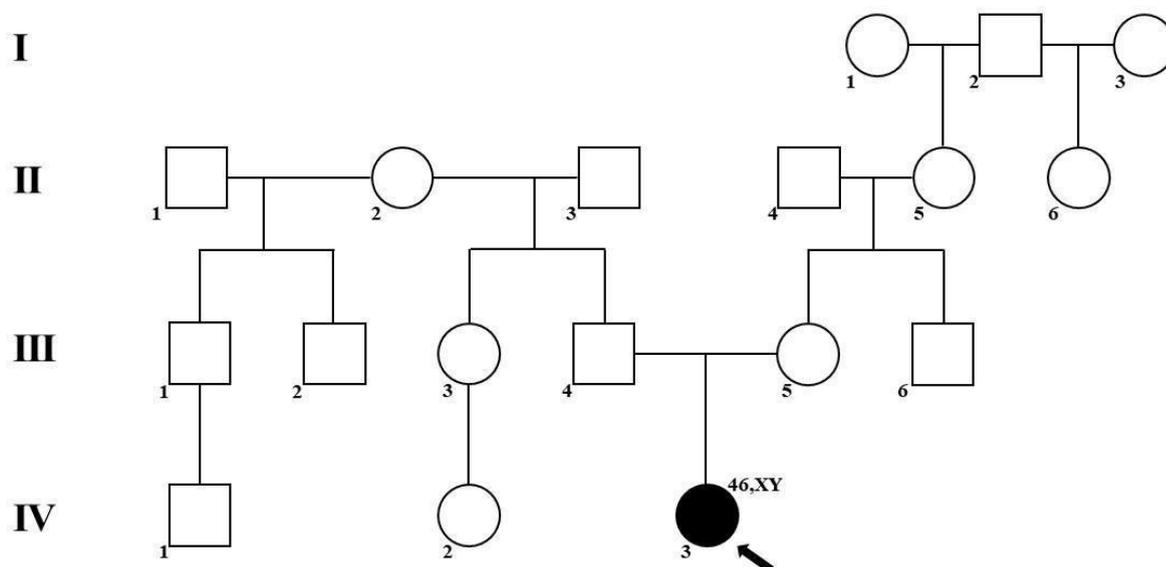
As análises preditivas *in silico* realizadas com três algoritmos (Quadro 6) revelaram que a alteração p.Leu797Val no gene *DHX37* é provavelmente patogênica, afeta a função da proteína, sendo uma possível causadora da condição clínica. Esses resultados apontam para uma possível relação dessa alteração com o fenótipo do caso DDSXY-07.

Assim como no caso DDSXY-03, a biópsia gonadal pode ser um exame importante na elucidação deste caso, uma vez que os exames de imagem não revelaram derivados Mülllerianos e as alterações identificadas no gene *DHX37* têm sido reportadas em casos de disgenesia gonadal parcial. Além disso, por tratar-se de um gene novo relacionado a DDS e

pelos poucos estudos reportados na literatura, a análise funcional é uma ferramenta importante para o entendimento do efeito da alteração sob a proteína DHX37 alterada.

### 5.3.4 Caso DDSXY-10

O primeiro atendimento deste participante com geneticista ocorreu aos 22 dias de vida, ocasião em que os genitores indicaram a ambiguidade genital como queixa. Com sexo de criação feminino, a participante é filha única de genitores não consanguíneos, sem relatos de recorrência familiar do distúrbio (Figura 9).



**Figura 9.** Heredograma do caso DDSXY-10. Caso índice - IV-3, paciente com sexo social feminino e cariótipo 46,XY.

Ao exame físico, confirmou-se a ambiguidade genital, que foi classificada como Q4 na escala de Quigley, com gônadas palpáveis bilateralmente localizadas em região labioescrotal. Diante dos exames complementares e quadro clínico observado, foi atribuída a categoria diagnóstica de DDS 46,XY com defeito na síntese ou ação dos andrógenos.

O NGS identificou uma heterozigose no éxon 4 do gene *NR5A1*, a alteração c.250C>G, não descrita previamente na literatura e que resulta na substituição de uma arginina por glicina no aminoácido 84 da proteína SF1 (p.Arg84Gly). Esta alteração não foi encontrada no dbSNP, não está reportada nas bases ClinVar e HGMD.

O gene *NR5A1*, locus 9q33.3, codifica a proteína SF1 (do inglês, *Steroidogenic factor-1*), um fator de transcrição que se liga ao TESCO do *SOX9*, o auxiliando na interação com seu próprio promotor. Diante dessa interação, ocorre um *feedback* positivo nas células de

Sertoli que garante sua expressão em altos níveis, contribuindo fundamentalmente na esteroidogênese e no desenvolvimento sexual, como um regulador em etapas do desenvolvimento adrenal e gonadal (Achermann *et al.* 2002; Sekido; Lovell-Badge, 2008).

Alterações patogênicas no gene *NR5A1* são associadas na literatura a quadros de DDS 46,XY. Estas alterações resultam em variados fenótipos, como defeitos na produção de andrógenos, disgenesia gonadal, hipospadia, anorquia bilateral, entre outros (Fabbri *et al.*, 2016; Fabbri-Scallet *et al.*, 2018; Robevska *et al.*, 2018).

No aminoácido 84 da proteína SF1, estão reportadas no HGMD as alterações p.Arg84His e p.Arg84Cys. A alteração p.Arg84His foi relacionada a um quadro de sub-androgenização com ambiguidade genital, publicada por Köhler *et al.* (2008) e a alteração p.Arg84Cys, publicado por Reuter *et al.* (2007) relacionada a disgenesia gonadal parcial.

As análises preditivas *in silico* realizadas com três algoritmos (Quadro 7) revelaram que a alteração p.Arg84Gly no gene *NR5A1* é provavelmente patogênica, afeta a função da proteína, sendo uma possível causadora da condição clínica.

**Quadro 7.** Classificação da alteração p.Arg84Gly, no gene *NR5A1*, conforme algoritmos utilizados.

Algoritmo	Resultado	Classificação/Score	
		Deletéria	Neutra
SIFT	0,00	<0,05	>0,05
PolyPhen-2	1.0	1.0	0.0
Mutation Taster	94	215	0.0

Por ser uma alteração nunca descrita, faz-se necessário estudos complementares para o entendimento do seu efeito sobre a proteína SF-1 e sua possível associação com o fenótipo de do paciente. Com base nos resultados da análise preditiva *in silico*, não podemos descartar sua relação com o fenótipo do caso DDSXY-10.

Assim como nos casos DDSXY-03 e DDSXY-07, a biópsia gonadal pode ser um exame importante na elucidação deste caso, uma vez que os exames de imagem não revelaram derivados Müllermanos e alterações no gene *NR5A1* são reportadas, em sua grande parte, em casos de disgenesia gonadal parcial.

#### 5.4 Casos de DDS 46,XY sem etiologia esclarecida

Os DDS 46,XY são conhecidos pela complexidade genética e sobreposição fenotípica. A investigação molecular é fundamental para a elucidação diagnóstica desses casos, contudo,

mesmo com métodos avançados de investigação molecular, casos sem diagnóstico etiológico esclarecidos apresentam-se numa frequência variável entre 33%-80% (Hughes, 2008; Ahmed *et al.*, 2013; Gazzaneo *et al.*, 2016; Gomes, 2022).

Neste estudo, 40% da amostra apresentou alterações em genes que são fundamentais na determinação/diferenciação do sexo e seguem em investigação da possível correlação genótipo-fenótipo. Já 60% permanecem em investigação visando a identificação de alterações patogênicas que possam justificar o fenótipo. A análise funcional das alterações aqui identificadas são necessárias para a correta correlação genótipo-fenótipo em cada caso.

## 6 CONCLUSÕES

- O sequenciamento Sanger não revelou alterações patogênicas no gene *HSD17B3* nos dez casos investigados;
- O NGS revelou alterações nos casos DDSXY-03, DDSXY-04, DDSXY-07 e DDSXY-10;
- Os casos DDSXY-01, DDSXY-02, DDSXY-05, DDSXY-06, DDSXY-08 e DDSXY-09, não apresentaram alterações através do NGS e permanecerão em investigação.
- As alterações p.Arg189Cys na proteína FKBP4; p.Leu797Val na proteína DHX37 e p.Arg84Gly na proteína SF1 se mostraram patogênicas nas análises preditivas *in silico*.
- Investigações complementares serão fundamentais para a correta correlação genótipo/fenótipo.
- Os resultados deste estudo reforçam a complexidade da elucidação etiológica dos DDS 46,XY.

