

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CAMPUS A. C. SIMÕES  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

HELOÍSA CRISTINA DA SILVA

**ANÁLISE PREDITIVA *IN SILICO* DE UMA ALTERAÇÃO INÉDITA NO GENE DO  
RECEPTOR DE ANDRÓGENOS ENCONTRADA EM UMA FAMÍLIA COM  
INSENSIBILIDADE ANDROGÊNICA**

Maceió

2024

HELOÍSA CRISTINA DA SILVA

**ANÁLISE PREDITIVA *IN SILICO* DE UMA ALTERAÇÃO INÉDITA NO GENE DO  
RECEPTOR DE ANDRÓGENOS ENCONTRADA EM UMA FAMÍLIA COM  
INSENSIBILIDADE ANDROGÊNICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito à obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo José Petrolí

Maceió

2024

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

Bibliotecária: Helena Cristina Pimentel do Vale CRB4 - 661

- S586a Silva, Heloisa Cristina da  
Análise preditiva in silico de uma alteração inédita no gene do receptor de andrógenos encontrada em uma família com insensibilidade androgênica / Heloisa Cristina da Silva. – 2024.  
43 f. : il.
- Orientador: Reginaldo José Petroli.  
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2024.
- Bibliografia: f. 40-43.
1. Síndrome de resistência a andrógenos. 2. Receptores androgênicos. 3. Bioinformática. 4. Cromossomo X. I. Título.

CDU: 576.33

## Folha de Aprovação

HELOÍSA CRISTINA DA SILVA

### ANÁLISE PREDITIVA *IN SILICO* DE UMA ALTERAÇÃO INÉDITA NO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS ENCONTRADA EM UMA FAMÍLIA COM INSENSIBILIDADE ANDROGÊNICA

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à banca examinadora do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas e aprovado em oito de novembro de 2024.



Documento assinado digitalmente  
REGINALDO JOSE PETROLI  
Data: 18/11/2024 09:07:32-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Reginaldo José Petrolí, Universidade Federal de Alagoas (Orientador)

#### Banca examinadora:



Documento assinado digitalmente  
DEBORA DE PAULA MICHELATTO  
Data: 18/11/2024 13:47:34-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Débora de Paula Michelatto, Universidade Federal de Alagoas.



Documento assinado digitalmente  
JOSE ROBERTO DE OLIVEIRA FERREIRA  
Data: 18/11/2024 19:31:52-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. José Roberto de Oliveira Ferreira, Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas.

Dedico este trabalho aos meus pais, cuja sabedoria, paciência e amor incondicional sempre foram o alicerce da minha vida, e por me ensinarem o valor do esforço e da perseverança. Mesmo quando eu não acreditava em mim, eles acreditaram.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, porque sem Ele nada disso seria possível. Quando pensei em desistir, Ele segurou não só a minha mão, mas me deitou em Seu colo e me consolou, assim como está escrito em Salmos 23:4: “ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque Tu estás comigo, a Tua vara e o Teu cajado me consolam”. Andei por muitos vales, mas o Senhor esteve comigo em todos eles, e sempre estará.

Aos meus pais, Edleuza e Josivan, que nunca deixaram de fazer o que podiam para me ver feliz. Devo tudo isso á eles. Nunca pensei que chegaria até aqui, mas com Deus e eles, eu cheguei. Nada nunca será o suficiente para agradecê-los. Obrigada por serem os melhores pais. Eu amo vocês!

À minha irmã, Jhulia, que mesmo eu me tornando uma irmã um pouco ausente, sempre esteve comigo. Obrigada por me apoiar da sua maneira. Eu amo você!

À Amanda, que fez desse processo algo mais leve e divertido. Obrigada pelos momentos de risada, conselhos, de falar do nosso Criador, e por se fazer sempre presente. Se tornou mais do que amiga, mas uma irmã, e eu amo você.

Às minhas amigas-irmãs, Marcielly, Jéssica Araújo, Laysa, Aline, Isabela e Larissa. Sou muito grata a Deus por todas vocês, pois Ele as colocou em meu caminho para me dar ainda mais forças para prosseguir. Amo vocês!

Ao meu amigo, Vinícius, que foi importante nesse processo, e sempre acreditou em mim.

À minha família (avós, tios/as, primos/as), que abriram as portas de suas casas e vidas para apoiar o meu sonho e esforços.

Ao meu professor Reginaldo, que não me abandonou desde o início do curso até aqui, e não mediu esforços para ensinar. Obrigada por tanto e por tudo!

Aos meus colegas de turma, que foram essenciais para essa caminhada, seja na cumplicidade, seja nas ideias e ajudas em provas e trabalhos.

Ao meu Laboratório de Genética Molecular Humana, e a todos que por ele passaram. Tenho um grande carinho por este lugar.

Aos meus professores, que compartilharam seus conhecimentos profissionais e de vida. Sou grata a todos!

Aos programas de pesquisa, que contribuíram para a realização de todos os trabalhos até aqui.

À todos que passaram por mim nesse processo, e tiveram sua parcela importante na minha vida. Muito obrigada!

## RESUMO

A Síndrome da Insensibilidade Androgênica (SIA) teve seus primeiros casos relatados em 1953, por Morris; é definida como uma condição rara com herança recessiva ligada ao cromossomo X, e compreende-se como a causa mais comum de Distúrbios do Desenvolvimento do Sexo (DDS) em indivíduos com cariótipo 46,XY. Fenotipicamente, as características dessa síndrome, variam desde fenótipos de aparência feminina, com presença de testículos, desenvolvimento de mamas e sem desenvolvimento de pelos, até fenótipos masculinos, sendo inférteis e/ou com ginecomastia. A SIA é resultado de interferências na ligação dos hormônios testosterona (T) e di-hidrotestosterona (DHT) ao Receptor de Andrógenos (AR), que é uma proteína que funciona como um fator de transcrição, regulando os genes envolvidos em processos fisiológicos relacionados ao desenvolvimento das características sexuais masculinas. O gene *AR* está localizado na região Xq11-12. A proteína AR possui 3 domínios: o domínio amino terminal (N-terminal), responsável pela regulação transcricional; o domínio de ligação ao DNA, responsável pela localização nuclear e ligação do AR às sequências de DNA dos elementos andrógeno-responsivos; e o domínio de ligação carboxi terminal (C-terminal), responsável pela ligação da T a DHT e transativação. O impacto de alterações não previamente descritas na proteína AR pode ser investigado através da análise preditiva *in silico*, uma ferramenta que auxilia no entendimento do efeito da alteração sobre a proteína. Com isso, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da alteração p.Ala567Asp na proteína AR através de programas de bioinformática. Os programas e sites utilizados foram: HGMD, ARDB Clinvar, Clustal Omega, Franklin, SIFT, PolyPhen-2, Mutation Taster. Os bancos de dados HGMD, ARDB, Clinvar, foram utilizados para confirmar o ineditismo da alteração p.Ala567Asp. Pelo Clustal Omega observou-se que a região 567 da proteína AR é altamente conservada entre as diferentes espécies analisadas, e alterações nesta região são altamente patogênicas. No Franklin ela foi classificada como provavelmente patogênica. Pelo SIFT a alteração foi considerada deletéria; o PolyPhen-2 e o Mutation Taster revelaram que ela é provavelmente patogênica. A alteração p.Ala567Asp, nunca descrita na literatura, foi identificada em uma família com cinco pessoas afetadas pelo fenótipo completo da SIA (CAIS) e sete portadoras assintomáticas. As análises preditivas funcionam como importante ferramenta para o entendimento e correlação genótipo/fenótipo de alterações patogênicas não descritas na literatura e são realizadas de forma rápida e de baixo custo. Através deste estudo, podemos inferir que a alteração p.Ala567Asp é patogênica

e está relacionada com o fenótipo CAIS. A análise funcional da proteína AR alterada pode complementar este estudo e fornecer mais respostas sobre essa alteração.

**Palavras-chave:** SÍNDROME DE RESISTÊNCIA A ANDRÓGENOS; RECEPTORES ANDROGÊNICOS; BIOINFORMÁTICA; CROMOSSOMO X.

## ABSTRACT

The Androgen Insensitivity Syndrome (AIS) was first reported in 1953 by Morris; it is defined as a rare condition with X-linked recessive inheritance and is understood to be the most common cause of Disorders of Sex Development (DSD) in individuals with a 46,XY karyotype. Phenotypically, the characteristics of this syndrome vary from female-like phenotypes, with the presence of testes, breast development, and lack of hair growth, to male phenotypes, being infertile and/or with gynecomastia. AIS results from impairments in the binding of the hormones testosterone (T) and dihydrotestosterone (DHT) to the Androgen Receptor (AR), a protein that functions as a transcription factor, regulating the genes involved in physiological processes related to the development of male sexual characteristics. The AR gene is located in the Xq11-12 region. The AR protein has 3 domains: the amino-terminal domain (N-terminal), responsible for transcriptional regulation; the DNA-binding domain, responsible for nuclear localization and AR binding to DNA sequences in androgen-responsive elements; and the carboxy-terminal ligand-binding domain (C-terminal), responsible for T and DHT binding and transactivation. The impact of previously undescribed alterations in the AR protein can be investigated through **in silico** predictive analysis, a tool that aids in understanding the effect of mutations on the protein. Therefore, the objective of this work was to analyze the effect of the p.Ala567Asp alteration on the AR protein using bioinformatics tools. The programs and sites used were: HGMD, ARDB Clinvar, Clustal Omega, Franklin, SIFT, PolyPhen-2, and Mutation Taster. The HGMD, ARDB, and Clinvar databases were used to confirm the novelty of the p.Ala567Asp alteration. Clustal Omega showed that the 567 region of the AR protein is highly conserved among the analyzed species, and alterations in this region are highly pathogenic. Franklin classified it as probably pathogenic. SIFT considered the alteration deleterious; PolyPhen-2 and Mutation Taster revealed it to be probably pathogenic. The p.Ala567Asp alteration, never described in the literature, was identified in a family with five individuals affected by the complete AIS (CAIS) phenotype and seven asymptomatic carriers. Predictive analyses are an important tool for understanding and correlating the genotype/phenotype relationship of pathogenic alterations not described in the literature and are performed quickly and at low cost. Through this study, we can infer that the p.Ala567Asp alteration is pathogenic and is related to the CAIS phenotype. Functional analysis of the altered AR protein can complement this study and provide further insights into this alteration.

