



ANÁLISE DE MICRODELEÇÕES EM 9p E VARICAÇÕES NO GENE *DMRT1* EM PACIENTES 46,XY COM DISGENESIA GONADAL



Débora de Paula Michelato (Bolsista-Edital MCT/CNPq nº 01/2007), Fernanda Borchers Coeli, Juliana G. Assumpção, Tammy Mazzeo Castro, Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel-Guerra e Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello (Orientadora), Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CBMEG, UNICAMP

Palavras Chaves: Cromossomo 9; Disgenesia Gonadal e *DMRT1*

Agências financiadoras: CNPq e FAPESP

INTRODUÇÃO

A determinação do sexo em mamíferos ocorre no momento da fertilização através da herança de um cromossomo X ou Y paterno. O papel do cromossomo Y como determinante da masculinidade já era conhecido desde o final dos anos 50, quando teve início o estudo do cariótipo humano. O estudo molecular de indivíduos com sexo reverso permitiu que se chegasse ao gene denominado *SRY* (*sex-determining region on Hve Y chromosome*). Nos últimos anos, vários outros genes têm sido descritos como essenciais para a determinação testicular e desenvolvimento sexual masculino. Um desses genes é o gene autossômico, localizado no braço curto do cromossomo 9, *DMRT1* (*Doublesex and mab-3 related transcription factor 1*), já que deleções em 9p causam disgenesia gonadal. Este gene possui cinco éxons e é previsto que codifique uma proteína de 373 aminoácidos com um domínio DM próximo à sua porção N-terminal. Existem 4 mutações conhecidas, mas o fenótipo associado a elas não é certo. Existem também 21 SNPs, quatro no intron 2 e dezesseite no intron 4.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Neste estudo a haploinsuficiência no cromossomo 9p foi investigada usando os seguintes microssatélites: D9S1779, D9S1858, D9S143, D9S54, D9S1813. Foram incluídos 33 pacientes com *SRY* normal e 7 indivíduos 46,XY de uma família com disgenesia gonadal (um completa e dois parciais), o pai e três irmãos normais, todos portadores da mutação R30I no gene *SRY*. Homozigose de 5 ou 4 loci foi observada em um e dois pacientes, respectivamente. Os 3 indivíduos afetados da família apresentam genótipos idênticos para a região 9p, que foi diferente para os indivíduos normais.

Grupo 1 – Pacientes com Disgenesia Gonadal Completa sem mutação no gene <i>SRY</i>										
Família 3	Cariótipo	Descrição	Mutação <i>SRY</i>	D9S1779	D9S1858	D9S143	D9S54	D9S1813		
S1 P	46,XY	Normal - pai	nt	1/2	1/2	1/2	nt	1/1		
S1 M	46,XX	Normal - mãe	SRY -	3/3	2/3	3/3	nt	2/3		
S1	46,XY	CGD + gonadoblastoma	+	1/3	2/3	1/3	nt	1/3		
S1S	46,XX	Normal - irmã	SRY -	2/3	1/2	2/3	nt	1/2		
família 4										
S2 P	46,XY	Normal - pai	nt	1/2	1/2	1/2	nt	1/2		
S2 M	46,XX	Normal - mãe	SRY -	1/2	3/3	1/3	nt	1/3		
S2	46,XY	CGD + gonadoblastoma	-	1/2	1/3	1/1	nt	2/3		

DGC- disgenesia gonadal completa; - = sem mutação; SRY - = sem *SRY*; nt = não-testada.

Grupo 3 – Hermafroditas Verdadeiros 46,XY sem mutação no gene <i>SRY</i>										
Caso	Cariótipo	Descrição	Mutação <i>SRY</i>	D9S1779	D9S1858	D9S143	D9S54	D9S1813		
27	46,XY	HV	+	++	+	+	+	++		
29	46,XY	HV	-	++	++	+	++	++		
30	46,XY	HV	-	++	+	++	++	++		
família 5										
28P	46,XY	Normal - pai	nt	1/2	+	nt	nt	1/2		
28M	46,XX	Normal - mãe	SRY -	2/3	+	nt	nt	2/3		
28	46,XY	HV	-	2/2	+	+	+	2/2		
família 6										
31	46,XY	HV	-	+	2'	+	+	+		
31M	46,XX	Normal - mãe	SRY -	nt	1/2	1/2	nt	nt		

HV - hermafrodita verdadeiro; - = sem mutação; SRY - = sem *SRY*; nt = não-testada; ++ = heterozigoto; + = homo ou heterozigoto; * = heterozigose a ser confirmada pelo estudo do pai.

Grupo 4 – Pacientes com Disgenesia Gonadal Completa com mutação em *R30I* indicados para o estudo

Família 1	Cariótipo	Descrição	Mutação <i>SRY</i>	D9S1779	D9S1858	D9S143	D9S54	D9S1813	
1P	46,XY	Normal - pai	R30I	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	
2 M	46,XX	Normal - mãe	-	1/1	1/3	2/2	2/2	2/3	
3	46,XY	DGC	R30I	1/1	2/3	++	1/2	++	
4	46,XY	DGI	R30I	1/1	2/3	1/2	1/2	1/3	
5	46,XY	DGI	R30I	1/1	2/3	1/2	1/2	1/3	
6 B	46,XY	Normal - irmão	R30I	1/1	1/2	1/2	1/2	1/2	
7 B	46,XY	Normal - irmão	R30I	1/1	1/2	1/2	1/2	1/2	
8 B	46,XY	Normal - irmão	R30I	1/1	1/3	1/2	1/2	1/3	
Family 2									
11	46,XY	CGD + gonadoblastoma	Del 3 pb Sp1	1/2	++	++	+	++	
11 P	46,XY	Hipospádia - pai	Del 3 pb Sp1	1/2	nt	nt	nt	nt	

DGC- disgenesia gonadal completa; DGI- disgenesia gonadal incompleta - = sem mutação; SRY - = sem *SRY*; nt = não-testada; ++ = heterozigoto; + = homo ou heterozigoto; * = heterozigose a ser confirmada pelo estudo da mãe.