## REFERÊNCIAS

- ACHERMANN, J. C. et al. Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 4, p. 1829-1833, 2002.
- ACHERMANN, J. C. et al. Disorders of sex development: effect of molecular diagnostics. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 8, p. 478-488, 2015.
- ADZHUBEI, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature methods**, v. 7, n. 4, p. 248-249, 2010.
- AHMED, S. F. et al. Understanding the genetic aetiology in patients with XY DSD. **British medical bulletin**, v. 106, n. 1, p. 67-89, 2013.
- AHMED, S. F. et al. Society for Endocrinology UK guidance on the initial evaluation of an infant or an adolescent with a suspected disorder of sex development (Revised 2015). **Clinical endocrinology**, v. 84, n. 5, p. 771-788, 2016.
- AHMED, S. F. et al. Society for Endocrinology UK Guidance on the initial evaluation of a suspected difference or disorder of sex development (Revised 2021). **Clinical endocrinology**, v. 95, n. 6, p. 818-840, 2021.
- AKCAN, N. et al. Mutations in AR or SRD5A2 Genes: clinical findings, endocrine pitfalls, and genetic features of children with 46, XY DSD. **Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**, v. 14, n. 2, p. 153, 2022.
- ANDERSSON, S. et al. Molecular genetics and pathophysiology of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, n. 1, p. 130-136, 1996.
- ANDRADE, J. G. R. de et al. Clinical and genetic findings of five patients with WT1-related disorders. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, p. 1236-1243, 2008.
- ARBOLEDA, V. A.; SANDBERG, D. E.; VILAIN, E. DSDs: genetics, underlying pathologies and psychosexual differentiation. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 10, p. 603-615, 2014.
- ASSUMPÇÃO, J. et al. Novel mutations affecting SRY DNA-binding activity: the HMG box N65H associated with 46, XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-HMG box R30I associated with variable phenotypes. **Journal of Molecular Medicine**, v. 80, p. 782-790, 2002.
- BARBARO, M. et al. Isolated 46, XY gonadal dysgenesis in two sisters caused by a Xp21. 2 interstitial duplication containing the DAX1 gene. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 8, p. 3305-3313, 2007.

BARSEGHYAN, H.; DÉLOT, E. C.; VILAIN, E. New technologies to uncover the molecular basis of disorders of sex development. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 468, p. 60-69, 2018.

BASHAMBOO, A.; MCELREAVEY, K. Human sex-determination and disorders of sex-development (DSD). In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2015. p. 77-83.

BASHAMBOO, A. et al. Anomalies in human sex determination provide unique insights into the complex genetic interactions of early gonad development. **Clinical genetics**, v. 91, n. 2, p. 143-156, 2017.

BELEZA-MEIRELES, A. et al. Studies of a co-chaperone of the androgen receptor, FKBP52, as candidate for hypospadias. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 5, p. 1-7, 2007.

BERTA, P. et al. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. **Nature**, v. 348, n. 6300, p. 448-450, 1990.

BERTALAN, R. et al. Novel frameshift mutation of the NR0B1 (DAX1) in two tall adult brothers. **Molecular biology reports**, v. 46, p. 4599-4604, 2019.

BIASON-LAUBER, A.; CHABOISSIER, M. C.. Ovarian development and disease: The known and the unexpected. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2015. p. 59-67.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria nº 199, de 30 de Janeiro de 2014**. Brasília, 2014.

CALAIS, F. L. **Estudo dos genes SRD5A2 e 17BHSD3 em casos de ambiguidade genital em pacientes com cariótipo 46, XY**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. 2010.

CAMERON, F. J.; SINCLAIR, Andrew H. Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes. **Human mutation**, v. 9, n. 5, p. 388, 1997.

CHAN, A. O. et al. Aetiological bases of 46, XY disorders of sex development in the Hong Kong Chinese population. **Hong Kong Medical Journal**, v. 21, n. 6, p. 499, 2015.

CHEN, Z. et al. Molecular genetics and general management of androgen insensitivity syndrome. **Intractable & Rare Diseases Research**, v. 12, n. 2, p. 71-77, 2023.

CHEUNG-FLYNN, J. et al. Physiological role for the cochaperone FKBP52 in androgen receptor signaling. **Molecular endocrinology**, v. 19, n. 6, p. 1654-1666, 2005.

ÇİFTÇİ, N. et al. 46, XY sex development defect due to a novel homozygous (splice site) c. 673\_1G> C variation in the HSD17B3 gene: Case report. **Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**, v. 14, n. 2, p. 233, 2022.

COOLS, M. et al. Caring for individuals with a difference of sex development (DSD): a consensus statement. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 7, p. 415-429, 2018.

- DA SILVA, T. E. et al. Genetic evidence of the association of DEAH-box helicase 37 defects with 46, XY gonadal dysgenesis spectrum. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 104, n. 12, p. 5923-5934, 2019.
- DE KONING, T. J. et al. Targeted next-generation sequencing panels for monogenetic disorders in clinical diagnostics: the opportunities and challenges. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 15, n. 1, p. 61-70, 2015.
- DÉLOT, E. C. et al. Genetics of disorders of sex development: the DSD-TRN experience. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 46, n. 2, p. 519-537, 2017.
- DOMENICE, S. et al. Wide spectrum of NR5A1-related phenotypes in 46, XY and 46, XX individuals. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 108, n. 4, p. 309-320, 2016.
- DOMENICE, S. et al. 46, XY disorders of sexual development. In: **Endotext [Internet]**. 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279170/>>.
- EGGERS, S. et al. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. **Genome biology**, v. 17, n. 1, p. 1-21, 2016.
- FABBRI, H. C. et al. NR5A1 loss-of-function mutations lead to 46, XY partial gonadal dysgenesis phenotype: report of three novel mutations. **Sexual Development**, v. 10, n. 4, p. 191-199, 2016.
- FABBRI-SCALLET, H. et al. Functional characterization of five NR5A1 gene mutations found in patients with 46, XY disorders of sex development. **Human mutation**, v. 39, n. 1, p. 114-123, 2018.
- GAZZANEO, I. F. P. et al. Perfil de pacientes com anormalidades geniturinárias atendidos em serviço de genética clínica no sistema único de saúde. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 34, p. 91-98, 2016.
- GEISSLER, W. M. et al. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 3. **Nature genetics**, v. 7, n. 1, p. 34-39, 1994.
- GOMES, N. L. et al. Contribution of clinical and genetic approaches for diagnosing 209 index cases with 46, XY differences of sex development. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 107, n. 5, p. e1797-e1806, 2022.
- GONÇALVES, C. I. et al. Disorder of sex development due to 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 deficiency: A case report and review of 70 different HSD17B3 mutations reported in 239 patients. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 10026, 2022.
- GONEN, N. et al. Sex reversal following deletion of a single distal enhancer of Sox9. **Science**, v. 360, n. 6396, p. 1469-1473, 2018.

GUARAGNA, M. S. et al. Frasier syndrome: four new cases with unusual presentations. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, p. 525-532, 2012.

HASTIE, N. D. Wilms' tumour 1 (WT1) in development, homeostasis and disease. **Development**, v. 144, n. 16, p. 2862-2872, 2017.

HART, D.; GUTIÉRREZ, D. R.; BIASON-LAUBER, A. CBX2 in DSD: the quirky kid on the block. **Sexual Development**, v. 16, n. 2-3, p. 162-170, 2022.

HEEMERS, H. V.; TINDALL, D. J. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. **Endocrine reviews**, v. 28, n. 7, p. 778-808, 2007.

HIORT, O. et al. Management of disorders of sex development. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 9, p. 520-529, 2014.

HUGHES, I. A. Minireview: sex differentiation. **Endocrinology**, v. 142, n. 8, p. 3281-3287, 2001.

HUGHES, I. A. et al. Consensus statement on management of intersex disorders. **Journal of pediatric urology**, v. 2, n. 3, p. 148-162, 2006.

HUGHES, I. A. Disorders of sex development: a new definition and classification. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, v. 22, n. 1, p. 119-134, 2008.

HUGHES, I. A. et al. Androgen insensitivity syndrome. **The Lancet**, v. 380, n. 9851, p. 1419-1428, 2012.

HUGHES, L. A. et al. Next generation sequencing (NGS) to improve the diagnosis and management of patients with disorders of sex development (DSD). **Endocrine Connections**, v. 8, n. 2, p. 100-110, 2019.

HUTSON, J. M. et al. Malformation syndromes associated with disorders of sex development. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 8, p. 476-487, 2014.

ILASLAN, E. et al. The FKBP4 gene, encoding a regulator of the androgen receptor signaling pathway, is a novel candidate gene for androgen insensitivity syndrome. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 21, p. 8403, 2020.

IVELL, R. et al. Expression and role of INSL3 in the fetal testis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 868313, 2022.

KARPOVA, T. et al. Steroidogenic factor 1 differentially regulates fetal and adult leydig cell development in male mice. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 4, p. 83, 1-15, 2015.

KIM, J. H. et al. Diagnostic yield of targeted gene panel sequencing to identify the genetic etiology of disorders of sex development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 444, p. 19-25, 2017.

KÖHLER, B. et al. Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46, XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency. **Human mutation**, v. 29, n. 1, p. 59-64, 2008.

KOOPMAN, P. et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. **Nature**, v. 351, n. 6322, p. 117-121, 1991.

KREIDBERG, J. A. et al. WT-1 is required for early kidney development. **Cell**, v. 74, n. 4, p. 679-691, 1993.

KUTNEY, K. et al. Challenges in the diagnosis and management of disorders of sex development. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 108, n. 4, p. 293-308, 2016.