**Keywords:** ANDROGEN RESISTANCE SYNDROME; ANDROGEN RECEPTORS;  
BIOINFORMATICS; X CHROMOSOME.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Esquema representativo do desenvolvimento sexual masculino e feminino.....	15
Figura 2	– Esquema de interação do trabalho em conjunto de uma equipe multidisciplinar.....	17
Figura 3	– Classificação dos graus de virilização da genitália externa em indivíduos com SIA, proposta por Quigley et al., 1995.....	19
Figura 4	– Localização e organização do gene <i>AR</i> e estrutura proteica.....	22
Figura 5	– Estrutura das moléculas Alanina e Ácido Aspártico.....	22
Figura 6	– Heredograma familiar.....	27
Figura 7	– Alinhamento de múltiplas sequências realizado no Clustal Omega.....	33
Figura 8	– Classificação sugerida pelo Franklin.....	33
Figura 9	– Região de íntrons e exon no gene <i>AR</i> .....	37
Figura 10	– Resultado Mutation Taster.....	38
Figura 11	– Resultado Polyphen-2.....	38
Figura 12	– Resultado SIFT.....	38

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Gráfico visualizador das regiões aminoacídicas no gene <i>AR</i> .....	35
Gráfico 2	– Gráfico de predições.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Sequenciamento do gene <i>AR</i> da família estudada.....	28
Tabela 2	- Todas as trocas de Alanina (A) por Ácido Aspártico (D) na proteína AR e seus respectivos fenótipos.....	30
Tabela 3	- Todas as trocas aminoacídicas na proteína AR que resultem em Ácido Aspártico.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala	Aminoácido Alanina
AR	Receptor de Andrógenos
ARDB	<i>Androgen Receptor Gene Mutations Database</i>
Asp	Aminoácido Ácido aspártico
CAIS	forma completa da Síndrome da Insensibilidade Androgênica
DBD	Domínio de Ligação ao DNA
DDS	Distúrbio do Desenvolvimento do Sexo
DNA	ácido desoxirribonucleico
DHT	di-hidrotestosterona
FOXL2	<i>forkhead box L2</i>
GnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
HAC	hiperplasia adrenal congênita
HAM	hormônio anti-mülleriano
H	<i>hinge</i>
HGMD	<i>The Human Gene Mutation Database</i>
HUPAA	Hospital Universitário Professor Alberto Antunes
LBD	Domínio de Ligação Carboxi Terminal
MAIS	forma branda da Síndrome da Insensibilidade Androgênica
NLS	sinal de localização nuclear
NR5A1	<i>nuclear receptor subfamily 5 group A member 1</i>
NTD	Domínio Amino Terminal
PAIS	forma parcial Síndrome da Insensibilidade Androgênica
PDB	Protein Data Bank
<i>Polyphen-2</i>	<i>Polymorphism Phenotyping</i>
PTMs	modificações pós-traducionais
RNA	ácido ribonucleico
RSPO1	<i>R-spondin 1</i>
SIA	Síndrome da Insensibilidade Androgênica
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeo Único

<i>SOX9</i>	<i>SRY-related HMG-box 9</i>
<i>SRY</i>	<i>Sex-determining Region on the Y chromosome</i>
T	Testosterona
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
<i>WNT4</i>	<i>Wingless type MMTV integration site family, member 4</i>
21-OH	enzima 21-hidroxilase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	Desenvolvimento do Sexo em Humanos.....	14
1.2	Distúrbios do Desenvolvimento do Sexo.....	16
1.3	Insensibilidade Androgênica.....	18
1.4	O Gene e a Proteína do Receptor de Andrógenos.....	21
1.5	Bioinformática.....	23
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
2.1	Objetivo Geral .....	24
2.2	Objetivos específicos.....	24
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	25
3.1	Revisão de literatura.....	25
3.2	Análise de conservação.....	26
3.3	Análises preditivas.....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
4.1	Análise do gene <i>AR</i> dos participantes da pesquisa.....	28
4.2	Análise através do Clustal Omega.....	32
4.3	Análise através do Franklin.....	33
4.4	Análises realizadas através dos programas Mutation Taster, PolyPhen-2 e SIFT.....	37
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	39
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Desenvolvimento do Sexo em Humanos

O desenvolvimento do sexo em humanos, tem seu início seis semanas após a fertilização. Até este momento, o embrião humano apresenta primórdios gonadais e genitais indiferenciados e bipotentes nos dois sexos, impossibilitando diferenciação sexual, seja macro ou microscópica (Maciel-Guerra; Guerra-Júnior, 2019).

A determinação e a diferenciação sexual envolvem eventos com uma complexa rede hierárquica de genes reguladores e proteínas (Bashamboo et al., 2017). Entre esses processos, a determinação sexual se dá no estabelecimento do sexo cromossômico (46,XX ou 46,XY), enquanto a diferenciação é por meio do desenvolvimento de dutos genitais e da genitália externa (Maciel-Guerra; Guerra-Júnior, 2019).

O gene *SRY* (*Sex-determining Region on the Y chromosome*) está especificamente ligado a esses processos, uma vez que, quando expresso, ele é um determinante para o sexo masculino e, quando ausente é determinante para o sexo feminino (Mello et al., 2005; Poulat et al., 2018; Gomes et al., 2018).

Aliado ao *SRY*, no desenvolvimento do sexo masculino (figura 1), está o gene *SOX9* (*SRY-related HMG-box 9*), que é expresso nos testículos em desenvolvimento, e continua sendo expresso nas células de Sertoli, deixando de ser expresso no tecido ovariano (Domenice et al., 2002; Bashamboo et al., 2017; Maciel-Guerra; Guerra-Júnior, 2019).

Os ductos de Wolff surgem a partir da terceira semana de gestação, por meio da ação da testosterona secretada pelas células de Leydig, posteriormente se diferenciam em epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal (Domenice et al., 2002; Bashamboo et al., 2017; Maciel-Guerra; Guerra-Júnior, 2019).

A testosterona (T) secretada pelos testículos é convertida periféricamente em di-hidrotestosterona (DHT) pela ação da enzima  $5\alpha$ -redutase, nos tecidos periféricos como a pele e folículos pilosos. A DHT atua nos genitais externos indiferenciados, promovendo sua diferenciação em estruturas masculinas. Sob sua ação, o tubérculo genital se desenvolve na glândula do pênis, as pregas urogenitais formam o corpo do pênis, as pregas lábio-escrotais se transformam na bolsa escrotal e o seio urogenital origina a próstata. Essa ação da testosterona e da di-hidrotestosterona ocorre por meio do Receptor de Andrógenos (AR) (Domenice et al., 2002; Bashamboo et al., 2017; Maciel-Guerra; Guerra-Júnior, 2019).

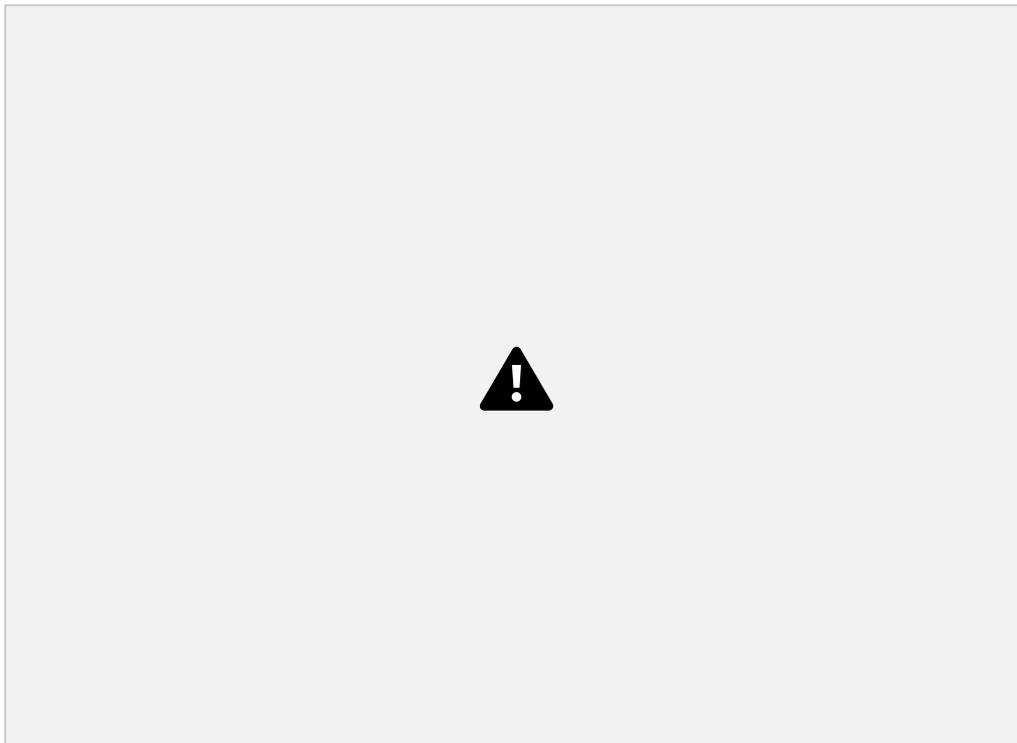
Os ductos de Müller surgem a partir da sexta semana de gestação e sofrem regressão

sob ação do hormônio anti-mülleriano (HAM) produzido pelas células de Sertoli. Essa maior expressão do HAM ocorre através da interação dos genes *SOX9* e *NR5A1* (*nuclear receptor subfamily 5 group A member 1*). O *NR5A1* é um importante regulador da função endócrina no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e no córtex adrenal, desempenhando um papel fundamental na determinação e diferenciação sexual (Domenice et al., 2002; Bashamboo et al., 2017; Maciel-Guerra; Guerra-Júnior, 2019).

Enquanto no desenvolvimento do sexo feminino, quando o *SRY* está ausente, há a expressão de alguns genes, como *WNT4* (do inglês, *wingless type MMTV integration site family, member 4*), *RSP01* (do inglês, *R-spondin 1*) e *FOXL2* (do inglês, *forkhead box L2*), que atuam no desenvolvimento ovariano, diferenciação dos ductos de Müller, supressão da diferenciação masculina, e na sustentação da diferenciação de estruturas reprodutivas internas e externas feminina (Bashamboo; McElreavey, 2015; Michelatto, 2016; Silva, 2023).

Falhas nesses processos biológicos podem ocasionar os distúrbios do desenvolvimento do sexo.

**Figura 1 - Esquema representativo do desenvolvimento sexual masculino e feminino.**



Legenda: O desenvolvimento sexual humano inicia-se a partir de uma gônada embrionária indiferenciada. No lado esquerdo da ilustração, é demonstrado o processo de diferenciação para indivíduos 46,XY, no qual genes como *SRY* e *SOX9* promovem a formação dos testículos. Estes, por sua vez, produzem testosterona e o hormônio antimülleriano, o que resulta no desenvolvimento de estruturas internas e genitália externa masculinas. Já no lado

direito, observa-se o processo de determinação e diferenciação sexual em indivíduos 46,XX. Nesses casos, genes como *WNT4*, *RSPO1* e *FOXL2* são responsáveis por ativar a formação dos ovários, conduzindo ao desenvolvimento de estruturas internas e genitália externa femininas. Fonte: Michelatto, 2016 *apud* Biason-Lauber; Chaboissier, 2015.

