

Síndrome de Insensibilidade aos Andrógenos: Análise Clínica, Hormonal e Molecular de 33 Casos

artigo original

RESUMO

A síndrome de insensibilidade aos andrógenos (AIS) é uma doença com herança ligada ao cromossomo X que afeta pacientes com cariótipo 46,XY, nos quais há prejuízo total (forma completa, CAIS) ou parcial (PAIS) do processo de virilização intra-útero devido à alteração funcional do receptor de andrógenos (AR). Apresentamos uma revisão da AIS e do AR com os dados clínicos, hormonais e moleculares de 33 casos. Analisamos a região codificadora do gene do AR em 33 pacientes de 21 famílias, com quadro clínico e hormonal sugestivo de AIS. Onze pacientes (9 famílias) com diagnóstico de CAIS e 22 pacientes (12 famílias) com diagnóstico de PAIS. Identificamos mutações no gene do receptor androgênico e a etiologia da síndrome de insensibilidade aos andrógenos em 86% das 21 famílias estudadas: 100% das famílias com insensibilidade completa aos andrógenos e 75% das famílias com insensibilidade parcial aos andrógenos. Identificamos 9 mutações no AR descritas anteriormente na literatura (N705S, W741C, M742V, R752X, Y763C, R779W, M807V, R855C e R855H) e 7 mutações foram descritas pela primeira vez nesta casuística (S119X, T602P, L768V, R840S, I898F, P904R e IVS3 - 60 G>A). (**Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/1:87-97**)

Descritores: Insensibilidade aos andrógenos; Intersexo; Mutações; Pseudo-hermafroditismo masculino; Receptor androgênico

ABSTRACT

Androgen Insensitivity Syndrome: Clinical, Hormonal And Molecular Analysis Of 33 Cases.

Androgen insensitivity syndrome (AIS) is a rare X-linked recessive condition in which patients with 46,XY karyotype have a complete (CAIS) or partial (PAIS) impairment of pre- and postnatal virilization due to mutations in the androgen receptor (AR). We present a concise revision of AIS and the AR and report the clinical, hormonal and molecular study of 33 subjects with AIS. The coding region of the AR was analyzed in 33 subjects with clinical and hormonal characteristics that suggested AIS. Eleven patients (9 families) had CAIS and 22 patients (12 families) had PAIS. Mutations in the AR were identified and the molecular diagnosis of AIS established in 100% of families with CAIS and 75% with PAIS. Nine mutations had been previously described (N705S, W741C, M742V, R752X, Y763C, R779W, M807V, R855C e R855H) and 7 mutations were first described in these cohort of patients (S119X, T602P, L768V, R840S, I898F, P904R e IVS3 - 60 G>A). (**Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/1:87-97**)

Keywords: Androgen insensitivity; Androgen receptor; Male pseudohermafroditism; Mutations; Sexual differentiation

*Karla F.S. Melo
Berenice B. Mendonça
Ana Elisa C. Billerbeck
Elaine M.F. Costa
Ana C. Latronico
Ivo J.P. Arnhold*

*Unidade de Endocrinologia do
Desenvolvimento e Laboratório de
Hormônios e Genética Molecular -
LIM-42 (KFSM, BBM, AECB,
EMFC, ACL & IJPA); Equipe
Médica de Diabetes (KFSM),
Disciplina de Endocrinologia do
Hospital das Clínicas da
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo
(FMUSP), São Paulo, SP.*

*Recebido em 04/11/04
Aceito em 17/11/04*

ADIFERENCIAÇÃO SEXUAL MASCULINA normal depende da progressão de estágios distintos do desenvolvimento: 1) estabelecimento do sexo cromossômico masculino no momento da fertilização (46,XY); 2) ativação de uma cascata de genes indutores da diferenciação da gônada primitiva em testículo; 3) diferenciação da genitália interna e externa, mediada por hormônios ou fatores testiculares (1,2).

A síndrome de insensibilidade aos andrógenos (AIS) é uma doença com herança ligada ao cromossomo X que afeta pacientes com cariótipo 46,XY, nos quais há prejuízo total ou parcial do processo de virilização intra-útero devido à alteração funcional do receptor de andrógenos (AR) (3).