LEE, P. A. et al. Consensus statement on management of intersex disorders. **Pediatrics**, v. 118, n. 2, p. e488-e500, 2006.

LEE, P. A. et al. Global disorders of sex development update since 2006: perceptions, approach and care. **Hormone research in paediatrics**, v. 85, n. 3, p. 158-180, 2016.

LEON, J. T. et al. Targeting the regulation of androgen receptor signaling by the heat shock protein 90 cochaperone FKBP52 in prostate cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 29, p. 11878-11883, 2011.

LI, L. et al. Mutational analysis of compound heterozygous mutation p. Q6X/p. H232R in SRD5A2 causing 46, XY disorder of sex development. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 48, n. 1, p. 1-13, 2022.

LIN, L.; ACHERMANN, J. C. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. **Sexual Development**, v. 2, n. 4-5, p. 200-209, 2008.

LUCAS-HERALD, A. K.; BASHAMBOO, A. Gonadal development. **Understanding Differences and Disorders of Sex Development (DSD)**, v. 27, p. 1-16, 2014.

MACIEL-GUERRA, A. T.; GUERRA-JÚNIOR, G. **Menino ou Menina? Os Distúrbios da Diferenciação do Sexo–Vol. 1**. Appris Editora e Livraria Eireli-ME, 2019.

MAK, T. S. H. et al. Coverage and diagnostic yield of whole exome sequencing for the evaluation of cases with dilated and hypertrophic cardiomyopathy. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 10846, 2018.

MAZEN, I. et al. Advances in genomic diagnosis of a large cohort of Egyptian patients with disorders of sex development. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 185, n. 6, p. 1666-1677, 2021.

MARKOSYAN, R.; AHMED, S. F.. Sex assignment in conditions affecting sex development. **Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**, v. 9, n. Suppl 2, p. 106, 2017.

MARTIN, R. et al. A pre-ribosomal RNA interaction network involving snoRNAs and the Rok1 helicase. **Rna**, v. 20, n. 8, p. 1173-1182, 2014.

MCELREAVEY, K. et al. Pathogenic variants in the DEAH-box RNA helicase DHX37 are a frequent cause of 46, XY gonadal dysgenesis and 46, XY testicular regression syndrome. **Genetics in Medicine**, v. 22, n. 1, p. 150-159, 2020.

MCELREAVEY, K.; PAILHOUX, E.; BASHAMBOO, A. DHX37 and 46, XY DSD: a new ribosomopathy?. **Sexual Development**, v. 16, n. 2-3, p. 194-206, 2022.

MENDONCA, B. B. et al. 46, XY disorders of sex development (DSD). **Clinical endocrinology**, v. 70, n. 2, p. 173-187, 2009.

MENDONCA, B. B. et al. 46, XY disorder of sex development (DSD) due to 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 deficiency. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 165, p. 79-85, 2017.

MICHELATTO, D. P. **Functional importance of novel nucleotide variations in the CYP21A2 gene= Importância funcional de novas variações nucleotídicas no gene CYP21A2**. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. 2016.

MIYADO, M.; FUKAMI, M.; OGATA, T. MAMLD1 and Differences/Disorders of Sex Development: an update. **Sexual Development**, v. 16, n. 2-3, p. 126-137, 2022.

MONTEIRO, A. N. Trícia Rigo et al. Síntese proteica em suínos: como fêmeas, machos não castrados e castrados respondem a este processo?. **Pubvet**, v. 12, p. 139, 2017.

NAIR, S. C. et al. A pathway of multi-chaperone interactions common to diverse regulatory proteins: estrogen receptor, Fes tyrosine kinase, heat shock transcription factor Hsf1, and the aryl hydrocarbon receptor. **Cell stress & chaperones**, v. 1, n. 4, p. 237, 1996.

NISHI, M. Y. et al. Analysis of anti-Müllerian hormone (AMH) and its receptor (AMHR2) genes in patients with persistent Müllerian duct syndrome. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, p. 473-478, 2012.

NITSCHKE, E. M.; HIORT, O. The molecular basis of androgen insensitivity. **Hormone Research**, v. 54, n. 5-6, p. 327-333, 2000.

OGATA, T. et al. MAMLD1 and 46, XY disorders of sex development. In: **Seminars in reproductive medicine**. Thieme Medical Publishers, 2012. p. 410-416.

OLIVEIRA, F. R. et al. DHX37 and NR5A1 Variants Identified in Patients with 46, XY Partial Gonadal Dysgenesis. **Life**, v. 13, n. 5, p. 1093, 2023.

OMENA FILHO, R. L. **Ambiguidade genital em uma série de casos do ambulatório de distúrbios/diferenças do desenvolvimento do sexo do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes da UFAL-2008-2018**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2021.

OZISIK, G.; ACHERMANN, J. C.; JAMESON, J. L.. The role of SF1 in adrenal and reproductive function: insight from naturally occurring mutations in humans. **Molecular genetics and metabolism**, v. 76, n. 2, p. 85-91, 2002.

PETROLI, R. J. **Análise molecular do gene do receptor de androgenos em pacientes 46, XY com ambiguidade genital e produção normal de testosterona**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. 2010.

PHELAN, N. et al. Screening for mutations in 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and androgen receptor in women presenting with partially virilised 46, XY disorders of sex development. **European Journal of Endocrinology**, v. 172, n. 6, p. 745-751, 2015.

PIVNICK, E. K. et al. Mutations in the conserved domain of SRY are uncommon in XY gonadal dysgenesis. **Human genetics**, v. 90, p. 308-310, 1992.

QUIGLEY, C. A. et al. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. **Endocrine reviews**, v. 16, n. 3, p. 271-321, 1995.

REUTER, A. L. et al. A novel mutation in the accessory DNA-binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency. **European journal of endocrinology**, v. 157, n. 2, p. 233-238, 2007.

REY, R.; JOSSO, N.; RACINE, C.. Sexual differentiation. **Endotext [internet]**, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279001/>>.

RICHARDS, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in medicine**, v. 17, n. 5, p. 405-423, 2015.

ROBEVSKA, G. et al. Functional characterization of novel NR5A1 variants reveals multiple complex roles in disorders of sex development. **Human mutation**, v. 39, n. 1, p. 124-139, 2018.

SANDBERG, D. E. et al. Interdisciplinary care in disorders/differences of sex development (DSD): The psychosocial component of the DSD—Translational research network. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. 2017. p. 279-292.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of molecular biology**, v. 94, n. 3, p. 441-448, 1975.

SANTALHA, M. et al. Pubertad precoce periférica: disgenesia gonadal completa 46 XY. In: **Anales de Pediatría**. Elsevier Doyma, 2014. p. 246-250.

SATA, F. et al. Genetic polymorphisms of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 3 and the risk of hypospadias. **The journal of sexual medicine**, v. 7, n. 8, p. 2729-2738, 2010.

SAX, L. How common is Intersex? A response to Anne Fausto-Sterling. **Journal of sex research**, v. 39, n. 3, p. 174-178, 2002.

SCHWARZ, J. M. et al. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. **Nature methods**, v. 11, n. 4, p. 361-362, 2014.

SEKIDO, R. et al. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. **Developmental biology**, v. 274, n. 2, p. 271-279, 2004.

SEKIDO, R.; LOVELL-BADGE, R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. **Nature**, v. 453, n. 7197, p. 930-934, 2008.

SELVEINDRAN, N. M et al. Behavioural Problems in Children with 46XY Disorders of Sex Development. **International journal of endocrinology**, v. 2017, 2017.

SINCLAIR, A. H. et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature**, v. 346, n. 6281, p. 240-244, 1990.

SLOAN, K. E.; BOHNSACK, M. T. Unravelling the mechanisms of RNA helicase regulation. **Trends in biochemical sciences**, v. 43, n. 4, p. 237-250, 2018.

SREENIVASAN, R. et al. Mutant NR5A1/SF-1 in patients with disorders of sex development shows defective activation of the SOX9 TESCO enhancer. **Human Mutation**, v. 39, n. 12, p. 1861-1874, 2018.

SUNTHARALINGHAM, J. P. et al. DAX-1 (NR0B1) and steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) in human disease. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, v. 29, n. 4, p. 607-619, 2015.

TAKAGI, M. et al. Syndromic disorder of sex development due to a novel hemizygous mutation in the carboxyl-terminal domain of ATRX. **Human genome variation**, v. 4, n. 1, p. 1-3, 2017.

TANG, P. et al. ATRX and sex differentiation. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 15, n. 7, p. 339-344, 2004.

TANNOUR-LOUET, M. et al. Identification of de novo copy number variants associated with human disorders of sexual development. **PloS one**, v. 5, n. 10, p. e15392, 2010.

VAN BATAVIA, J. P.; KOLON, T. F. Fertility in disorders of sex development: a review. **Journal of Pediatric Urology**, v. 12, n. 6, p. 418-425, 2016.

VIGER, R. S. et al. Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease. **Molecular endocrinology**, v. 22, n. 4, p. 781-798, 2008.