## 1.2 Distúrbios do Desenvolvimento do Sexo

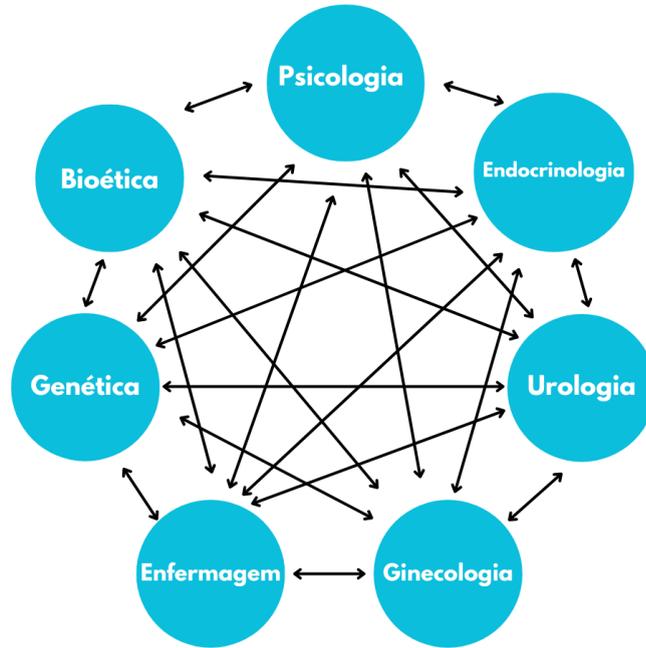
Como mencionado, eventos biológicos e genéticos são necessários para que a determinação e a diferenciação do sexo aconteçam de forma íntegra. E, quando falhas acontecem nesses processos, o indivíduo pode apresentar Distúrbios do Desenvolvimento do Sexo (DDS) (Maciel-Guerra; Guerra-Júnior, 2019).

Segundo o Consenso de 2006 (Lee et al., 2006), realizado em Chicago, os DDS são condições congênitas dentro das quais o desenvolvimento do sexo cromossômico, gonadal e/ou anatômico são atípicos, ou seja, incomuns. Neste Consenso, foi discutido a importância de uma terminologia mais adequada e menos pejorativa, sendo então acordado que a melhor terminologia para tal condição genética seria Distúrbios do Desenvolvimento do Sexo, excluindo os termos "hermafroditismo" e "pseudo-hermafroditismo".

Além disso, foi discutida a importância de médicos especializados, especialmente pediatras, bem como de uma equipe multidisciplinar (figura 2) composta por psicólogos, biólogos, cirurgiões, ginecologistas, entre outros - como as áreas citadas na figura 2 -, no atendimento de recém-nascidos afetados. Esses profissionais são fundamentais para a detecção e orientação precoce em casos onde há dificuldade em determinar o sexo da criança, o que pode ser indicativo de uma condição de DDS. Nesses casos, é essencial realizar uma investigação abrangente, discutir e analisar detalhadamente o quadro clínico, a fim de obter um diagnóstico preciso e iniciar os tratamentos adequados (Lee et al., 2006).

O trabalho em conjunto desses profissionais é essencial, uma vez que cada profissional possui melhor entendimento de sua área e sempre há a necessidade de troca de informações entre diferentes áreas para que o diagnóstico médico se torne mais eficaz (Lee et al., 2006).

**Figura 2 – Esquema de interação do trabalho em conjunto de uma equipe multidisciplinar em caso de DDS.**



**Legenda:** A interação entre diferentes áreas se torna importante para um melhor aconselhamento dos pacientes afetados, por DDS, e seus familiares. Fonte: Lee et al., 2016 e adaptado pela autora.

Diante disso, há uma variedade de características clínicas que precisam ser reconhecidas em um recém-nascido, para se obter um diagnóstico claro. As características variam desde a ambiguidade genital evidente até a discordância entre o fenótipo e o genótipo do recém-nascido. Já em adolescentes ou adultos, para se reconhecer um caso de DDS, observa-se as seguintes características: ambiguidade genital não reconhecida previamente, amenorreia primária, desenvolvimento mamário (ginecomastia) em homem, até mesmo a infertilidade (Lee et al., 2016; Maciel-Guerra; Guerra-Júnior, 2019).

Os DDS são classificados em três grupos: DDS associado a anomalias cromossômicas, DDS 46,XX e DDS 46,XY (Lee et al., 2016).

Dentre os grupos citados, os DDS 46,XY são os de maior complexidade no que se refere a elucidação etiológica. Apresentam amplo espectro clínico, podendo apresentar genitália externa de aparência típica masculina, micropênis, genitália externa ambígua, genitália externa de aparência típica feminina, resultante de uma masculinização intrauterina incompleta, com ou sem a presença de estruturas müllerianas. Na maioria desses pacientes, são identificadas gônadas masculinas, embora em alguns casos nenhum tecido gonadal seja

encontrado (Domenice et al., 2022). Nesses casos, é fundamental realizar um diagnóstico preciso para definição do sexo social, prever as funções endócrinas, avaliar as condições de fertilidade e o risco de desenvolvimento de tumores na vida adulta, além de contribuir para a melhoria da qualidade de vida do afetado (Gomes, 2019, p. 6).

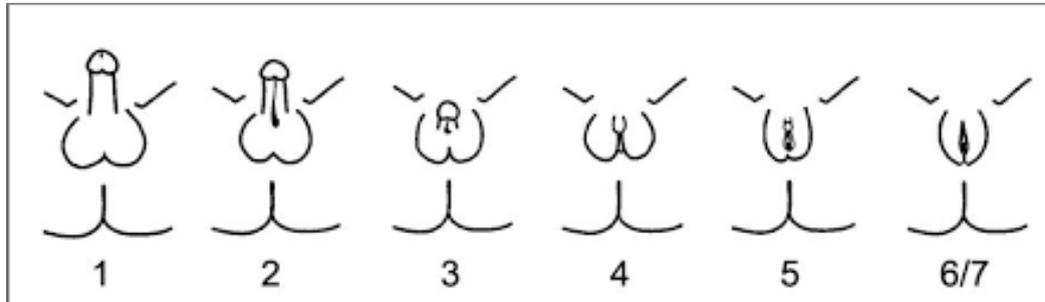
Dentre os DDS 46,XY se encontra a Síndrome da Insensibilidade Androgênica, a qual será abordada neste trabalho.

### 1.3 Síndrome de Insensibilidade Androgênica

Anteriormente chamada como “Síndrome de Feminilização Testicular”, a Síndrome da Insensibilidade Androgênica (SIA) foi descrita em 1953, por John Morris, quando ele observou que seus pacientes apresentavam características fenotipicamente femininas, enquanto eram geneticamente masculinos. A SIA afeta cerca de 2-5 a cada 100.000 indivíduos 46,XY (Hughes et al., 2012), sendo classificada como uma doença rara pela portaria nº 199 de janeiro de 2014 (Portaria nº 199, 2014). É uma condição com herança recessiva ligada ao cromossomo X, que afeta apenas indivíduos com cariótipo 46,XY e compreende-se como a causa mais comum de DDS 46,XY. Indivíduos 46,XX portadores dessa condição e portanto heterozigotos, apesar de não apresentarem quadro clínico, podem transmitir o alelo afetado para seus descendentes (Morris, 1953; Hiort et al., 2000; Petroli, 2010; Paoli et al., 2023).

Quigley et al., em 1995, propôs um modelo de classificação dos graus de virilização da genitália externa (figura 3) que se baseia na classificação de Prader, desenvolvida em 1954, para correlacionar o fenótipo e o genótipo de pacientes com hiperplasia adrenal congênita (HAC). O modelo de classificação proposto por Quigley avalia o grau de virilização apresentado pelos indivíduos afetados, variando desde o Quigley 1, que representa o grau mais virilizado, até o Quigley 7, que indica o grau menos virilizado (figura 3) (Quigley et al., 1995).

**Figura 3 - Classificação da genitália externa em indivíduos com SIA, proposta por Quigley et al., 1995.**



Legenda: Genitália externa em indivíduos com SIA, variando desde o Quigley 1 (grau mais virilizado) até o Quigley 7 (grau menos virilizado). Q1: genitália masculina; Q2 a Q5: genitália ambígua, sendo Q6 genitália feminina com pilificação; Q7: genitália feminina sem pilificação.

A classificação possui sete graus diferentes para avaliar o déficit de virilização em pacientes com SIA. Sendo estes graus:

1- **Quigley 1 (genitália masculina):** conhecida como a forma branda da SIA, este grau abrange indivíduos com resposta normal aos andrógenos durante a vida fetal e genitália externa masculina. Geralmente observado na forma branda da SIA, em homens inférteis e/ou em casos de ginecomastia.

2- **Quigley 2 (Genitália ambígua):** abrange indivíduos com fenótipo masculino, mas com uma virilização fetal ligeiramente deficiente, com manifestação de hipospádia, observada na forma PAIS da SIA.

3- **Quigley 3 (Genitália ambígua):** abrange indivíduos com característica predominantemente masculina, porém com virilização uterina comprometida. Apresenta hipospádia perineal e pênis pequeno com criptorquidia e/ou escroto bífido. Observada na forma PAIS da SIA.

4- **Quigley 4 (Genitália ambígua):** abrange indivíduos com virilização comprometida e apresentam um falo intermediário entre clitóris e pênis. Observada na forma PAIS da SIA.

5- **Quigley 5 (Genitália ambígua):** abrange indivíduos fenotipicamente aparentemente feminino, com mínima ação de andrógenos durante o desenvolvimento fetal, e que apresentam orifício uretral e vaginal, e clitoromegalia leve e/ou uma fusão labial posterior de grau reduzido. Observada na forma PAIS da SIA.

6- **Quigley 6** (Genitália feminina): abrange indivíduos fenotipicamente femininos sem ação de andrógenos durante o desenvolvimento fetal, podendo desenvolver pelos pubianos e/ou axilares. Observada na forma PAIS da SIA.

7- **Quigley 7** (Genitália feminina): abrange indivíduos fenotipicamente femininos sem desenvolvimento de pelos pubianos ou axilares. Observada na forma CAIS da SIA.

Antes da puberdade, é difícil distinguir entre os graus 6 e 7, sendo recomendado classificá-los como grau 6/7 até que a puberdade seja concluída.

Através desta classificação, a SIA pode apresentar três formas de expressão: a forma branda (MAIS), a forma parcial (PAIS) e a forma completa (CAIS).

A MAIS é a forma mais branda, pois os pacientes apresentam fenótipo masculino, e é classificada como Q1 (figura 3). Porém podem apresentar azoospermia (ausência de espermatozoides no líquido seminal), infertilidade e/ou ginecomastia (crescimento anormal das mamas) (Petroli et al., 2017; Batista et al., 2018; Paoli et al., 2023).

A PAIS, diferentemente da MAIS e CAIS, apresenta um grau variado de virilização, sendo classificada de Q2 a Q6 (figura 3). A genitália externa pode apresentar-se ambígua ou feminina, sendo incompletamente virilizada, onde pode-se observar falo hipertrofiado, seio urogenital com contorno vaginal cego, testículos palpáveis, ou não palpáveis, pregas lábio escrotais parcialmente fundidas ou escroto (Petroli et al., 2017; Batista et al., 2018; Fulare et al., 2020; Paoli et al., 2023).

A CAIS é a forma mais grave, classificada como Q7 (figura 3). É caracterizada por indivíduos 46,XY com genitália externa feminina, vagina de fundo cego podendo o comprimento ser variável, há ausência da genitália interna, pois durante a vida intrauterina o HAM foi expresso resultando na não formação da mesma. Apesar da vagina apresentar canal curto, é possível ter relações sexuais. Um importante sinal clínico é a amenorreia primária, sendo esse o principal motivo de consulta médica na puberdade (Petroli et al., 2017; Batista et al., 2018; Fulare et al., 2020; Paoli et al., 2023).