Diferenciação Sexual Masculina Normal

A determinação e diferenciação sexual dependem de uma cascata de eventos que se inicia com o estabelecimento do sexo cromossômico durante a fertilização e culmina com a maturação sexual na puberdade e subsequente fertilidade. Até a 6ª semana de gestação, independente do sexo cromossômico, os embriões apresentam gônadas primordiais bipotenciais, genitália externa indiferenciada e dois conjuntos de dutos genitais internos: os dutos de Wolff e os dutos de Müller (1,4). A diferenciação da gônada embrionária indiferenciada em testículo inicia-se na 6ª ou 7ª semana de gestação e é dirigida pelo fator determinante testicular, o gene SRY (região determinante do sexo no cromossomo Y), localizado no braço curto do cromossomo Y, em consenso com outros fatores codificados por genes localizados nos autossomos ou no cromossomo X (1).

A testosterona é secretada pelas células de Leydig fetais, estimulada pela gonadotrofina coriônica humana (hCG), e agindo localmente induz a diferenciação dos dutos de Wolff em epidídimo, duto deferente e vesículas seminais entre a 9ª e 13ª semanas de gestação. A regressão dos dutos de Müller é induzida pela ação local do hormônio anti-Mülleriano (AMH), secretado pelas células de Sertoli (1,4).

A genitália externa de ambos os sexos desenvolve-se a partir do tubérculo genital, eminências lábio-escrotais e pregas uretrais. A diferenciação masculina da genitália externa em pênis, bolsa escrotal e uretra peniana ocorre entre a 9ª e 13ª semanas de gestação e requer adequada concentração de testosterona e conversão desta para um outro andrógeno mais potente, a dihidrotestosterona (DHT), através da ação da 5 α -redutase em tecidos-alvo (1,4).

Na ausência de concentrações de testosterona e DHT suficientes ocorre falha na masculinização da genitália externa, com desenvolvimento do fenótipo

feminino (clitóris, grandes lábios, pequenos lábios e porção inferior da vagina) ou graus variáveis de ambigüidade genital (1,4).

As ações da testosterona e DHT requerem a presença de receptores androgênicos funcionais, os quais, após a ligação com estes hormônios, ativam a transcrição de genes específicos em tecidos-alvo. Assim, qualquer anormalidade na produção ou ação dos andrógenos em um feto 46,XY entre a 9ª e a 13ª semanas de gestação causará masculinização incompleta, resultando em pseudo-hermafroditismo masculino (1,4).

A testosterona é o principal andrógeno circulante no sexo masculino e o testículo é a sua principal fonte de produção. A adrenal produz uma pequena quantidade de testosterona, diretamente ou após a conversão periférica dos hormônios androstenediona e dehidroepiandrosterona, após a ação de enzimas esteroidais (5).

A testosterona e a dihidrotestosterona estão presentes no sangue em concentrações 10 a 100 vezes acima do nível necessário para a saturação do receptor androgênico. Entretanto, aproximadamente 95% destes andrógenos circula ligado a proteínas, tais como albumina ou globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) que limitam a sua biodisponibilidade. Algumas células responsivas aos andrógenos possuem receptores de membrana para SHBG. A ligação do complexo esteróide/SHBG a estas células inicia eventos que aumentam o AMPc intra-celular (5).

A fração livre dos andrógenos atravessa a membrana celular das células-alvo por difusão e liga-se com alta afinidade ao AR intracelular, uma proteína que possui sítios de ligação específicos para os andrógenos. A ligação do andrógeno ao AR induz: 1) dissociação de proteínas inibitórias associadas ao receptor, como a *heat-shock protein 90* (HSP90), ativando o complexo; 2) transporte intra-nuclear do complexo andrógeno/receptor; 3) dimerização do receptor; 4) ligação com elementos de resposta hormonal (HRE) e 5) associação com vários co-fatores transcricionais, resultando no estímulo da transcrição de genes ligados aos elementos de resposta. A ligação do andrógeno ao AR resulta em mudanças conformacionais no receptor e alteração da proteína que permitirá sua interação com outras proteínas celulares e início dos seus efeitos biológicos (5,6).

Estudo Molecular do Gene do Receptor Androgênico

O DNA complementar (DNAC) que codifica o AR humano foi clonado em 1988 pelos grupos de Lubahn e cols. (7); Chang e cols. (8) e Trapman e cols. (9).

Lubahn e cols (7) demonstraram que o gene do AR está localizado no braço longo do cromossomo X, entre os fragmentos Xq11-13. Brown e cols. (10) localizaram mais precisamente o gene do AR entre os fragmentos Xq11-12 e, pela primeira vez, mostraram que a AIS é causada por mutações no gene do AR (figura 1).