WANG, F. et al. A novel WT1 gene mutation in a chinese girl with denys-drash syndrome. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 35, n. 5, p. e23769, 2021a.

WANG, J. et al. Genetic Control of MAP3K1 in Eye Development and Sex Differentiation. **Cells**, v. 11, n. 1, p. 34, 2021b.

WERNER, R. et al. 46, XY gonadal dysgenesis due to a homozygous mutation in desert hedgehog (DHH) identified by exome sequencing. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, n. 7, p. E1022-E1029, 2015.

WILHELM, D.; PALMER, S.; KOOPMAN, P. Sex determination and gonadal development in mammals. **Physiological reviews**, 2007.

WISNIEWSKI, A. B. et al. Management of 46, XY differences/disorders of sex development (DSD) throughout life. **Endocrine reviews**, v. 40, n. 6, p. 1547-1572, 2019.

WOODWARD, M.; PATWARDHAN, N. Disorders of sex development. **Surgery (Oxford)**, v. 28, n. 8, p. 396-401, 2010.

XIE, Y. et al. Early gonadal development and sex determination in mammal. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 14, p. 7500, 2022.

YU, B. Q. et al. Prevalence of gene mutations in a Chinese 46, XY disorders of sex development cohort detected by targeted next-generation sequencing. **Asian Journal of Andrology**, v. 23, n. 1, p. 69, 2021.

YÜKSEL, B. et al. The novel mutation p. Trp147Arg of the steroidogenic acute regulatory protein causes classic lipoid congenital adrenal hyperplasia with adrenal insufficiency and 46, XY disorder of sex development. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 80, n. 3, p. 163-169, 2013.

ZANOTTI, S. V.; DA SILVA XAVIER, H. V. Atenção à saúde de pacientes com ambiguidade genital. **Arquivos brasileiros de psicologia**, v. 63, n. 2, p. 82-91, 2011.

ZHANG, K. et al. Steroid 5-alpha-reductase type 2 (SRD5A2) gene V89L polymorphism and hypospadias risk: A meta-analysis. **Journal of Pediatric Urology**, v. 13, n. 6, p. 630. e1-630. e9, 2017.

## APÊNDICES

### Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 2016 - 2018

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.) – para os responsáveis

Eu, \_\_\_\_\_ responsável por \_\_\_\_\_ autorizo sua participação como voluntário em estudo realizado no Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes da UFAL. Recebi de Isabella Lopes Monlleó/Susane Vasconcelos Zanotti, responsáveis por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a conhecer as características clínicas e as causas de Distúrbios da Diferenciação do Sexo.
- Que a importância deste estudo é reconhecer as especificidades desses distúrbios na população de Alagoas tomando como referência as pessoas atendidas no serviço de genética do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes.
- Que os resultados que se desejam alcançar são: conhecer as características demográficas e genético-clínicas de DDS na população de Alagoas, bem como as implicações desse tipo de distúrbio genético, especialmente no que se refere à particularidade da puberdade em casos de DDS e suas implicações para os pacientes.
- Que esse estudo começará em outubro de 2016 e terminará em setembro de 2018.
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: coleta de dados clínicos e familiares por meio de exame físico por médico geneticista, atendimento psicológico, grupo de fala e/ou entrevista. Análise de heredograma, cariótipo de sangue periférico, exames hormonais, ultrassonografia abdominal e, quando pertinente, técnicas moleculares para elucidação do diagnóstico.
- Que meu/minha filho(a) participará das seguintes etapas: atendimentos clínico, entrevista, exames laboratoriais e de imagem.
- Que não há outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados.
- Que os incômodos que ele(a) poderá sentir com a participação são: um possível desconforto por envolver aspectos sobre a sua sexualidade; que, no entanto, ele(a) tem o direito de se recusar a responder, caso se sinta constrangido(a).
- Que ele(a) deverá contar com assistência dos responsáveis pela pesquisa, caso tenha dúvidas em relação a mesma, podendo entrar em contato com eles através dos telefones cujos os números encontram-se adiante neste documento.
- Que os benefícios que ele(a) deverá esperar com a sua participação no estudo são a definição do seu diagnóstico e tratamento, aconselhamento genético e atendimento psicológico. Além disso, os benefícios indiretos são a contribuição das informações para ampliação do conhecimento atual sobre esses distúrbios em vista do planejamento de políticas públicas de saúde.
- Que seremos informados sobre o resultado final desta pesquisa, e sempre que desejar será fornecido esclarecimentos sobre qualquer etapa da mesma.
- Que, a qualquer momento ele(a) poderá se recusar a continuar participando da pesquisa e, também, que poderei retirar meu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo;
- Que as informações conseguidas através da participação não permitirão a sua identificação, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só serão feitas entre os profissionais estudiosos do assunto.
- Que eu não terei qualquer despesa com a participação do meu filho nesse estudo e, que poderei ser indenizado por danos que ele venha a sofrer pela mesma razão.
- Que eu receberei uma via assinada do presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a participação do meu/minha filho(a) no mencionado estudo e estando consciente dos nossos direitos, das nossas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que essa participação implica, concordo e autorizo meu/minha filho(a) a participar e, portanto, eu **DOU O MEU CONSENTIMENTO, SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADA OU OBRIGADO(A)**.

**Endereço do(a) participante-voluntário(a):**

Domicílio: (rua, praça, conjunto);  
 Bloco: /Nº: /Complemento;  
 Bairro: /CEP:/Cidade: /Telefone:  
 Ponto de referência: \*

**Contato de urgência:** Profa. Dra. Isabella Lopes Monlleó/Profa. Dra. Susane Vasconcelos Zanotti. Endereço: Serviço de Genética Clínica, Campus A.C. Simões S/no. Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins, Maceió. Tel: 3202-3774

**Endereço d(os,as) responsável(is) pela pesquisa:** Instituição: Universidade Federal de Alagoas  
 Endereço: Campus A.C. Simões S/no. Cidade Universitária – Instituto de Psicologia.  
 Bairro: /CEP:/Cidade: Tabuleiro dos Martins, Maceió. Telefones p/contato: 32141786/32023896

**ATENÇÃO:** Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), pertencente à Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões S/no. Cidade Universitária. Tel.: 32141041 Email: comitedeetica@ufal.br.

(Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntário(o,a))	Nome e Assinatura do(s) responsável(is) pelo estudo
--	---

## Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para responsáveis 2021 - 2026

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.) – para responsáveis (autorização)**

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, presentes nas instituições que realizam pesquisas. Foi criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas, incluindo pesquisas com seres humanos, visa salvaguardar a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar do participante da pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_, responsável por

**autorizo** sua participação como voluntário no estudo realizado no Hospital Universitário da Prof. Alberto Antunes – Universidade Federal de Alagoas (HUPAA-UFAL), intitulado: “Distúrbios da diferenciação do sexo em Alagoas: da atenção primária ao diagnóstico etiológico e tratamento multidisciplinar”. Recebi de Reginaldo José Petrolí/Isabella Lopes Monlleó/Marshall Ítalo Barros Fontes/Reinaldo Luna de Omena Filho/Camila Maia Costa de Queiroz Souto, responsáveis pela execução da pesquisa, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a conhecer as características clínicas e as causas dos Distúrbios da Diferenciação do Sexo.
- Que a importância deste estudo é reconhecer as especificidades desses distúrbios na população de Alagoas.
- Que os resultados que se desejam alcançar são: conhecer as características demográficas e genético-clínicas de DDS na população de Alagoas, bem como as implicações desse tipo de distúrbio genético.
- **Que esse estudo começará em maio de 2021 e terminará em maio de 2026.**
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: coleta de dados clínicos e familiares por meio de entrevista, exame físico por médico geneticista e atendimento psicológico. Essa etapa será realizada durante consulta ambulatorial, no serviço de genética clínica do HUPAA-UFAL, previamente agendada, com duração de aproximadamente 60 minutos. Para auxiliar a elucidação diagnóstica e aconselhamento genético, será realizado:
  - heredograma, para identificar os indivíduos na família;
  - cariótipo, para determinar a constituição cromossômica;
  - **Exames hormonais para estabelecimento do perfil hormonal;**
  - **Ultrassonografia abdominal como exame de imagem do trato genito-urinário;**
  - Exames moleculares, para identificar possíveis alterações no material genético. **(Para a realização dos exames moleculares, o material biológico do participante da pesquisa poderá ser enviado para a Universidade Estadual de Campinas - São Paulo ou outro laboratório particular, com única e exclusiva finalidade de realização de exames que não são realizados no Laboratório de Genética Molecular Humana do HUPAA/UFAL. Após a utilização do material biológico, o mesmo será descartado).**
- **Que meu/minha filho(a) participará das seguintes etapas: atendimento clínico, entrevista e exames de cariótipo, hormonais, imagem e moleculares.**
- Que não há outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados.
- **Que os incômodos que ele(a) poderá sentir com a participação** são: durante a coleta de sangue, que será utilizado para o exame de cariótipo, hormonal e molecular, **meu/minha filho(a) poderá sentir dor no local da picada da agulha.** Depois poderão surgir manchas roxas no mesmo local. Em todas essas situações, me foi garantido que a equipe tomará as providências para que estes incômodos sejam mínimos.
- **Que ele(a) deverá contar com assistência dos responsáveis pela pesquisa, caso tenha dúvidas em relação a mesma, podendo entrar em contato com eles através dos telefones cujo números encontram-se adiante neste documento.**
- **Que os benefícios que ele(a) deverá esperar com sua participação são a definição do seu diagnóstico, tratamento, aconselhamento genético e atendimento psicológico. Além disso, os benefícios indiretos são: contribuição para o maior entendimento sobre os casos de DDS em Alagoas e o aumento nas produções científicas pertinentes ao tema, possibilitando maiores discussões e o aperfeiçoamento do atendimento das pessoas com DDS e seus familiares bem como ampliação do conhecimento atual sobre esses distúrbios em vista do planejamento de políticas públicas de saúde.**