A SIA é causada por alterações deletérias no gene *AR*, afetando a resposta das células alvos para testosterona e di-hidrotestosterona (Calderon et al., 2019).

#### 1.4 O Gene e a Proteína do Receptor de Andrógenos

O Receptor de Andrógenos é um importante fator de transcrição nuclear que é ativado por ligação ao ligante (T ou DHT). Ele está localizado na região cromossômica Xq11-12 (figura 4), possui oito éxons que codificam a proteína AR, que possui três domínios funcionais distintos (figura 4), com 920 aminoácidos em sua totalidade (Quigley et al., 1995; Ghali et al., 2003; Tufan et al., 2005; Maciel-Guerra; Guerra-Júnior, 2019).

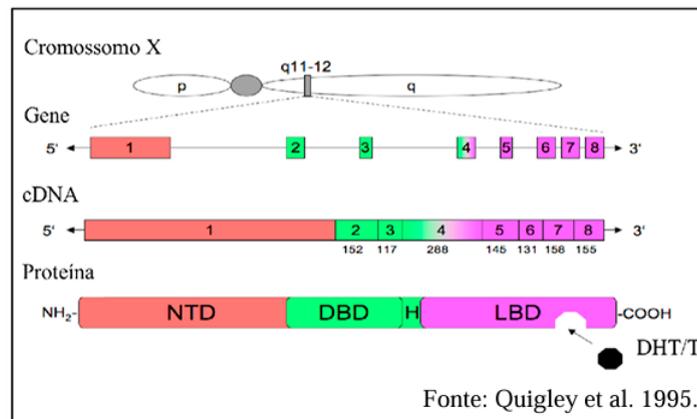
A proteína atua como um fator de transcrição ativado por hormônio esteroide. Quando se liga ao hormônio, o receptor se separa das proteínas acessórias, move-se para o núcleo, forma dímeros e, posteriormente, ativa a transcrição de genes que respondem ao andrógeno. O gene *AR* possui dois segmentos polimórficos de repetição de trinucleotídeos, que codificam tratos de poliglutamina e poliglicina no domínio de transativação N-terminal da proteína (Franklin by genoox; (Quigley et al., 1995; Ghali et al., 2003; Tufan et al., 2005; Maciel-Guerra; Guerra-Júnior, 2019).

A proteína AR possui três domínios (figura 4):

- o Domínio Amino Terminal (NTD), responsável pela regulação transcricional, está localizado no éxon 1 (aminoácidos 1-538);
- o Domínio de Ligação ao DNA (DBD), responsável pela localização nuclear e ligação do AR às sequências de DNA dos elementos andrógeno-responsivos, está localizado nos éxons 2 e 3 (aminoácidos 539-628), e;
- o Domínio de Ligação Carboxi Terminal (LBD), responsável pela ligação a T e DHT, está localizado nos éxons 4 a 8, abrangendo os aminoácidos 670-920 (Quigley et al., 1995; Ghali et al., 2003; Tufan et al., 2005; Maciel-Guerra; Guerra-Júnior, 2019).

Além disso, há uma região de dobradiça entre os domínios DBD e LBD, chamada de *hinge* (H), codificada pela porção 5' do éxon 4 (localizada entre os aminoácidos 629-669), sendo responsável pela translocação do complexo hormônio-receptor do citoplasma para o núcleo da célula, uma vez que possui o sinal de localização nuclear (NLS) (Quigley et al., 1995).

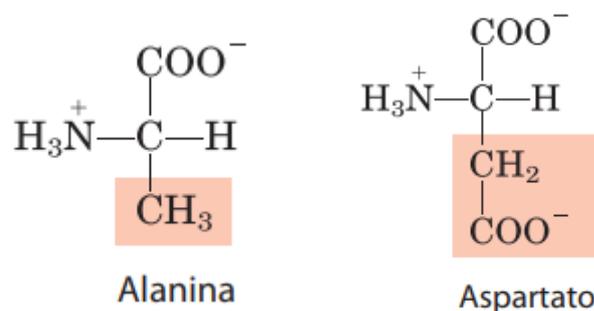
**Figura 4 - Localização da alteração e organização do gene *AR* e estrutura proteica.**



Legenda: Representação esquemática do gene do receptor androgênico (*AR*) localizado no cromossomo X, com suas respectivas regiões codificantes no DNA, cDNA e proteína. No cromossomo X, o gene *AR* está situado na região Xq11-12. Abaixo, observa-se o gene dividido em 8 exons, seguidos pela sequência de cDNA correspondente. Na sequência proteica, destacam-se os domínios funcionais: NTD (Domínio N-terminal), DBD (Domínio de Ligação ao DNA), H (Região Hinge), LBD (Domínio de Ligação ao Ligante), e o ponto de interação com DHT/T (Dihidrotestosterona/Testosterona), que ativa o receptor. Fonte: Quigley et al., 1995.

A alteração p.Ala567Asp, está localizada na proteína do gene *AR*, no DBD e no aminoácido 567. Essa alteração foi ocasionada pela substituição da Alanina pelo Ácido Aspártico (figura 4). A Alanina é uma molécula de estrutura simples, baixa reatividade e não polar, enquanto o Ácido aspártico é uma molécula de carga negativa e polar. Quando há essa substituição, ocorre uma desestabilidade na estrutura da proteína, podendo causar repulsão entre as outras partes da proteína, prejudicando o funcionamento da proteína e até mesmo alterando a sua forma (Betts; Russell, 2003).

**Figura 5 - Estrutura das moléculas de Alanina e Ácido Aspártico.**



**Legenda:** Estrutura bioquímica dos aminoácidos Alanina e Aspartato, destacando suas cadeias laterais em rosa. A Alanina é uma molécula simples, baixa reatividade e não polar, enquanto o Ácido aspártico é uma molécula de

carga negativa e polar. Fonte: Nelson, D. L., & Cox, M. M., 2017.

## 1.5 Bioinformática

Atualmente, a bioinformática tem sido uma grande aliada da Genética Humana. Através dela, é possível realizar análises computacionais de sequências de DNA, RNA e proteínas, de maneira direta e indireta (Neshich et al., 2003; Prosdocimi; Santos, 2004).

As ferramentas computacionais sempre estão sendo otimizadas para que os dados moleculares possam ser depositados nos bancos de dados, complementando, assim, as análises realizadas pela comunidade científica (Neshich et al., 2003; Prosdocimi; Santos, 2004).

Segundo o Protein Data Bank (PDB) (<https://www wwpdb.org/stats/deposition>), um importante banco de dados, até 18 de outubro de 2024, já foram depositados 244.898 dados de estruturas macromoleculares, desde o ano 2000. Isto demonstra, que constantemente novos dados são gerados contribuindo para as pesquisas.

Além disso, grande parte das ferramentas *in silico* geram resultados de forma rápida e de baixo custo, e são de livre acesso.

Desta forma, neste trabalho, foi possível utilizar a bioinformática como ferramenta para análises preditivas *in silico* e análises conservacionais de uma alteração genética inédita identificada em uma família com Síndrome da Insensibilidade Androgênica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o impacto funcional de uma alteração inédita na proteína do Receptor de Andrógeno encontrada em uma família com Insensibilidade Androgênica, através de ferramentas de bioinformática.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar análises preditivas para determinar o potencial patogênico da alteração p.Ala567Asp na proteína AR.
- Estabelecer a correlação genótipo-fenótipo da família estudada buscando estabelecer uma relação direta entre o potencial patogênico da alteração e as características clínicas observadas.

### 3 METODOLOGIA

Este é um trabalho descritivo de caso clínico de uma família com características clínicas de SIA, onde foram analisados dados clínicos e moleculares de 31 participantes, o qual teve aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), sob CAAE: 33432214.6.0000.5154.

As análises de bioinformática foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH), do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes, da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA/UFAL), e teve como colaboração a UFTM, que cedeu as informações clínicas e moleculares da família estudada.

O sequenciamento completo do gene *AR* (tabela 1) de todos os participantes da pesquisa foi realizado na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), através do método de Sanger.

#### 3.1 Revisão de literatura

A partir das informações disponibilizadas pelo grupo colaborador da UFTM, foi realizada a pesquisa em bancos de dados para verificar se a alteração p.Ala567Asp já havia sido descrita na literatura. Para isso foram utilizadas as seguintes bases: HGMD (<https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>); *CLINVAR* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>); ARDB (<https://www.androgendb.mcgill.ca/>). O PUBMED (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi utilizado como um complemento para as pesquisas. Além disso, esses bancos de dados foram consultados para um estudo aprofundado do códon alterado e das trocas que resultam no aminoácido final, a fim de realizar possíveis correlações com a alteração identificada.

O *The Human Gene Mutation Database* (HGMD) é um site criado como o objetivo de reunir todas as alterações genéticas conhecidas (publicadas) responsáveis por doenças hereditárias humanas.

O PUBMED é uma plataforma de busca de livre acesso, da *National Library of Medicine*, que abrange diversos estudos já publicados.

O CLINVAR é uma ferramenta utilizada para depósito e consulta de alterações genéticas relacionadas a distúrbios genéticos.

O Androgen Receptor Gene Mutations Database (ARDB) é um banco de dados que reúne alterações encontradas no Receptor de Andrógenos. Também foram utilizados os sites RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) e PhosphoSite (<https://www.phosphosite.org/homeAction.action>) para complementar esta revisão de literatura. O RCSB Protein Data Bank é um banco de dados de acesso livre, que possui moléculas biológicas (proteína, DNA, RNA), em estrutura 3D. Enquanto o PhosphoSite é um site que contribui no estudo de modificações pós-traducionais (PTMs) de proteínas.

### 3.2 Análise de conservação

Para as análises de conservação da proteína do Receptor de Andrógeno em diferentes espécies de vertebrados, foi utilizado o Clustal Omega, um programa de livre acesso que possui a função de alinhar múltiplas sequências de proteínas com a finalidade de apresentar o grau de conservação de determinada região (Sievers; Higgins, 2018).

### 3.3 Análises preditivas

O *Franklin by genoox* foi utilizado para classificação do potencial patogênico da alteração inédita p.Ala567Asp. Essa plataforma é a mais completa e reúne diversos algoritmos para classificação da alteração de acordo com os critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (do inglês, ACMG). As alterações podem ser classificadas em benigna, provavelmente benigna, alteração de significado incerto, provavelmente patogênica e patogênica (Richards et al., 2015).

Além disso foram utilizados os seguintes programas de bioinformática: *Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org/>); *PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping)* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>); *SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)* (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>), para complementar as análises preditivas da alteração aqui estudada, uma vez que estes programas revelam graus de patogenicidade de acordo com os scores estabelecidos neles.

O *Mutation Taster* é um programa com intuito de avaliar o potencial patogênico de alterações na sequência de DNA, prevendo substituições de aminoácidos, alterações intrônicas e sinônimas, alterações de inserção e/ou deleção curtas (*indel*) e alterações que abrangem regiões flanqueadora intron-exon. Ele inclui todos os Polimorfismos de

Nucleotídeo Único (SNPs) que se encontram disponíveis no Projeto 1000 Genomas (<https://www.internationalgenome.org/>) (Schwarz et al., 2014).