O AR faz parte de uma família de fatores de transcrição nuclear que inclui os receptores de estrogênio, do hormônio tireoidiano, da vitamina D, do ácido retinóico, de glicocorticóide, de mineralocorticóide, da progesterona e outros receptores órfãos, para os quais os agonistas estão sendo identificados (4).

Os receptores dos andrógenos, dos glicocorticóides, dos mineralocorticóides e da progesterona fazem parte de uma sub-família dos fatores de transcrição nuclear, que estão agrupados não apenas pela seqüência homóloga, mas também pela capacidade destes receptores de ativarem a transcrição de genes-alvo através do mesmo elemento de resposta hormonal (HRE) (4).

Da mesma forma que os outros receptores desta família, o AR, após a formação do complexo hormônio-receptor, interage diretamente com os genes-alvo para regular a transcrição dos mesmos. A falha do receptor em ativar estes genes resulta em resistência hormonal (6).

O AR possui os seguintes domínios funcionais: domínio de regulação transcricional (amino-terminal), domínio de ligação ao DNA que contém dedos de zinco (*zinc fingers*), a região *hinge* e o domínio de ligação ao esteróide (carboxi-terminal) (4) (figura 1).

O gene do AR possui 75 a 90 kilobases (kb) e contém 8 exons separados por introns cujos tamanhos variam de 0,7 a mais de 26kb (figura 1) (4). O DNAC do receptor androgênico apresenta aproximadamente 2760pb. O exon 1 codifica o extenso domínio ativador da transcrição ou aminoterminal, que é constituído por 555 aminoácidos e possui extensão correspondente a mais da metade da proteína do AR. Uma característica deste domínio do AR humano é a presença de repetições de glutaminas (11-31 resíduos) e glicinas (16-27 resíduos) (2). A exata importância destas repetições ainda não está completamente elucidada, mas repetições similares são encontradas em vários fatores de transcrição. A expansão da repetição de poliglutaminas para 40-65 resíduos está associada à atrofia muscular espinhal/bulbar (Doença de Kennedy). Esta expansão parece não afetar a afinidade de ligação aos andrógenos, mas pode causar diminuição na atividade transcricional do receptor, talvez como resultado da redução nos níveis do RNA mensageiro (RNAm) e da proteína do AR, identificada em pacientes com este tipo de expansão (5). Foi proposto que a atividade transcricional do AR é inver-

samente proporcional à extensão de repetição de glutaminas. Estudos epidemiológicos demonstraram que indivíduos com menor extensão da repetição de glutaminas possuem um risco maior de desenvolvimento de câncer de próstata e geralmente apresentam doença mais avançada ao diagnóstico (11). Não há relatos sobre o número de poliglutaminas (repetições CAG) na população brasileira.

Os exons 2 e 3 codificam o domínio de ligação ao DNA, que consiste de aproximadamente 70 aminoácidos. A seqüência de aminoácidos deste domínio é similar (identidade 56 – 79%) entre os diferentes receptores de esteróides. O domínio de ligação ao DNA contém dois íons zinco, cada um ligado ao enxofre de 4 cisteínas, produzindo uma estrutura de hélice-alça-hélice que interage com seqüências específicas de DNA, denominadas elementos de resposta hormonal (HRE). O primeiro e o segundo dedos de zinco são codificados pelo exon 2 e 3, respectivamente. O domínio de ligação ao DNA determina a especificidade da interação do AR com o DNA. Três aminoácidos na base do primeiro dedo de zinco são conservados entre os receptores de andrógenos, glicocorticóides, mineralocorticóides e progesterona e ligam-se às seqüências de nucleotídeos amplificadoras da transcrição, os elementos de resposta hormonal (HRE), localizadas em regiões próximas ou na seqüência de genes-alvo. O segundo dedo de zinco possui aminoácidos que estabilizam a ligação do DNA ao receptor, participam na dimerização do AR, e juntamente com a região *hinge*, no transporte do citoplasma para o núcleo celular (5).

A região 5' do exon 4 codifica a região *hinge*, que contém um sinal de localização nuclear necessário para a translocação do complexo andrógeno/receptor do citoplasma para o seu sítio de ação nuclear (2,4).

A porção 3' do exon 4 e os exons 5, 6, 7 e 8 codificam o domínio de ligação aos andrógenos, que contém cerca de 290 aminoácidos e representa 30% da proteína do AR. A seqüência de aminoácidos do domínio de ligação aos andrógenos é idêntica entre o AR humano e o do rato, e a semelhança entre as seqüências de outros receptores de esteróides varia entre 15% e 54%. Além de ser responsável pela ligação aos andrógenos, este domínio também participa da ativação transcricional, da dimerização do receptor e interage com proteínas inibitórias (HSP) (5).