- **Que seremos informados sobre o resultado final desta pesquisa**, e sempre que desejar:
  - Serão fornecidos esclarecimentos sobre as etapas do estudo;
  - A qualquer momento poderei me recusar a continuar participando da pesquisa e, também, que poderei retirar meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo;
- Que as informações conseguidas através da **participação do meu/minha filho(a) não** permitirão identificação, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só serão feitas entre os profissionais estudiosos do assunto.
- Que eu não terei qualquer despesa com a participação **do meu/minha filho(a) nesse estudo e, que poderei ser indenizado por danos que venha a sofrer pela mesma razão.**
- **Que eu receberei uma via assinada do presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**
- Finalmente, tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a participação **do meu/minha filho(a)** no mencionado estudo e estando consciente dos nossos direitos, das nossas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que essa participação implica, **concordo e autorizo a participação do meu/minha filho(a) nesse estudo e, portanto, DOU O MEU CONSENTIMENTO, SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO(A) OU OBRIGADO(A).**
- Este TCLE será impresso em duas VIAS (e não "CÓPIA"), que serão assinadas ao final pelo participante da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pelas pessoas por ele delegadas (Resolução CNS no 466 de 2012, item IV.5.d)

• **Endereço do(a) participante:**

Domicílio: (rua, praça, conjunto):  
 Bloco: /Nº: /Complemento:  
 Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:  
 Ponto de referência:

**Contato de urgência: Prof. Dr. Reginaldo José Petrolí/ Profa. Dra. Isabella Lopes Monlleó/ Prof. Dr Marshall Ítalo Barros Fontes/ Prof. Dr Reinaldo Luna de Omena Filho/ Profa. Dra. Camila Maia Costa de Queiroz Souto. Endereço: Serviço de Genética Clínica, Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes/Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões, Avenida Lourival Melo Mota S/N, Bairro: Tabuleiro dos Martins, Maceió-AL, Brasil, CEP: 57072-970. Telefone p/contato: (82)32023896 / (82)32023774**

**Endereço d(os,as) responsáve(lis) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):**

Universidade Federal de Alagoas - Faculdade de Medicina  
 Avenida Lourival Melo Mota S/N, Bairro: Tabuleiro dos Martins, Maceió-AL, Brasil,  
 CEP: 57072-970  
 Telefone p/contato: 32023896 / 32141858 – E-mail: reginaldo.petroli@famed.ufal.br

**ATENÇÃO:** Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), pertencente à Universidade Federal de Alagoas. Campus A.C. Simões S/no. Cidade Universitária. Tel.: 32141041 E-mail: comitedeetica@ufal.br.

Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) participante da pesquisa.	Nome e Assinatura do(s) responsável(eis) pelo estudo
--	--

## Apêndice C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participantes 2021 - 2026

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.) – para participantes da pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, presentes nas instituições que realizam pesquisas. Foi criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas, incluindo pesquisas com seres humanos, visa salvaguardar a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar do participante da pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_ aceito participar como voluntário do estudo realizado no Hospital Universitário da Prof. Alberto Antunes – Universidade Federal de Alagoas (HUPAA-UFAL), intitulado: “Distúrbios da diferenciação do sexo em Alagoas: da atenção primária ao diagnóstico etiológico e tratamento multidisciplinar”. Recebi de Reginaldo José Petrolí/Isabella Lopes Monlleó/Marshall Ítalo Barros Fontes/Reinaldo Luna de Omena Filho/Camila Maia Costa de Queiroz Souto, responsáveis pela execução da pesquisa, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a conhecer as características clínicas e as causas dos Distúrbios da Diferenciação do Sexo.
- Que a importância deste estudo é reconhecer as especificidades desses distúrbios na população de Alagoas.
- Que os resultados que se desejam alcançar são: conhecer as características demográficas e genético-clínicas de DDS na população de Alagoas, bem como as implicações desse tipo de distúrbio genético.
- **Que esse estudo começará em maio de 2021 e terminará em maio de 2026.**
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: coleta de dados clínicos e familiares por meio de entrevista, exame físico por médico geneticista e atendimento psicológico. Essa etapa será realizada durante consulta ambulatorial, no serviço de genética clínica do HUPAA-UFAL, previamente agendada, com duração de aproximadamente 60 minutos. Para auxiliar a elucidação diagnóstica e aconselhamento genético, será realizado:
  - heredograma, para identificar os indivíduos na família;
  - cariótipo, para determinar a constituição cromossômica;
  - **Exames hormonais para estabelecimento do perfil hormonal;**
  - **Ultrassonografia abdominal como exame de imagem do trato genito-urinário;**
  - Exames moleculares, para identificar possíveis alterações no material genético. **(Para a realização dos exames moleculares, o material biológico poderá ser enviado para a Universidade Estadual de Campinas - São Paulo ou outro laboratório particular, com única e exclusiva finalidade de realização de exames que não são realizados no Laboratório de Genética Molecular Humana do HUPAA/UFAL. Após a utilização do material biológico, o mesmo será descartado).**
- **Que participarei das seguintes etapas: atendimento clínico, entrevista e exames de cariótipo, hormonais, imagem e moleculares.**
- Que não há outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados.
- **Que os incômodos que posso sentir com minha participação são:** durante a coleta de sangue, que será utilizado para exame de cariótipo, hormonal e molecular, posso sentir dor no local da picada da agulha. Depois poderão surgir manchas roxas no mesmo local. Em todas essas situações, me foi garantido que a equipe tomará as providências para que estes incômodos sejam mínimos.
- **Que devo** contar com assistência dos responsáveis pela pesquisa, caso tenha dúvidas em relação a mesma, podendo entrar em contato com eles através dos telefones cujo números encontram-se adiante neste documento.
- Que os benefícios **que devo esperar com minha participação são: diagnóstico, tratamento, aconselhamento genético e atendimento psicológico. Além disso, os benefícios indiretos são: contribuição para** o maior entendimento sobre os casos de DDS em Alagoas e o aumento nas produções científicas pertinentes ao tema, possibilitando maiores discussões e o aperfeiçoamento do atendimento das pessoas com DDS e seus familiares bem como ampliação do conhecimento atual sobre esses distúrbios em vista do planejamento de políticas públicas de saúde.
- **Que serei informado sobre o resultado final desta pesquisa, e sempre que desejar:**
  - Serão fornecidos esclarecimentos sobre as etapas do estudo;
  - A qualquer momento poderei me recusar a continuar participando da pesquisa e, também, que poderei

retirar meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo;

1 de 2

- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão identificação, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só serão feitas entre os profissionais estudiosos do assunto.
- Que eu não terei qualquer despesa com minha participação **nesse estudo e, que poderei ser indenizado por danos que venha a sofrer pela mesma razão.**
- **Que eu receberei uma via assinada do presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**
- Finalmente, tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos nossos direitos, das nossas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que essa participação implica, **concordo em participar desse estudo e, portanto, DOU O MEU CONSENTIMENTO, SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO(A) OU OBRIGADO(A).**
- Este TCLE será impresso em duas VIAS (e não "CÓPIA"), que serão assinadas ao final pelo participante da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pelas pessoas por ele delegadas (Resolução CNS no 466 de 2012, item IV.5.d)

<p>• <b>Endereço do(a) participante:</b> Domicílio: (rua, praça, conjunto):</p> <p>Bloco: /Nº: /Complemento: Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:</p> <p>Ponto de referência:</p>
--

<p><b>Contato de urgência: Prof. Dr. Reginaldo José Petrolí/ Profa. Dra. Isabella Lopes Monlleó/ Prof. Dr Marshall Ítalo Barros Fontes/ Prof. Dr Reinaldo Luna de Omena Filho/ Profa. Dra. Camila Maia Costa de Queiroz Souto. Endereço: Serviço de Genética Clínica, Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes/Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões. Avenida Lourival Melo Mota S/N, Bairro: Tabuleiro dos Martins, Maceió-AL, Brasil, CEP: 57072-970. Telefone p/contato: (82)32023896 / (82)32023774</b></p>
---