Segundo Adzhubei et al. (2013), a ferramenta PolyPhen-2 tem como função prever possíveis efeitos sobre substituições de aminoácidos diante a estabilidade e função de proteínas humanas, se utilizando de dados evolutivos estruturais e comparativos. Além disso, identifica SNPs relacionados a transcrição de genes, identifica dados de sequências de proteínas e traços estruturais e elabora perfis de conservação.

O programa SIFT possui algoritmos que analisam o potencial impacto de alterações, como a substituição de aminoácidos, sobre a função de proteínas (Sim et al., 2012).

Todos os programas e sites utilizados são de livre acesso e cada um conta com métodos computacionais específicos para avaliar diferentes funções e regiões de proteínas, contribuindo para o entendimento do efeito da alteração sobre a proteína alterada.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

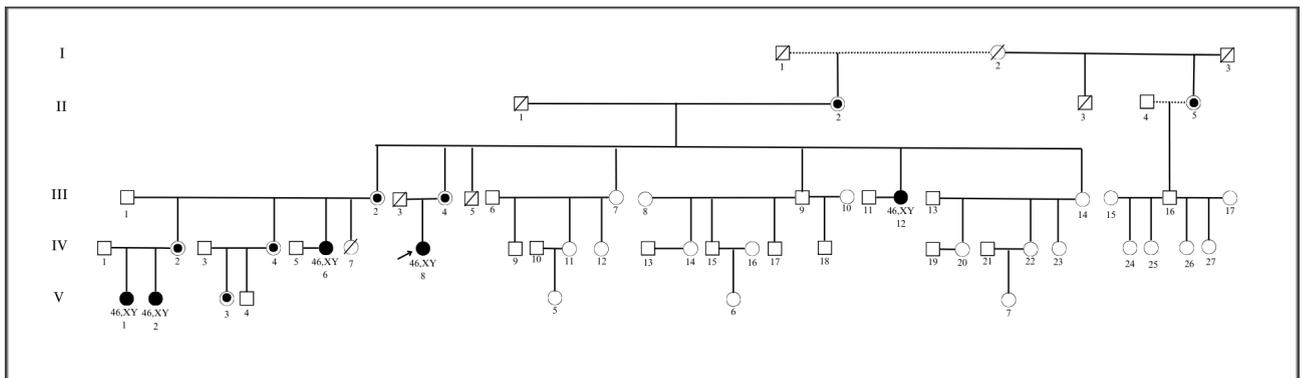
### 4.1 Análise do gene *AR* dos participantes da pesquisa

A família estudada possui 52 pessoas (figura 6), sendo que 31 participaram desta pesquisa e tiveram o gene *AR* sequenciado.

O sequenciamento (tabela 1) revelou 5 afetados pela alteração p.Ala567Asp (chrX-67643339 C>A; AR:c.1700C>A; NM\_000044.6) e 7 portadores assintomáticos (AR:c.1700C/A). Os afetados apresentam cariótipo 46,XY e os portadores 46,XX.

Os afetados apresentaram diagnóstico clínico com cariótipo 46,XY.

**Figura 6 - Heredograma familiar.**



**Legenda:** Heredograma da família estudada, composto por 52 indivíduos. Indivíduos III 12, IV 6, IV 8, V 1, V 2 são afetados pela SIA (5 afetados); e os indivíduos II 2, II 5, III 2, III 4, IV 2, IV 4, V 3 são portadores da SIA (7 portadores). Fonte: elaborado pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro e adaptado pela autora.

**Tabela 1 – Sequenciamento do gene *AR* da família estudada.**

Indivíduo	Cariótipo	Região: AR:c.1700
II 2	46,XX	C/A
II 5	46,XX	C/A
III 2	46,XX	C/A
III 4	46,XX	C/A
III 7	46,XX	C/C
III 12	46,XY	A
III 14	46,XX	C/C
III 16	46,XX	C/C
IV 2	46,XX	C/A
IV 4	46,XX	C/A

<b>IV 6</b>	46,XY	A
<b>IV 7</b>	46,XX	C/C
<b>IV 8</b>	46,XY	A
<b>IV 9</b>	46,XX	C/C
<b>IV 11</b>	46,XX	C/C
<b>IV 14</b>	46,XX	C/C
<b>IV 15</b>	46,XX	C/C
<b>IV 17</b>	46,XX	C/C
<b>IV 18</b>	46,XX	C/C
<b>IV 23</b>	46,XX	C/C
<b>IV 26</b>	46,XX	C/C
<b>IV 27</b>	46,XX	C/C
<b>V 1</b>	46,XY	A
<b>V 2</b>	46,XY	A
<b>V 3</b>	46,XX	C/A
<b>V 4</b>	46,XX	C/C
<b>V 20</b>	46,XX	C/C

**Legenda:** C/A – portadoras assintomáticas; A - afetadas com fenótipo completo da SIA; C/C – normal.

Fonte: elaborado pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro e adaptado pela autora.

A alteração p.Ala567Asp não foi identificada nas bases HGMD, CLINVAR e ARDB, em buscas realizadas até 14/10/2024, caracterizando-a como uma alteração inédita.

Quanto às análises do aminoácido 567 da proteína AR, nenhuma troca aminoacídica foi verificada relacionada a insensibilidade androgênica. No entanto foi identificada em uma pesquisa realizada em 14/10/2024, no HGMD, uma troca de Alanina por Treonina (p.Ala567Thr), relacionado ao fenótipo de hiperplasia adrenal congênita (HAC), no gene *AR* (a descrição desta alteração pode ser encontrada no artigo “*A novel androgen receptor gene mutation in a patient with congenital adrenal hyperplasia associated with penoscrotal hypospadias*”. DOI: [10.1016/j.trsl.2014.03.013](https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.03.013)).

A HAC, diferentemente da SIA, é um distúrbio raro advinda de doenças autossômicas recessivas, resultantes de alterações em genes que codificam enzimas envolvidas na esteroidogênese adrenal. Falhas em qualquer uma das enzimas presentes na cascata de síntese dos hormônios esteróides, podem resultar na HAC, e em 95% dos casos, é devido a deficiência da enzima 21-hidroxilase (21-OHD). Apesar de a SIA e a HAC não possuírem

características clínicas em comum, vale ressaltar essa heterogeneidade encontrada na região do aminoácido 567 (Nunes Neto et al., 2023).

Através desta análise acerca da região aminoácido 567, verificou-se que não há alterações patogênicas descritas no aminoácido 567 da proteína AR relacionadas a SIA.

Paralelamente, foram analisadas todas as trocas envolvendo o aminoácido 567 da proteína AR, todas as trocas de Alanina (A) por Ácido Aspártico (D) na proteína AR descritas na literatura e seus respectivos fenótipos, assim como todas as trocas aminoacídicas na proteína AR que resultam em Ácido Aspártico, com a finalidade de comparar a quantidade de alterações encontradas, e a heterogeneidade de fenótipos, dentre os três domínios funcionais do gene *AR*, nestas condições de trocas aminocídicas.

No HGMD e CLINVAR os resultados das pesquisas envolvendo as trocas de Alanina (A) por Ácido Aspártico (D), revelaram quatro alterações; e no ARDB foram registradas sete alterações (tabela 2).

Nas análises das trocas aminoacídicas que resultam em Ácido Aspártico, observou-se o seguinte: pelo HGMD foram encontradas onze alterações; no CLINVAR foram identificadas dezessete alterações; e pelo ARDB foram observadas dez alterações (tabela 3).

Todas as alterações envolvendo a troca de Alanina por Ácido aspártico e todas as trocas aminoacídicas que resultaram em Ácido Aspártico, identificadas nos bancos pesquisados, estão relacionadas aos diferentes fenótipos de SIA (tabelas 2 e 3).

**Tabela 2 – Trocas de Alanina (A) por Ácido Aspártico (D) na proteína AR e seus respectivos fenótipos.**

Programa utilizado	Alteração (posição na proteína)	Posição no cDNA	Domínio na proteína AR	Fenótipo	Análise preditiva utilizando Franklin
HGMD	p.Ala574Asp	c.1721C>A	DBD	PAIS	Provavelmente patogênico
HGMD	p.Ala587Asp	c.1760C>A	DBD	*	Provavelmente patogênico
HGMD	p.Ala646Asp	c.1937C>A	H	NORMAL	Benigno
HGMD	p.Ala749Asp	c.2246C>A	LBD	CAIS e PAIS	Provavelmente patogênico
CLINVAR	p.Ala270Asp	c.809C>A	NTD	*	VUS
CLINVAR	p.Ala429Asp	c.1286C>A	NTD	*	Provavelmente patogênico
CLINVAR	p.Ala646Asp	c.1937C>A	H	PAIS	Benigno
CLINVAR	p.Ala766Asp	c.2297C>A	LBD	*	Patogênico
ARDB	p.Ala574Asp	c.1721C>A	DBD	CAIS	Provavelmente patogênico

ARDB	p.Ala587Asp	c.1760C>A	DBD	CAIS	Provavelmente patogênico
ARDB	p.Ala646Asp	c.1937C>A	LBD	PAIS	Benigno
ARDB	p.Ala646Asp	c.1937C>A	LBD	NORMAL	Benigno
ARDB	p.Ala646Asp	c.1937C>A	LBD	CAIS	Benigno
ARDB	p.Ala646Asp	c.1937C>A	LBD	MAIS	Benigno
ARDB	p.Ala749Asp	c.2246C>A	LBD	PAIS	Provavelmente patogênico

**Legenda:** (\*) alteração descrita sem associação direta com o fenótipo de SIA. DBD = Domínio Central de Ligação ao DNA; LBD = Domínio de Ligação Carboxi Terminal; VUS = significado incerto; H = *hinge*. Fonte: HGMD, Clinvar, ARDB e Franklin.