O RNAm do AR foi identificado pela técnica de *Northern Blot* em inúmeros tecidos humanos, incluindo testículo, próstata, fibroblastos de tecido genital, fígado e linhagens celulares de câncer de próstata e de mama (4).

Síndrome de Insensibilidade Aos Andrógenos

Histórico da síndrome de insensibilidade completa e parcial aos andrógenos

Há vários relatos de casos isolados de indivíduos com provável diagnóstico da síndrome de insensibilidade aos andrógenos (AIS). O primeiro relato está no Talmud e é da época de 400dC, como referido por Goodman (1979) *apud* Quigley e cols. (4). No século 19 foram descritos numerosos relatos de indivíduos com provável AIS. Em 1937, Pettersson e Bonier *apud* Quigley e cols. (4) publicaram uma análise detalhada dos aspectos clínicos e genéticos de famílias afetadas. Em 1953, Morris *apud* Quigley e cols. (4) publicou a análise de 82 casos, denominando-os de “testículos feminizantes”. Neste relato foram estabelecidos os principais sinais clínicos de AIS: 1) hábito feminino; 2) desenvolvimento mamário feminino normal; 3) ausência ou escassez de pêlos pubianos e axilares; 4) genitália externa feminina; 5) ausência de genitais internos, exceto útero rudimentar, trompas uterinas ou ductos espermáticos, em alguns pacientes; 6) gônadas com túbulos seminíferos, ausência de espermatogênese e aumento das células intersticiais e 7) análise hormonal realizada em um limitado número de casos sugeriu que estes testículos eram capazes de produzir estrógenos e andrógenos e que as gonadotrofinas estavam elevadas em alguns casos.

Várias formas de pseudo-hermafroditismo masculino por insensibilidade aos andrógenos foram descritas entre 1940 e 1950, embora a sua relação com a forma completa não tenha sido reconhecida inicialmente. Em 1947, Reifenstein relatou uma síndrome familiar com herança ligada ao cromossomo X, com hipospádia, ginecomastia e infertilidade, em associação com uma excreção normal de 17-cetoesteróides e altos níveis de FSH. Em 1957, Gilbert-Dreyfus e cols. e, em 1959, Lubs e cols. descreveram casos familiares similares. Em 1963, Morris e Mahesh *apud* Quigley e cols. (4) observaram que alguns casos relatados de “feminização testicular” apresentavam sinais clínicos que não eram compatíveis com a descrição original da AIS, uma vez que os indivíduos afetados apresentavam clitoromegalia ou desenvolvimento peniano. Estes autores concluíram que estes indivíduos representavam uma condição clinicamente heterogênea, intimamente relacionada com a clássica AIS (4).

Em 1974, Wilson e cols. sugeriram que esta patologia era decorrente da resistência à ação dos andrógenos nos tecidos-alvo (12). Keenan e cols. (13) demonstraram ausência de ligação do DHT ao AR em cultura de fibroblastos de pacientes portadores da forma

completa de insensibilidade aos andrógenos. Griffin e cols. (14) estudaram a ligação do DHT ao AR em fibroblastos e demonstraram ausência ou diminuição da ligação nos fibroblastos de pacientes designados como portadores de feminilização testicular incompleta, pseudo-hermafroditismo masculino incompleto familiar tipo 1 e feminização testicular completa.

Outras sinônimas foram utilizadas para denominar pacientes portadores da forma completa e parcial de insensibilidade aos andrógenos: 1) forma parcial de AIS – Síndrome de Reifenstein, Gilbert-Dreyfus, pseudo-hermafroditismo masculino incompleto familiar tipo 1 e feminização testicular incompleta; 2) forma completa de AIS – Síndrome de Morris, Síndrome de feminização testicular completa e testículos feminizantes.