<p><b>Endereço d(os,as) responsável(is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):</b> Universidade Federal de Alagoas - Faculdade de Medicina Avenida Lourival Melo Mota S/N, Bairro: Tabuleiro dos Martins, Maceió-AL, Brasil, CEP: 57072-970 Telefone p/contato: 32023896 / 32141858 – E-mail: reginaldo.petroli@famed.ufal.br</p>
---

<p><b>ATENÇÃO:</b> Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), pertencente à Universidade Federal de Alagoas. Campus A.C. Simões S/no. Cidade Universitária. Tel.: 32141041 Email: comitedeetica@ufal.br.</p>
---

<p>Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) participante da pesquisa.</p>	<p>Nome e Assinatura do(s) responsável(is) pelo estudo</p>
---	--

2 de 2

## ANEXOS

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa CAAE: 59929716.8.0000.5013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Caracterização de Distúrbios da Diferenciação do Sexo em Alagoas: uma abordagem multidisciplinar no SUS

**Pesquisador:** SUSANE VASCONCELOS ZANOTTI

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 1

**CAAE:** 59929716.8.0000.5013

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Alagoas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.753.489

**Apresentação do Projeto:**

O presente projeto amplia as investigações, iniciadas em 2009, a partir do anseio de pesquisadores em modificar o panorama do atendimento a pacientes com diagnóstico de distúrbios da diferenciação do sexo em Alagoas. Sendo assim, enfatiza a importância de uma abordagem multidisciplinar no atendimento a casos de distúrbios da diferenciação do sexo, em virtude de sua complexidade quanto ao diagnóstico, tratamento, e seus efeitos subjetivos para pais e pacientes. Tem como objetivos: (1) descrever as características clínicas e etiológicas de pessoas com diagnóstico de Distúrbios da Diferenciação do sexo atendidas no SGC/HUPAA-UFAL; (2) atualizar e ampliar o banco de dados de pacientes com Distúrbios da Diferenciação do sexo em Alagoas; (3) examinar a particularidade da puberdade em casos de Distúrbios da Diferenciação do Sexo e suas implicações para os pacientes; (4) aprofundar o estudo psicanalítico sobre a puberdade em casos de Síndrome de Turner, especialmente no que se refere ao corpo e à sexualidade feminina; (5) reunir informações para subsidiar o planejamento da atenção à saúde de pessoas com DDS no SUS em Alagoas. Métodos: pesquisa observacional com amostra a ser constituída por sujeitos com DDS em qualquer idade, com ou sem anormalidades da morfologia genital externa. Para coleta de dados será utilizado protocolo clínico; exames clínicos e

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A - C. Simões,

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 57.072-900

**UF:** AL

**Município:** MACEIO

**Telefone:** (82)3214-1041

**E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS



Continuação do Parecer: 1.753.489

laboratoriais; entrevista clínica e/ou grupo de fala com pacientes púberes e/ou com diagnóstico de Síndrome de Turner; oficina sobre DDS com profissionais das principais maternidades da rede pública de Maceió. As características etiológicas serão estudadas com base na análise de heredograma, cariótipo de sangue periférico e, quando pertinente, técnicas moleculares. A análise do material reunido sobre a puberdade em casos de DDS e suas implicações para os pacientes será realizada a partir da leitura psicanalítica sobre a saída da infância, a diferença dos sexos, o despertar para o mal-estar e a exigência de um trabalho psíquico. Por meio desta nova abordagem acredita-se que será possível ampliar o conhecimento sobre as características demográficas, clínicas e etiológicas de DDS na população de Alagoas, bem como a particularidade da puberdade em casos de Distúrbios da Diferenciação do Sexo e suas implicações para os pacientes. Palavras-chave: psicologia, genética, endocrinopediatria, distúrbios da diferenciação do sexo.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário: Objetivo geral: Analisar as principais características de Distúrbios da Diferenciação do Sexo (DDS) em Alagoas, a partir do aporte multidisciplinar dos aspectos clínicos e laboratoriais.

Objetivo Secundário: Objetivos específicos: (1) Descrever as características clínicas e etiológicas de pessoas com diagnóstico de Distúrbios da Diferenciação do sexo atendidas no SGC/HUPAA-UFAL. (2) Atualizar e ampliar o banco de dados de pacientes com Distúrbios da Diferenciação do sexo em Alagoas. (3) Examinar a particularidade da puberdade em casos de Distúrbios da Diferenciação do Sexo e suas implicações para os pacientes. (4) Aprofundar o estudo psicanalítico sobre a puberdade em casos de Síndrome de Turner, especialmente no que se refere ao corpo e à sexualidade feminina. (5) Reunir informações para subsidiar o planejamento da atenção à saúde de pessoas com DDS no SUS em Alagoas

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: Os riscos que a pesquisa possa acarretar ao participantes caracterizam-se por alguns incômodos que ele(a) poderá sentir: um possível desconforto por envolver aspectos sobre a sexualidade; que, no entanto, ele(a) tem o direito de se recusar a responder, caso se sinta constrangido(a).

Benefícios: Quanto aos benefícios esperados com a pesquisa com a participação no estudo destaca-se a definição do seu diagnóstico e tratamento, aconselhamento genético e atendimento psicológico. Além disso, os benefícios indiretos são a contribuição das informações para

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A - C. Simões,  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 57.072-900  
 UF: AL Município: MACEIO  
 Telefone: (82)3214-1041 E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS



Continuação do Parecer: 1.753.489

ampliação do conhecimento atual sobre esses distúrbios em vista do planejamento de políticas públicas de saúde.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de estudo transversal para aprofundar conhecimentos sobre os Distúrbios de Diferenciação do Sexo em Alagoas. Além disso procura identificar de forma multidisciplinar maneiras de aperfeiçoar o tratamento desta condição

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequadamente apresentados

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Por estar de acordo com as recomendações da Resolução 466/12 sugerimos sua aprovação

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P ROJETO_757506.pdf	15/09/2016 06:11:43		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEPfinal.pdf	15/09/2016 06:05:07	SUSANE VASCONCELOS ZANOTTI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEResponsaveisDDS2016.pdf	15/09/2016 06:02:42	SUSANE VASCONCELOS ZANOTTI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEpacientesDDS2016.pdf	15/09/2016 06:02:12	SUSANE VASCONCELOS ZANOTTI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoHUPAA.pdf	14/07/2016 15:57:07	SUSANE VASCONCELOS ZANOTTI	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termopesquisador.pdf	14/07/2016 15:55:15	SUSANE VASCONCELOS ZANOTTI	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	14/07/2016 15:48:44	SUSANE VASCONCELOS ZANOTTI	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	14/07/2016 15:34:41	SUSANE VASCONCELOS ZANOTTI	Aceito

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 57.072-900  
**UF:** AL **Município:** MACEIO  
**Telefone:** (82)3214-1041

**E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS



Continuação do Parecer: 1.753.489

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MACEIO, 29 de Setembro de 2016

---

**Assinado por:**  
**Luciana Santana**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A - C. Simões,

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 57.072-900

**UF:** AL

**Município:** MACEIO

**Telefone:** (82)3214-1041

**E-mail:** comitedeeticafal@gmail.com

## ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa CAAE: 40078620.4.0000.5013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Distúrbios da diferenciação do sexo em Alagoas: da atenção primária ao diagnóstico etiológico e tratamento multidisciplinar

**Pesquisador:** Reginaldo José Petrolí

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 40078620.4.0000.5013

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.598.307

**Apresentação do Projeto:**

Os Distúrbios da Diferenciação do Sexo (DDS) são condições congênitas complexas, onde o desenvolvimento do sexo cromossômico, gonadal e anatômico é atípico. A avaliação multidisciplinar de pessoas com DDS é tarefa fundamental e indispensável para o correto diagnóstico e melhor prognóstico das famílias afetadas. Em Alagoas, a atenção dos casos de DDS por equipe multidisciplinar iniciaram em 2008, o que possibilitou o atendimento de aproximadamente 250 famílias até o presente. da iniciativa de professores dos cursos de Psicologia e Medicina da Universidade Federal de Alagoas e UNCISAL, respectivamente. Em 2009-2011, a primeira investigação no âmbito do Programa de Pesquisas para o SUS (PPSUS), "Atenção integrada em saúde a pacientes com ambiguidade genital em hospital terciário do SUS em Alagoas" (ZANOTTI, 2011) analisou os resultados de uma proposta de atendimento clínico integrado a participantes da pesquisa com quadro de anormalidade genital. Os resultados demonstraram que a interlocução entre os profissionais estruturou, sistematizou e padronizou a rotina de atendimento integrado no ambulatório de genética e possibilitou uma prática clínica menos fragmentada e orientada pela especificidade de cada caso. Em 2013-2015, a segunda pesquisa no âmbito do PPSUS, "Distúrbios da diferenciação do sexo em Alagoas: abordagem clínica no SUS" (ZANOTTI, 2015) propôs a ampliação do primeiro estudo, para abranger casos de DDS que