**Tabela 3 - Trocas aminoacídicas na proteína AR que resultem em Ácido Aspártico.**

Programa utilizado	Alteração (posição na proteína)	Posição no cDNA	Domínio na proteína AR	Fenótipo	Análise preditiva utilizando Franklin
HGMD	p.Gly507Asp	c.1520G>A	NTD	*	VUS
HGMD	p.Glu682Asp	c.2046G>C	LBD	CAIS	Provavelmente patogênico
HGMD	p.Glu682Asp	c.2046G>T	LBD	CAIS	Provavelmente patogênico
HGMD	p.Gly725Asp	c.2174G>A	LBD	CAIS	Provavelmente patogênico
HGMD	p.Tyr740Asp	c.2218T>G	LBD	CAIS	Provavelmente patogênico
HGMD	p.Gly751Asp	c.2252G>A	LBD	CAIS e PAIS	Provavelmente patogênico
HGMD	p.Tyr782Asp	c.2344T>G	LBD	CAIS e PAIS	Patogênico
HGMD	p.Glu794Asp	c.2382G>C	LBD	*	VUS
HGMD	p.Glu794Asp	c.2382G>T	LBD	*	VUS
HGMD	p.Glu898Asp	c.2694G>C	LBD	*	Provavelmente patogênico
HGMD	p.Glu898Asp	c.2694G>T	LBD	*	Provavelmente patogênico
CLINVAR	p.Tyr572Asp	c.1714T>G	DBD	CAIS	Provavelmente patogênico
CLINVAR	p.Val582Asp	c.1745T>A	DBD	CAIS	Provavelmente patogênico
CLINVAR	p.Glu679Asp	c.2037A>C	LBD	*	Provavelmente patogênico
CLINVAR	p.Glu679Asp	c.2037A>T	LBD	*	Provavelmente patogênico
CLINVAR	p.Glu707Asp	c.2121A>C	LBD	*	VUS
CLINVAR	p.Glu707Asp	c.2121A>T	LBD	*	VUS
CLINVAR	p.Tyr782Asp	c.2344T>G	LBD	*	Patogênico
ARDB	p.Gly507Asp	c.1520G>A	NTD	MAIS	VUS

ARDB	p.Glu682Asp	c.2046G>C	LBD	CAIS	Provavelmente patogênico
ARDB	p.Glu682Asp	c.2046G>T	LBD	CAIS	Provavelmente patogênico
ARDB	p.Ala688Asp	c.2063C>A	LBD	PAIS	Provavelmente patogênico
ARDB	p.Gly725Asp	c.2174G>A	LBD	CAIS	Provavelmente patogênico
ARDB	p.Tyr740Asp	c.2218T>G	LBD	CAIS	Provavelmente patogênico
ARDB	p.Gly751Asp	c.2252G>A	LBD	CAIS	Provavelmente patogênico
ARDB	p.Tyr782Asp	c.2344T>G	LBD	CAIS	Patogênico
ARDB	p.Glu794Asp	c.2382G>T	LBD	MAIS	VUS

**Legenda:** (\*) alteração descrita sem associação direta com o fenótipo de SIA. DBD = Domínio de Ligação ao DNA; LBD = Domínio de Ligação Carboxi Terminal; NTD = Domínio Amino Terminal; VUS = significado incerto. Fonte: HGMD, Clinvar, ARDB e Franklin.

Na tabela 2, a porcentagem de alterações associadas a MAIS foi de 6,6%, para PAIS foi de 33,3%, para CAIS foi de 26,6%, típico foi de 13,3%, e para sem associação direta com a SIA foi de 20,2%. Enquanto na tabela 3, a maior porcentagem encontrada foi para o fenótipo de CAIS, apresentando 51,85%. Os fenótipos de MAIS e PAIS demonstraram 7,4% e 11%, respectivamente, e 29,75% para sem associação direta com a SIA.

Apesar da tabela 2, o fenótipo de PAIS ter demonstrado maior porcentagem, pôde-se observar que a maioria dos fenótipos encontrados estão relacionados a CAIS, e isso demonstra que estas regiões dos aminoácidos podem ser extremamente conservadas e alterações nestas regiões serão prejudiciais e potencialmente deletérias.

#### 4.2 Análise através do Clustal Omega

No Clustal, realizou-se o alinhamento de múltiplas sequências para analisar a região do aminoácido 567 e determinar se esta é uma região conservada. Utilizando o site da National Library of Medicine (<https://www.nlm.nih.gov/>), foram coletadas as sequências aminoacídicas de sete vertebrados, incluindo a humana. Após o alinhamento, observou-se que a região 567 da proteína AR é altamente conservada entre as diferentes espécies analisadas - *Anas zonorhyncha* (pato de bico amarelo asiático), *Astyanax mexicanus* (peixe-cego das cavernas), *Canis lupus familiaris* (cão doméstico), *Homo sapiens* (humanos), *Lithobates catesbeianus* (sapo-touro americano), *Pan troglodytes* (chimpanzé comum) e *Pelodiscus sinensis* (tartaruga-de-casco-mole-chinesa) - (Figura 7), sugerindo que alterações nessa região podem ser extremamente prejudiciais e potencialmente deletérias. Além disso, a região DBD, a qual se encontra a alteração p.Ala567Asp, é altamente conservada, uma vez que apresenta

aproximadamente 80% da identidade dos aminoácidos (Thompson; Higgins; Gibson, 1994; Quigley et al., 1995).

**Figura 7 – Alinhamento de múltiplas sequências realizado no Clustal Omega.**

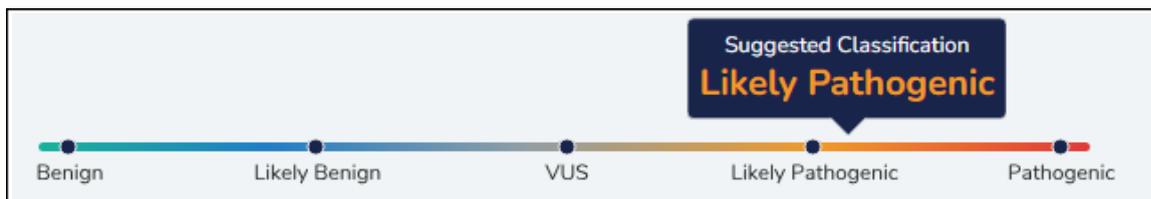
ESPÉCIE	AMINOÁCIDOS																				
<i>Homo sapiens</i>	Q	K	T	C	L	I	C	G	D	E	A	S	G	C	H	Y	G	-	A	L	T
<i>Anas zonorhyncha</i>	Q	K	T	C	L	I	C	G	D	E	A	S	G	C	H	Y	G	-	A	L	T
<i>Astyanax mexicanus</i>	Q	R	T	C	L	I	C	S	D	E	A	S	G	C	H	Y	G	-	A	L	T
<i>Canis lupus familiaris</i>	Q	K	T	C	L	I	C	G	D	E	A	S	G	C	H	Y	G	-	A	L	T
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Q	K	P	C	L	S	C	E	D	E	A	S	G	C	H	Y	E	-	A	L	T
<i>Pan troglodytes</i>	Q	K	T	C	L	I	C	G	D	E	A	S	G	C	H	Y	G	-	A	L	T
<i>Pelodiscus sinensis</i>	Q	K	T	C	L	I	C	G	D	E	A	S	G	C	H	Y	G	-	A	L	T
							*	*				*									:

**Legenda:** Os aminoácidos (A = alanina) em vermelho compreendem a região do aminoácido 567. (\*) região totalmente conservada; (:) região com conservação de propriedades químicas. Fonte: Clustal Omega.

#### 4.3 Análise através do Franklin

Com a utilização da plataforma Franklin *by genoox*, foi possível coletar diversos dados acerca da alteração p.Ala567Asp na proteína AR, esta que foi classificada como provavelmente patogênica (figura 8), com score de 0.991.

**Figura 8 – Classificação sugerida pelo Franklin.**



**Legenda:** Benign = benigno; Likely benign = provavelmente benigno; VUS = significado incerto; Likely pathogenic = provavelmente patogênico; Pathogenic = patogênico. Imagem retirada do Franklin (Acesso em 16/10/2024: <https://franklin.genoox.com/clinical-db/variant/snp/chrX-67643339-C-A-hg38>).

Além da classificação do Franklin ser baseada no ACMG, há um score que varia de 0 a 1, sendo 0 considerado alteração benigna e 1 alteração patogênica, conforme classificação abaixo:

- Benigno: 0-0.15
- Patogênico com suporte: 0.7-0.8
- Moderadamente Patogênico: 0.8-0.9
- Fortemente Patogênico: 0.9-1.0

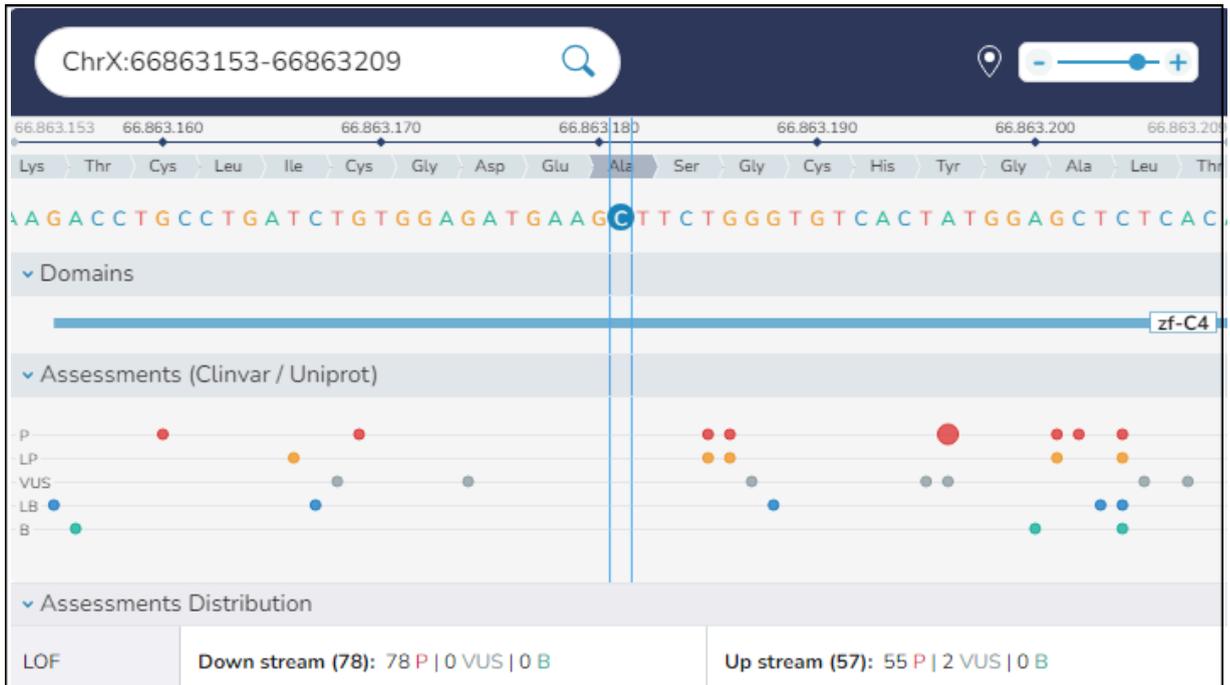
Segundo o Franklin, há cerca de 17.951 artigos publicados sobre o gene *AR*, destes, 195 artigos publicados no domínio de ligação ao DNA, da proteína AR. Além disso, foi possível observar que no éxon 2, existem 21 alterações patogênicas ou provavelmente patogênicas. O que sustenta essas informações é o fato de que nesta região, a incidência de alterações missense benignas é baixa, geralmente as alterações nesta região tendem a ser patogênicas ou provavelmente patogênicas. Observou-se ainda que, há três vezes mais alterações patogênicas do que alterações benignas missense neste gene. Desta forma, esta região alterada demonstra ser frequentemente associada a efeitos patogênicos.

O Franklin apresentou, através do contexto do GnomAD (*Genome Aggregation Database*), um score de maior do que 3.09, e segundo a classificação Z-score - que é usado para avaliar o quão raras ou comuns são as alterações em um gene específico - quando um gene apresenta um Z-score maior do que 3.09, as alterações missense são consideradas raras, sugerindo sua importância funcional em um organismo.