Não se verificou microdeleções de 9p em nenhum paciente quer seja do grupo 1, 2, 3 ou 4 através do estudo de microssatélites.



Grupo 2 – Pacientes com Disgenesia Gonadal Incompleta sem mutação no gene <i>SRY</i>										
Caso	Cariótipo	Descrição	Mutação <i>SRY</i>	D9S1779	D9S1858	D9S143	D9S54	D9S1813		
S4	46,XY	DGI	-	+	++	+	nt	++		
S5	46,XY	DGI	-	+	++	+	nt	++		
12	46,XY	DGI	-	++	++	+	+	++		
14	46,XY	DGI	-	++	++	++	++	++		
25	46,XY	DGI	-	+	++	++	nt	++		
32	46,XY	DGI	-	+	++	+	+	++		
15	46,XY	DGI	-	+	++	+	+	++		
16	46,XY	DGI	-	+	++	+	+	++		
17	46,XY	DGI	-	+	++	++	++	++		
18	46,XY	DGI	-	++	++	+	++	++		
19	46,XY	DGI	-	++	++	++	++	++		
20	46,XY	DGI	-	++	++	++	+	+		
21	46,XY	DGI	-	+	++	++	++	++		
22	46,XY	DGI	-	++	+	+	+	++		
23	46,XY	DGI	-	++	++	++	++	++		
24	46,XY	DGI	-	+	++	+	+	++		
26	46,XY	DGI	-	++	++	++	+	++		
família 7										
9	46,XY	DGI	-	+	2'	+	nt	nt	++	
9M	46,XX	Normal - Mãe	SRY -	nt	1/2	nt	nt	nt	nt	

DGI- disgenesia gonadal incompleta - = sem mutação; SRY - = sem *SRY*; nt = não-testada; ++ = heterozigoto; + = homo ou heterozigoto; * = heterozigose a ser confirmada pelo estudo do pai.

ESTIMATIVA DO GRAU DE HETEROZIGOSE EM CADA GRUPO DE PACIENTES				
Marcador	% H*	Grupo 1 %	Grupo 2 %	
D9S1779	63	85.7	45.5	
D9S1858	58	85.7	88.9	
D9S143	54	71.4	33.4	
D9S1813	83	85.7	85.5	
D9S54	?	?	38.5	
T>A (S45T)	14A/86T	12A/86T	22A/78T	

ESTIMATIVA DO GRAU DE HETEROZIGOSE EM CADA GRUPO DE PACIENTES				
Marcador	% H*	Grupo 3 %	Grupo 4 %	
D9S1779	63	71.4	20	
D9S1858	58	25	100	
D9S143	54	20	77.8	
D9S1813	83	71.2	88.8	
D9S54	?	40	66.6	
T>A (S45T)	14A/86T	25A/75T	34A/66T	

a = % de heterozigose estimada para o locus

Análise do gene *DMRT1*:

A troca nucleotídica g.133T>A no gene *DMRT1* foi observada em 24 indivíduos homozigotos T/T e em 9 heterozigotos T/A (fig. 1). Esta mutação p.S45T mutation é considerada um SNP (rs3739583).

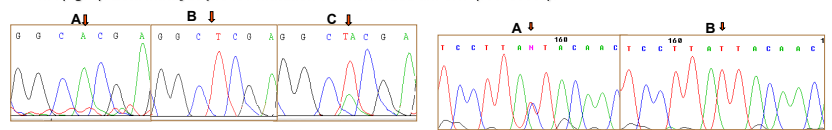


Figura 1: A) Homozigoto A/A (paciente 15), B) Homozigoto T/T (paciente 09), e C) Heterozigoto A/T (paciente 11).

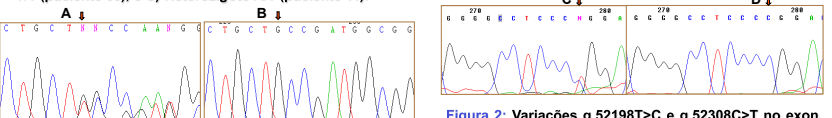


Figura 3: A) Inserção 3'UTR g.126313insT encontrada em heterozigose, B) Sequência 3' UTR normal.

Herpin *et al.*, (2009) identificou um motivo conservado de ligação a proteína localizada na região 3'UTR. Esta sequência de 11 pb participa da estabilização gônada-específica de mRNA durante o desenvolvimento.

Neste estudo foi identificada uma inserção dentro da região altamente conservada do sítio de 11 pb humano CUGCUGCCGAU. A mutação muda esta sequência para CUGCUUGCCGAU e pode causar o fenótipo por modificar o sítio conservado, e talvez evite a ligação da proteína, consequentemente desestabilizando o mRNA. Iremos investigar efetivamente a ação desta mutação em futuros projetos.