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A. C. Simões,

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 57.072-900

**UF:** AL

**Município:** MACEIO

**Telefone:** (82)3214-1041

**E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

## UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS



Continuação do Parecer: 4.598.307

se manifestam como alterações da diferenciação sexual secundária e da fertilidade. Assim, ampliou o número e o recorte diagnóstico da base de dados criada na pesquisa anterior, e abarcou os DDS com alterações dos cromossomos sexuais – 47,XXY (Síndrome de Klinefelter), 45,X (Síndrome de Turner), 45,X/46,XY (Disgenesia gonadal mista) e 46,XX/46,XY (quimerismo). Esse estudo possibilitou, na interface da medicina com a psicologia, a caracterização clínica e etiológica de pessoas com DDS atendidas no SGC/HUPAA-UFAL; a análise dos efeitos subjetivos do diagnóstico para os participantes da pesquisa, especialmente no que se refere à diferença sexual, à angústia e à relação que estabelecem com o próprio corpo. Além disso, auxiliou a manutenção do serviço de referência no Estado de Alagoas para pessoa com DDS, ao viabilizar a realização de exames essenciais para a investigação diagnóstica, como o cariótipo, e, a atenção integrada em saúde por médicos e psicólogos. A última pesquisa no PPSUS, "Caracterização de Distúrbios da diferenciação do sexo em Alagoas: uma abordagem multidisciplinar no SUS" (ZANOTTI, 2018) tomou os resultados das pesquisas anteriores como referenciais e propôs uma outra ampliação: o aporte multidisciplinar dos aspectos clínicos e laboratoriais. Novamente na interface da medicina com a psicologia, a equipe técnica foi constituída por profissionais/pesquisadores de três Universidades distintas e de diferentes especialidades: genética clínica; genética molecular; endocrinopediatria; citogenética e psicologia. A partir da investigação diagnóstica; dos resultado dos exames laboratoriais e da decisão tomada a partir do mesmo; das falas dos participantes da pesquisa sobre o diagnóstico de distúrbios da diferenciação do sexo e os impasses da puberdade, foi possível ampliar o conhecimento sobre as características demográficas, clínicas e etiológicas de DDS na população de Alagoas, bem como a particularidade da puberdade em casos de Distúrbios da Diferenciação do Sexo e suas implicações. A presente proposta visa a continuidade das ações de saúde relacionadas aos DDS, tomando como referência as experiências das edições PPSUS acima citadas, propõe a manutenção do atendimento integrado e parcerias intra e interinstitucionais, além de ampliar os cenários de atendimento para o Programa Nacional de Triagem Neonatal de Alagoas e Núcleo de Atenção à Saúde da Família da capital e interior e interior do estado. Trata-se de pesquisa observacional com amostra a ser constituída por pessoas com suspeita de Distúrbio da Diferenciação do Sexo (DDS), em qualquer idade, com ou sem anormalidades genitais. Com base na taxa de nascimentos em Alagoas, na prevalência de DDS e na demanda espontânea ao SGC/HUPAA-UFAL, estima-se a inclusão de 50 casos. Durante a realização do projeto, será associado à prática médica de consulta ambulatorial e acolhimento com equipe da psicologia. O primeiro passo da investigação laboratorial do diagnóstico consistirá na realização de exame de cariótipo para todos os participantes da pesquisa. Esta etapa será

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 57.072-900

**UF:** AL

**Município:** MACEIO

**Telefone:** (82)3214-1041

**E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS



Continuação do Parecer: 4.598.307

realizada na Uncisal, utilizando as técnicas de bandamento G (Giemsa). A partir do cariótipo serão realizados: (1) perfil hormonal (eixo hipotálamohipófise-gônadas/supra-renais) e (2) ultrassonografia do trato geniturinário (3) exame molecular, conforme indicação, como por exemplo: Reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento pelo método Sanger, MLPA, Sequenciamento de exoma. Para os exames moleculares, será extraído o DNA dos participantes da pesquisa, através da técnica fenólica já implantada no Serviço de genética clínica do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da UFAL (SGC/HUPAA/UFAL). Os DNAs extraídos serão utilizados para a elucidação etiológica dos casos triados pela casa do pezinho para a hiperplasia adrenal congênita (HAC) e dos casos novos atendidos no SGC/HUPAA/UFAL. Abordagens inovadoras para o diagnóstico dos casos de DDS são fundamentais para a elucidação diagnóstica. Nesse sentido, após avaliação de cada caso por equipe multidisciplinar, composta por especialistas com ampla expertise no assunto, será traçada e estratégia para a elucidação etiológica dos casos novos e dos casos e idiopáticos. Para os casos triados para HAC pelo programa Nacional de Triagem neonatal de Alagoas, será realizada a investigação de mutações frequentes no gene CYP21A2, através da PCR Alelo Específico. Essa etapa será realizada no SGC/HUPAA/UFAL. Para os casos de HAC que não apresentarem alterações pela PCR, será realizado o sequenciamento completo e MLPA do gene CYP21A2. Uma das metas desse projeto é a implementação do sequenciamento do CYP21A2 no SGC/UFAL. Como trata-se de uma técnica complexa, a equipe executora do CBMEG/UNICAMP, que apresenta vasto conhecimento nesse tipo de exame, auxiliará nos ensaios e realizará a contraprova dos resultados. A coleta de dados clínicos e familiares serão obtidos da partir dos seguintes instrumentos: protocolo utilizado no ambulatório de genética do HUPAA, testado e aplicado em estudo anterior (Gazzaneo, et. al, 2015). Para os casos idiopáticos, será realizado o sequenciamento do exoma, uma técnica robusta que identifica alteração em todos o genes do genoma humano. Essa técnica está sendo usado para casos idiopáticos e tem facilitado a elucidação etiológica dos casos de DDS. Essa etapa será realizada em laboratórios particulares e a validação dos dados será realizada no CBMEG/UNICAMP e SGC/HUPAA/UFAL. Visando ampliar e compartilhar o conhecimento acerca da atenção à saúde de pessoas com DDS no SUS, será realizada oficina sobre DDS nos programas de residência em pediatria de Alagoas e para psicólogos dos núcleos de atenção à saúde da família da capital e interior de Alagoas. Na última etapa da metodologia, a equipe se dedicará à produção do relatório através da organização das discussões dos resultados provenientes dos diferentes métodos utilizados. Critério de Inclusão: Pessoas com suspeita de Distúrbio da Diferenciação do Sexo, em qualquer idade, com ou sem anormalidades genitais, oriundos do Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário Professor

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A - C. Simões,

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 57.072-900

**UF:** AL

**Município:** MACEIO

**Telefone:** (82)3214-1041

**E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS



Continuação do Parecer: 4.598.307

Alberto Antunes da UFAL e do Programa Nacional de Triagem Neonatal de Alagoas. Critério de Exclusão: Serão excluídos natimortos e casos de malformações múltiplas.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário: Ampliar e descentralizar a atenção à saúde dos casos de distúrbio da diferenciação do sexo atendidos no SUS em Alagoas.

Objetivo Secundário:

1 – Descrever as características clínicas e etiológicas dos casos de Distúrbio da Diferenciação do Sexo (DDS) atendidos no SUS em Alagoas, com informações adquiridas durante o atendimento por equipe multidisciplinar e resultados dos exames complementares para a elucidação etiológica.

2 - Atualizar o banco de dados sobre Distúrbio da Diferenciação do Sexo em Alagoas, com informações colhidas durante o atendimento e estudo de cada caso, com informações sociodemográficas, clínicas, citogenéticas e moleculares.

3 - Compor um banco de dados único para os casos de HAC de Alagoas. Considerando que o PNTN e o serviço de genética clínica do HUPAA reúnem todos os casos de HAC atendidos pelo SUS em Alagoas, será criado um banco de dados único, com informações sociodemográficas, clínicas, citogenéticas e moleculares de cada caso. Isso facilitará o entendimento sobre suas particularidades, além de facilitar o planejamento de ações, no âmbito do SUS, para esses casos.  
4 – Descrever os efeitos das reuniões do grupo de DDS no atendimento dos casos por equipe multidisciplinar, através de reuniões clínicas, com periodicidade mensal, com os integrantes do grupo multidisciplinar de DDS/HUPAA/UFAL. A partir do registro escrito das reuniões, será realizada análise qualitativa das reuniões multidisciplinares, considerando: as demandas endereçadas ao ambulatório de DDS; a discussão de casos clínicos e a direção do tratamento; os impasses na atenção integrada em saúde.

5 - Descentralizar ações de saúde para os casos de DDS de Alagoas, através do intercâmbio de experiência entre o grupo multidisciplinar de DDS do HUPAA com profissionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) de Alagoas e Núcleo de Apoio à Saúde da Família (NASF) da capital e interior do estado. Para atingir esse objetivo, será realizado curso de capacitação para os profissionais de saúde do PNTN e NASF.

6 - Reunir informações para subsidiar o planejamento da atenção à saúde de pessoas com DDS no SUS em Alagoas, através das informações descritas nos objetivos anteriores e das reuniões multidisciplinares.