Não foram encontrados dados populacionais no Franklin referente a alteração p.Ala567Asp, pois trata-se de uma alteração inédita.

No Gráfico 1, pode-se observar que há alterações descritas antes e depois da região 567, contudo, não há nenhuma alteração descrita na região em questão. Este gráfico reforça as análises realizadas através do HGMD, CLINVAR e ARDB de que não há alterações descritas na região do aminoácido 567 até o dia 14 de outubro de 2024, data em que esta análise foi realizada.

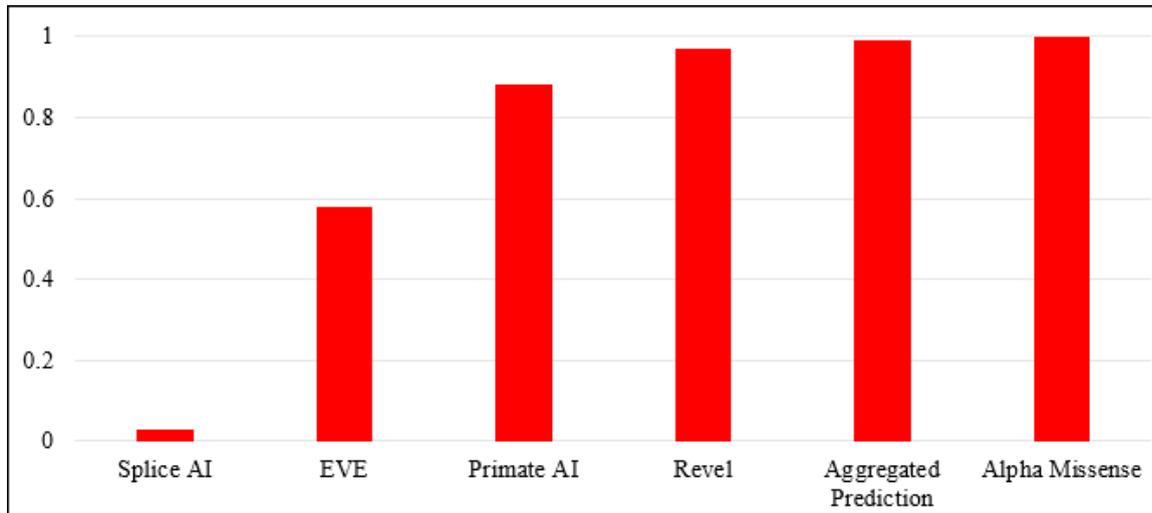
**Gráfico 1 – Gráfico visualizador das regiões aminoacídicas no gene *AR*.**



**Legenda:** A região da proteína, especificamente no domínio de ligação ao DNA, é destacada no círculo azul, onde a posição 567 do aminoácido é visível, indicando que ainda não foram descritas alterações nessa área. Após a posição do aminoácido 567 (Down stream), foram descritas 78 alterações patogênicas (P). Anteriormente a região do aminoácido 567 (Up stream), foram descritas 55 alterações patogênicas e 2 de significado incerto (VUS). Fonte: Franklin. (Acesso em 14/10/2024: <https://franklin.genoox.com/clinical-db/variant/snp/chrX-66863181-C-A?app=assessment-tools>).

Através do gráfico de predições (gráfico 2), foi possível comparar o score de alguns sites ou programas que contém informações acerca da alteração estudada, variando desde uma classificação benigna até deletéria (patogênica). Os programas utilizados pelo Franklin foram: Splice AI, Primate AI, EVE, AlphaMissense, Revel e Aggregated Prediction.

O Splice AI prevê os efeitos das alterações genéticas nos processos de *splicing* de RNA. O Primate AI prevê o impacto de alterações genéticas nos genes, analisando as alterações de DNA para determinar se elas têm o potencial de causar doenças. O EVE identifica quais alterações têm maior probabilidade de afetar a função da proteína. O Alpha Missense analisa a posição da alteração dentro da estrutura da proteína e sua provável função para determinar seu impacto. O Revel e o Aggregated Prediction combinam outras ferramentas preditivas, como SIFT, PolyPhen-2, Mutation Assessor, para avaliar o impacto das alterações missense.

**Gráfico 2 – Gráfico de previsões.**

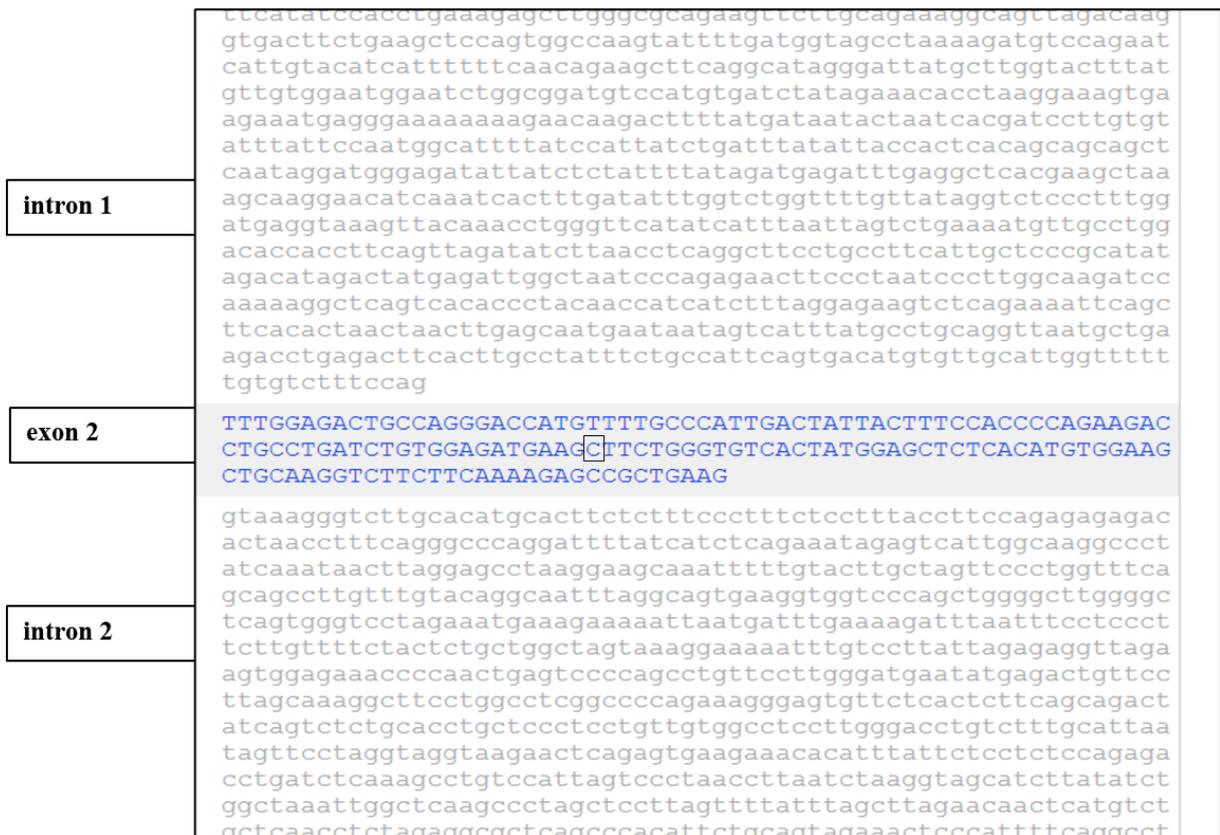
Fonte: Elaborado pela autora baseado no Franklin.

Em um score de 0 a 1, sendo classificado em fortemente benigno e fortemente patogênico, respectivamente, observou-se que:

- Splice AI demonstrou um score de 0.03, considerando a alteração como benigna;
- EVE demonstrou um score de 0.58, considerando a alteração como deletéria baixa (patogênica);
- Primate AI demonstrou um score de 0.88, considerando a alteração como patogênica moderada;
- Revel demonstrou um score de 0.97, considerando a alteração como fortemente patogênica (deletéria);
- Aggregated Prediction demonstrou um score de 0.99, considerando a alteração como patogênica (deletéria);
- Alpha Missense demonstrou um score de 1, considerando a alteração como fortemente patogênica (deletéria).

Como a alteração não está localizada em uma região de *splicing*, o score do Splice AI a classificou como benigna (figura 9).

**Figura 9 - Região de introns e exon no gene AR.**



Legenda: Parte da sequência do gene *AR* evidenciando a localização do nucleotídeo alterado. Fonte: Elaborado pela autora.

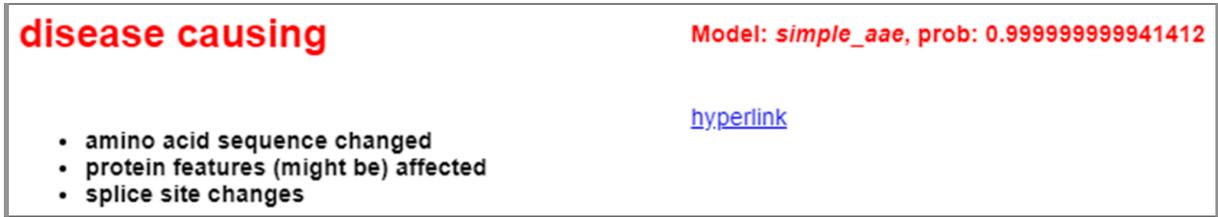
Com as análises do Franklin, foi possível inferir que esta é uma alteração provavelmente patogênica, pois pelo menos três dos seis programas analisados por ele demonstraram um score acima de 0.9. Além disso, é rara, uma vez que apresenta um Z-score maior do que 3.09 de acordo com o GnomAD.

#### 4.4 Análises realizadas através dos programas Mutation Taster, PolyPhen-2 e SIFT.

Utilizando os programas Mutation Taster, PolyPhen-2 e SIFT, foi possível analisar a alteração p.Ala567Asp com maior precisão. Cada um desses programas fornece uma avaliação quantitativa sobre a probabilidade de uma alteração ser patogênica. O Mutation Taster e PolyPhen-2 apresentam scores que variam de 0 a 1, onde valores mais próximos de 1 indicam maior probabilidade de patogenicidade. No SIFT, alterações com score <0,05 são consideradas deletérias. Os resultados obtidos com esses programas convergiram para a

conclusão de que a alteração p.Ala567Asp possui um alto potencial de ser patogênica.

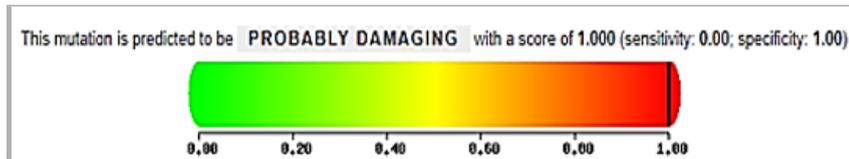
**Figura 10 – Resultado Mutation Taster.**



**Legenda:** Essa alteração modifica a proteína. A sequência aminoacídica e o sítio de *splicing* são alterados.

Fonte: Mutation Taster.