Quadro clínico da Insensibilidade Completa aos Andrógenos (CAIS)

A forma completa de AIS é relativamente rara. Conforme referido por Quigley e cols. (4), o estudo mais acurado de prevalência desta síndrome parece ser o de Bangsbo (15), que estimou a prevalência de AIS em 1:20.400 nascidos do sexo masculino em um grande estudo dinamarquês. Alguns indivíduos são diagnosticados antes ou logo após o nascimento, devido à discrepância entre o achado do cariótipo 46,XY, obtido na amniocentese e a presença de genitália externa feminina na ultra-sonografia pré-natal ou ao nascimento (2,4,16). Na infância, a apresentação clínica mais comum é a presença de hérnia inguinal bilateral. Grumbach e cols. (2) estimaram a prevalência de AIS em crianças fenotipicamente femininas com hérnia inguinal bilateral em 1 a 2%. Os indivíduos não diagnosticados durante a infância são detectados após a puberdade devido à amenorréia primária (2). Os pacientes portadores da forma completa de AIS apresentam genitália externa feminina, com ausência ou rarefação de pêlos pubianos, vagina em fundo-cego e ausência de útero. Em estudo histopatológico realizado por Rutgers e Scully (17) foram encontradas estruturas derivadas dos ductos de Müller, como diminutas trompas, em cerca de 35% dos casos. Remanescentes dos ductos de Wolff, tais como epidídimo e vaso deferente, também podem ser encontrados (4).

Indivíduos com a forma completa de AIS têm excelente feminização na puberdade, com mamas normais ou aumentadas, contornos corporais femininos e ausência de acne, devido à produção de estrógeno pelos testículos e pela aromatização periférica da testosterona (1,4).

Quadro clínico da Insensibilidade Parcial aos Andrógenos (PAIS)

A prevalência desta forma de AIS permanece ainda desconhecida, devido à variabilidade da expressão clínica e à existência de formas atípicas, como a síndrome do homem infértil, atualmente classificada como insensibilidade leve aos andrógenos. O fenótipo genital de indivíduos com a forma parcial de AIS é altamente variável (4). A maior parte dos autores considera a forma mais grave de insensibilidade parcial aos andrógenos a apresentação de fenótipo feminino, com discreta clitoromegalia e fusão parcial dos pequenos lábios. Outros pacientes têm importante ambigüidade genital ao nascimento. Em alguns casos, o fenótipo é masculino, porém com micropênis, hipospádia perineal e criptorquidia. Há relatos de casos de formas parciais de AIS manifestadas apenas por ginecomastia em homens férteis, ou ainda hipospádia ou esterilidade em homens fenotipicamente normais (1,18).

As estruturas derivadas dos ductos de Wolff podem desenvolver-se em grau variável, na dependência do nível de sensibilidade aos andrógenos. Durante a puberdade pode ocorrer virilização ou feminização. Do mesmo modo que na forma completa de AIS, o desenvolvimento das mamas e a feminização do contorno corporal podem ocorrer devido aos níveis relativamente altos de estrógeno na presença de resistência androgênica (4).

Diagnóstico

O diagnóstico da AIS deve ser cogitado em uma criança com cariótipo 46,XY que apresenta genitália ambígua ou fenótipo feminino, na qual a resposta da testosterona e DHT ao teste de estímulo com hCG é normal para o sexo masculino e a história familiar sugere herança ligada ao X. A ausência de útero pode ser confirmada pela ultra-sonografia pélvica. A demonstração de ligação anormal dos andrógenos ao AR em cultura de fibroblastos da pele dos genitais ou a identificação de mutação inativadora no gene do receptor androgênico de indivíduos afetados confirma o diagnóstico (2).

Classicamente, porém não universalmente, os indivíduos em idade pós-puberal portadores de AIS (CAIS e PAIS) possuem níveis séricos elevados de LH e concentrações normais ou elevadas de FSH, estrógeno e testosterona, em relação aos homens normais. Estudos realizados com recém-nascidos e crianças com CAIS revelaram que os níveis séricos de LH e testosterona não estão acima do normal nesta faixa etária (4). A produção de estrógeno pelo

testículo e pela aromatização periférica da testosterona está elevada aproximadamente duas vezes quando comparada à de homens normais. A relação entre os níveis sanguíneos de testosterona e DHT está significativamente elevada, porém não compatível com os níveis encontrados na deficiência de 5 α -redutase tipo 2 (2,4).

Mutações identificadas no receptor de andrógenos em pacientes com AIS

Foram descritos dois tipos de defeitos primários no receptor androgênico, responsáveis pela AIS: 1) anormalidades na ligação ao andrógeno e 2) anormalidades na ligação ao DNA. Ambos os defeitos prejudicam a atividade transcricional do AR (4). Aproximadamente 300 mutações diferentes foram identificadas por técnicas de biologia molecular e caracterizadas no gene do AR em portadores das várias formas de AIS (19). Estes defeitos podem ser classificados da seguinte forma: 1) defeitos estruturais maiores no gene do AR (deleções gênicas completas ou parciais); 2) defeitos estruturais menores (deleção ou inserção de 1 a 4 pares de bases); 3) mutações pontuais que originam códon de parada (*stop codon*), troca de aminoácidos (*missense*) ou alteram o processo de *splicing* do gene do AR (4).