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 57.072-900

**UF:** AL

**Município:** MACEIO

**Telefone:** (82)3214-1041

**E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS



Continuação do Parecer: 4.598.307

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** As amostras de sangue periférico serão obtidas por punção venosa, com risco muito baixo. O risco da coleta de sangue pode incluir hiperemia local transitória, hematoma, celulite ou flebite. O desconforto será mínimo, pois a coleta será realizada por profissional treinado ou pelo responsável pelo projeto, devidamente habilitados para este procedimento. **Medidas de proteção:** assepsia e antisepsia do local para a coleta de amostra de sangue e utilização de materiais descartáveis. A Ultrassonografia não apresenta risco ao paciente, exceto às crianças que necessitem de sedação para realização do exame. Contudo, a sedação é de baixo risco e realizada na presença de médico e de equipamento de segurança necessários. **Benefícios:** Como benefícios, podemos elencar: aumento nas produções científicas pertinentes ao tema, possibilitando maiores discussões e o aperfeiçoamento do atendimento de pessoas com DDS e seus familiares bem como ampliação do conhecimento atual sobre esses distúrbios em vista do planejamento de políticas públicas de saúde.

**Benefícios:**

Como benefícios, podemos elencar: aumento nas produções científicas pertinentes ao tema, possibilitando maiores discussões e o aperfeiçoamento do atendimento de pessoas com DDS e seus familiares bem como ampliação do conhecimento atual sobre esses distúrbios em vista do planejamento de políticas públicas de saúde.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O presente estudo se encontra de acordo com a Resolução 466/12.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Sem óbice ético.

**Recomendações:**

-

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

**PENDÊNCIAS NO PROJETO**

- Recrutamento do participante e aquisição do TCLE - Solicita-se que o termo "paciente/sujeito/voluntário" seja substituído pelo termo "participante da pesquisa" ao longo do texto, conforme definição disposta no item II.10 da Resolução CNS n. 466 de 2012 e art. 2º, XIII da

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A. C. Simões,

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 57.072-900

**UF:** AL

**Município:** MACEIO

**Telefone:** (82)3214-1041

**E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS**



Continuação do Parecer: 4.598.307

Resolução CNS n. 510 de 2016: descrever essa etapa;

- Razões para utilização de grupos vulneráveis: descrever - PENDÊNCIA ATENDIDA
- CRITÉRIOS PARA SUSPENDER A PESQUISA incluir PENDÊNCIA ATENDIDA

**PENDÊNCIA DOCUMENTAL**

- Autorizações: arquivo de Autorização da pesquisa não está abrindo. Reanexá- lo - PENDÊNCIA ATENDIDA

- INSTRUMENTO DA PESQUISA: incluir, com a opção "Não desejo responder" no Instrumento de coleta de dados - PENDÊNCIA ATENDIDA

IMPORTANTE: TODOS OS ARQUIVOS ANEXADOS A PLATAFORMA devem permitir o uso dos recursos "copiar" e "colar" em qualquer palavra ou trecho do texto (Norma Operacional CNS nº 001 de 2013, anexo II - PENDÊNCIA ATENDIDA

- lista de checagem para protocolos de pesquisa). PENDÊNCIA ATENDIDA

- Arquivos dos pesquisadores e instituições participantes e coparticipantes estão violados. Reanexá- los - PENDÊNCIA ATENDIDA

**PENDÊNCIAS NO TCLE**

- O arquivo anexado a plataforma permite recurso "COPIAR" e "COLAR" - O arquivo deve permitir o uso dos recursos "copiar" e "colar" em qualquer palavra ou trecho do texto (Norma Operacional CNS nº 001 de 2013, anexo II - lista de checagem para protocolos de pesquisa): - Rever, pois o arquivo do TCLE não permite a opção copiar e colar - PENDÊNCIA ATENDIDA

- Nomenclatura relativa ao participante da pesquisa - Solicita-se que o termo "paciente/sujeito/voluntário" seja substituído pelo termo "participante da pesquisa" ao longo do texto do TCLE, conforme definição disposta no item II.10 da Resolução CNS nº 466 de 2012: rever em seu texto. PENDÊNCIA ATENDIDA

- Numeração de página - Todas as páginas devem ser enumeradas, com a quantidade total delas, como, por exemplo: "1 de 3" e assim sucessivamente, até a página "3 de 3": rever em seu texto - Linguagem acessível: rever linguagem para que haja compreensão dos participantes da pesquisa - PENDÊNCIA ATENDIDA

- Período do estudo: -Rever o início da coleta de dados, considerando Maio/2020 para o início das atividades do PPSUS - PENDÊNCIA ATENDIDA

- Justificativa, objetivos e procedimentos - Quanto aos procedimentos, descrever no TCLE os procedimentos a serem realizados na pesquisa, pontuando quais análises serão realizadas e o

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 57.072-900

**UF:** AL

**Município:** MACEIO

**Telefone:** (82)3214-1041

**E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

Continuação do Parecer: 4.598.307

objetivo de cada análise (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.a). Quanto ao esclarecimento do participante, os procedimentos adotados no estudo devem ser explicitados de forma menos sintética no TCLE, informando-se, por exemplo,

o local e o momento em que ocorrerão as entrevistas/questionário/grupo focal, bem como seu tempo de duração e os tópicos a serem abordados: incluir. **PENDÊNCIA ATENDIDA**

- Deixar mais claro todas etapas e procedimentos a serem realizados com os participantes da pesquisa, pois no item "que eu participarei da seguinte forma: entrevista" não explicita todos os procedimentos a serem realizados; **PENDÊNCIA ATENDIDA**

- Rever os incômodos no TCLE – PACIENTES – pois se refere ao TCLE de responsáveis (vide trecho– "... um possível desconforto por envolver aspectos da sexualidade do meu filho(a)..." e não está de acordo com o texto descrito no projeto de pesquisa. **PENDÊNCIA ATENDIDA**

- Incluir uma breve descrição do que é o CEP e qual a sua função - O TCLE deve conter uma breve descrição do que é o CEP e qual a sua função - **PENDÊNCIA ATENDIDA**

- Garantia que o documento será emitido em duas vias - Solicita-se que conste neste documento informação de que o TCLE é elaborado em duas VIAS (e não "CÓPIA"), que deverão ser assinadas ao final pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pelas pessoas por ele delegadas (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.5.d): incluir - **PENDÊNCIA ATENDIDA**

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Ilmo. Prof. Reginaldo José Petrolli, lembre-se que, segundo a Res. CNS 466/12:

O Participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber cópia do TCLE, na íntegra, por ele assinado, a não ser em estudo com autorização de declínio;

V.Sª. deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade por este CEP, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata;

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A - C. Simões,  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 57.072-900  
**UF:** AL **Município:** MACEIO  
**Telefone:** (82)3214-1041 **E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS**



Continuação do Parecer: 4.598.307

O CEP deve ser imediatamente informado de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É responsabilidade do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas a evento adverso ocorrido e enviar notificação a este CEP e, em casos pertinentes, à ANVISA;

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial;

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1653823.pdf	22/01/2021 15:41:13		Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_PPSUS_DDS.pdf	22/01/2021 15:37:47	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Brochura Pesquisa	brochura_atualizada.pdf	22/01/2021 15:20:37	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Outros	HUPAA_COEXECUTORA.pdf	22/01/2021 15:04:13	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Outros	Unicamp_COEXECUTORA.pdf	22/01/2021 15:03:37	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Outros	Uncisal_COEXECUTORA.pdf	22/01/2021 15:03:13	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Outros	SESAU_COEXECUTORA.pdf	22/01/2021 15:02:48	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ALESSANDRA.pdf	22/01/2021 14:54:39	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ANDREA.pdf	22/01/2021 14:53:46	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ISABELLA.pdf	22/01/2021 14:53:22	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Declaração de Pesquisadores	MARICILDA.pdf	22/01/2021 14:52:59	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Declaração de Pesquisadores	REINALDO.pdf	22/01/2021 14:52:43	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Declaração de Pesquisadores	SUSANE.pdf	22/01/2021 14:52:23	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Declaração de Pesquisadores	MARA.pdf	22/01/2021 14:52:07	Reginaldo José Petrolí	Aceito

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A - C. Simões,

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 57.072-900

**UF:** AL

**Município:** MACEIO

**Telefone:** (82)3214-1041

**E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS**



Continuação do Parecer: 4.598.307

Declaração de Pesquisadores	GIL.pdf	22/01/2021 14:51:29	Reginaldo José Petrolí	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_atualizado.pdf	22/01/2021 11:21:23	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Outros	Divulgacao.pdf	13/11/2020 17:04:23	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Outros	Dados.pdf	13/11/2020 17:02:51	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Outros	Normas.pdf	13/11/2020 16:59:35	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Outros	Confidencialidade.pdf	13/11/2020 16:57:30	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	13/11/2020 16:55:59	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	UFAL.pdf	13/11/2020 14:59:54	Reginaldo José Petrolí	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	brochura.pdf	08/11/2020 08:56:59	Reginaldo José Petrolí	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MACEIO, 18 de Março de 2021

\_\_\_\_\_  
**Assinado por:**  
**CAMILA MARIA BEDER RIBEIRO GIRISH PANJWANI**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 57.072-900

**UF:** AL

**Município:** MACEIO

**Telefone:** (82)3214-1041

**E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com