**Figura 11 – Resultado Polyphen-2.**



**Legenda:** Essa alteração é considerada provavelmente patogênica com um score de 1. Fonte: Polyphen-2.

**Figura 12 – Resultado SIFT.**

pos	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
551D	0.06	0.00	0.00	1.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.03	0.01	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00
552Y	0.06	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01	0.01	0.00	0.00	1.00
553Y	0.12	0.01	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	1.00
554F	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.01	0.03	0.05	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01	0.00	0.01
555P	0.17	0.00	0.00	0.04	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.03	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
556P	0.29	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
557Q	0.44	0.01	0.00	0.04	0.04	0.00	0.02	0.01	0.00	0.05	0.00	0.00	0.01	0.03	1.00	0.03	0.04	0.03	0.00	0.00
558K	0.60	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.02	0.00	1.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.03	0.11	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00
559T	0.62	0.12	0.03	0.04	0.05	0.14	0.06	0.09	0.20	0.05	0.26	0.05	0.06	0.26	0.07	0.06	0.08	1.00	0.11	0.03
560C	0.98	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
561L	0.98	0.23	0.00	0.01	0.01	0.06	0.02	0.02	0.01	0.04	1.00	0.01	0.01	0.03	0.01	0.06	0.04	0.01	0.11	0.00
562I	0.98	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.00	0.62
563C	0.98	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
564G	0.98	0.00	0.00	0.01	0.13	0.00	1.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.04	0.01	0.11	0.00	0.00
565D	0.98	0.00	0.00	1.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
566E	0.98	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.23	0.01	0.00	0.03	0.02	0.01	0.15	0.02	0.02	0.02	0.00
567A	0.98	1.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00	0.02	0.00
568S	0.98	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	1.00	0.09	0.01	0.00
569G	0.98	0.01	0.03	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
570C	0.98	0.05	1.00	0.02	0.03	0.13	0.03	0.05	0.04	0.18	0.10	0.02	0.03	0.02	0.06	0.05	0.04	0.04	0.05	0.02
571H	0.98	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
572Y	0.98	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
573G	0.98	0.00	0.00	0.01	0.11	0.00	1.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.03	0.01	0.00	0.00
574A	0.98	1.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.43	0.00
575L	0.98	0.03	0.00	0.00	0.01	0.04	0.00	0.04	0.06	0.00	1.00	0.03	0.01	0.01	0.00	0.05	0.07	0.01	0.05	0.11

**Legenda:** Amarelo = região alterada e seu respectivo aminoácido Alanina (A); Azul = aminoácido que houve a troca; Verde = score de probabilidade. Fonte: SIFT.

Diante do que foi apresentado, estudos futuros mais aprofundados poderão fornecer mais respostas acerca da alteração, uma vez que esta é inédita e ainda não há estudos tão abrangentes.

## 5 CONCLUSÃO

No presente estudo, as análises preditivas *in silico* da alteração p.Ala567Asp através do uso destes programas, foram essenciais para complementar a elucidação dos diagnósticos na família estudada fornecendo mais respostas sobre essa alteração, que ainda não foi descrita na literatura.

Com isso, as análises aqui realizadas nos permitem inferir que esta alteração inédita está associada com o fenótipo completo da SIA, uma vez que a alteração foi encontrada em cinco pacientes com CAIS e 7 portadores 46,XX sem fenótipo associado, sendo considerada potencialmente patogênica pelos programas utilizados.

Contudo, análises funcionais *in vitro* podem complementar os resultados deste estudo.

## REFERÊNCIAS

- ADZHUBEI, Ivan et al. Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Current Protocols in Human Genetics*, [S. l.], p. 1-52, jan. 2013.
- ADZHUBEI, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, [S. l.], 2010.
- ARBOLEDA, V. A.; SANDBERG, D. E.; VILAIN, E. DSDs: Genetics, underlying pathologies and psychosexual differentiation. *Nature Reviews*, 2014.
- BATISTA, Rafael Loch et al. Androgen insensitivity syndrome: a review. *Arch Endocrinol Metab*, [S. l.], p. 1-9, 18 jan. 2018.
- BASHAMBOO, A.; MCELREAVEY, K. Human sex-determination and disorders of sex-development (DSD). In: Seminars in cell & developmental biology. *Academic Press*, 2015.
- BASHAMBOO, A.; EOZENOU, C.; ROJO, S. 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.
- BETTS, M. J.; RUSSELL, R. B. Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. In: BARNES, M. R.; GRAY, I. C. (Eds.). *Bioinformatics for Geneticists*. John Wiley & Sons, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras. **Portaria GM nº 199, de 30 de janeiro de 2014**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saes/doencas-raras/legislacao>.
- CALDERON, M. G. et al. Complete Androgen Insensitivity Syndrome and Literature Review. *Journal of Human Growth and Development*, v. 29, n. 2, p. 187-191, 2019.
- CHOI, Y.; CHAN, A. P. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*, v. 31, n. 16, p. 2745-2747, 2015.
- DELLI PAOLI, E. et al. Androgen insensitivity syndrome: a review. *Journal of Endocrinological Investigation*, [S. l.], p. 2237–2245, 10 jun. 2023.
- DOMENICE, S.; COSTA, E. M. F.; CORRÊA, R. V.; MENDONÇA, B. B. Aspectos moleculares da determinação e diferenciação sexual. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 46, n. 4, p. 433-443, 2002.
- DOMENICE, S.; BATISTA, R. L.; ARNHOLD, I. J. P.; SIRCILI, M. H.; COSTA, E. M. F.; MENDONÇA, B. B. 46,XY Differences of Sexual Development. 2022, 21 ago. In: FEINGOLD, K. R. et al. (Eds.). *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000.

FRAZER, J. et al. Disease variant prediction with deep generative models of evolutionary data. *Nature*, 2021.

FULARE, S.; DESHMUKH, S.; GUPTA, J. Androgen Insensitivity Syndrome: A rare genetic disorder. *International Journal of Surgery Case Reports*, v. 71, p. 371-373, 2020.

GHALI, Shereen A. et al. The Use of Androgen Receptor Amino/Carboxyl-Terminal Interaction Assays to Investigate Androgen Receptor Gene Mutations in Subjects with Varying Degrees of Androgen Insensitivity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, [S. l.], p. 2185–2193, 1 maio 2003.

GOMES, N. et al. Long-term outcomes and molecular analysis of a large cohort of patients with 46,XY disorder of sex development due to partial gonadal dysgenesis. *Clinical Endocrinology*, v. 89, p. 164-177, 2018.

GOMES, Nathália Lisboa Rosa Almeida. Novas perspectivas no diagnóstico etiológico dos distúrbios do desenvolvimento sexual 46, XY. 2019. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

GOTTLIEB, B. et al. *The Androgen Receptor Gene Mutations Database (ARDB)*: 2012.

HIORT, O. et al. Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 85, p. 2810-2815, 2000.

HUGHES, I. A.; DAVIES, J. D. H.; BRUCE, J.; WILLIAMS, D. M.; MCDONALD, G. J. Androgen insensitivity syndrome. *Lancet*, v. 380, n. 9851, p. 1419-1428, 2012.

IOANNIDIS, N. M. et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *American Journal of Human Genetics*, 2016.

JAGANATHAN, K. et al. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell*, 2019.

KIRCHER, M. et al. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature Genetics*, 2014.

LEE, P. A. et al. Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. *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.

MACIEL-GUERRA, A. T.; GUERRA-JUNIOR, G. Menino ou menina? Distúrbios da diferenciação do sexo. 3. ed. Curitiba: **Appris**, 2019.

MELLO, M. P. de; ASSUMPCÃO, J. de G.; HACKEL, C. Genes envolvidos na determinação e diferenciação do sexo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 1, p. 14-25, 2005.

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

MORRIS, J. M. The syndrome of testicular feminization in male pseudohermaphrodites. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 65, n. 6, p. 1192-1211, 1953.

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). **Lehninger principles of biochemistry (7th ed.)**. W.H. Freeman.

NESICH, G. et al. STING Millennium: a web-based suite of programs for comprehensive and simultaneous analysis of protein structure and sequence. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3386-3392, 2003.

NUNES NETO, S. T.; BHERING, C. A.; OURIQUES, N. da S. Hiperplasia adrenal congênita. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 23, n. 4, e 12771, 2023.

OCAL, G. et al. The clinical and genetic heterogeneity of mixed gonadal dysgenesis: does "disorders of sexual development (DSD)" classification based on new Chicago consensus cover all sex chromosome DSD?. **European Journal of Pediatrics**, v. 171, p. 1497-1502, 2012.

PAOLI, E. Delli et al. Androgen insensitivity syndrome: a review. **Journal of Endocrinological Investigation**, [S. l.], p. 2237–2245, 10 jun. 2023.

PETROLI, R. J. et al. Functional Impact of Novel Androgen Receptor Mutations on the Clinical Manifestation of Androgen Insensitivity Syndrome. **Sexual Development**, v. 11, n. 5-6, p. 238-247, 2017.

PETROLI, Reginaldo José. Análise molecular do gene do receptor de andrógenos em pacientes 46, XY com ambiguidade genital e produção normal de testosterona. 2010. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP.

POULAT, F.; CHABOISSIER, M.-C. Sex Determination and Differentiation in Mammals. **Molecular Reproduction and Development**, v. 85, n. 10, p. 721-728, 2018.

PROSDOCIMI, Francisco; SANTOS, Fabrício R. Sobre bioinformática, genoma e ciência. **Ciência Hoje**, v. 35, n. 209, p. 54-57, 2004.

QUIGLEY, Charmian A. et al. Androgen Receptor Defects: Historical, Clinical, and Molecular Perspectives. **Endocrine Reviews**, [S. l.], p. 271-321, jul. 1995.

RENTZSCH, P. et al. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Research*, 2019.

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*, [S. 1.], p. 405–424, 5 mar. 2015.

SANDERS, S. J. et al. Whole genome sequencing in psychiatric disorders: the WGSPD consortium. *Nature Neuroscience*, 2017.

SAVAGE, M. et al. Androgen Insensitivity Syndrome and New Understandings of the Androgen Receptor. *Journal of the Endocrine Society*, v. 4, n. 6, 2020.

SHARMA, V.; THANGARAJ, K.; JYOTHY, A. A novel androgen receptor gene mutation in a patient with congenital adrenal hyperplasia associated with penoscrotal hypospadias. *Translational Research*, v. 164, n. 2, p. 149-152, ago. 2014.

SILVA, Carlos Virgílio Rocha de Sousa. Distúrbios da diferenciação do sexo 46,XY: rastreamento de alterações patogênicas em uma série de casos. 2024. 71 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas)** – Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2023.

TORRES, H.; LAHNO, K. R. Abordagem pediátrica dos distúrbios da diferenciação sexual. *Revista Brasileira de Educação Médica*, v. 37, n. 2, p. 245-248, jun. 2013.

VILLANUEVA, C.; RAFFAELLA, N.; DAVID, A. The disorders of sex development: an overview. *Revista de Urologia Pediátrica*, v. 15, n. 2, p. 79-85, 2014.

Wolf U. Identical mutations and phenotypic variation. *Hum Genet*. 1997 Sep;100(3-4):305-21.