O registro das mutações no gene do AR está disponível pela internet (<http://www.xanadu.mgh.harvard.edu/receptor/trrfront.html>) (19). O número diferente de repetições CAG fez com que vários autores utilizassem numerações diferentes para os códons do AR. No presente estudo, utilizamos a numeração adotada no arquivo de mutações do AR, supracitado.

A frequência de deleções ou inserções no gene do AR de portadores de AIS é de aproximadamente 5–10%. Estas mutações possuem tamanhos variáveis, desde a deleção de único ou múltiplos nucleotídeos até a deleção de todo o gene. Os pacientes portadores deste tipo de mutação apresentam a forma completa de AIS, uma vez que há uma alteração no quadro de leitura do AR, não havendo a expressão de uma proteína íntegra e, conseqüentemente, ausência de ligação aos andrógenos (20).

A substituição de um único nucleotídeo é muito mais freqüente, quando comparada à freqüência de deleções e inserções do gene do AR. Quando estas mutações resultam em alteração do *splicing* do RNAm e códon de parada prematura do AR, ocasionam grandes alterações na estrutura do receptor e são sempre responsáveis por CAIS (20).

As substituições de nucleotídeos que causam a mudança de um aminoácido na proteína do AR podem ser divididas em duas grandes categorias: 1) mutações no domínio de ligação ao DNA e 2) mutações no

domínio de ligações aos andrógenos. Estas mutações causam um espectro fenotípico variável de AIS (20).

As substituições de aminoácidos no domínio de ligação ao DNA originam ARs mutantes, que ligam-se normalmente aos andrógenos, mas apresentam capacidade diminuída de ligação às seqüências dos genes responsivos aos andrógenos (20).

As substituições de aminoácidos no domínio de ligação aos andrógenos resultam em uma variedade de alterações na capacidade do AR de ligar-se a esses hormônios. Em uma pequena proporção destas mutações, o AR mutante torna-se totalmente incapaz de ligar-se aos andrógenos, provavelmente por alterações na estrutura da proteína (20).

A formação e estabilidade do complexo hormônio/receptor influem no grau de disfunção dos ARs mutantes. Mais freqüentemente, as mutações de substituição no domínio de ligação aos andrógenos causam a síntese de ARs mutantes que exibem propriedades de ligação anormais quando comparadas ao AR normal (redução na afinidade ou estabilidade da ligação). Estudos *in vitro* destes ARs mutantes demonstraram que o uso de doses elevadas de testosterona ou dihidrotestosterona ou o uso de potentes agonistas pode compensar o defeito de alguns ARs mutados (20).

McPhaul e cols. (20) demonstraram que as mutações no gene do AR estão localizadas preferencialmente em duas regiões: entre os aminoácidos 726 e 772 e 826 e 864, regiões codificadas por nucleotídeos localizados nos exons 5 e 7, respectivamente. Diversos autores analisaram apenas parte da região codificadora do gene do AR, sendo o éxon 1 o menos estudado (21). Em 2000, Ahmed e cols. (22), com um grande número de pacientes com suspeita de serem portadores de AIS, identificaram mutações em toda a região codificadora do gene do AR, afetando principalmente o domínio de ligação aos andrógenos, e particularmente o exon 5.

Atualmente, têm sido realizados estudos para avaliação dos níveis de expressão e função de ARs normais e mutados. O principal efeito da maioria das mutações no AR não está relacionado com a quantidade de receptor, mas com a sua função. Entretanto, as mutações que originam proteínas truncadas (códon de parada prematura ou alterações do *splicing* do RNAm do AR) são exceções para esta regra (20).

Mutações identificadas no receptor de andrógenos em pacientes brasileiros com AIS

Durante a realização do estudo do AR em nossa casuística foram publicados dois trabalhos descrevendo mutações identificadas no gene do AR em pacientes brasileiros portadores de CAIS e PAIS (23,24). O

primeiro deles descreve uma série de 5 pacientes portadoras de CAIS. Foram identificadas 3 mutações (R615H, R752Q, A585A) neste grupo de pacientes, sendo duas do tipo *missense* e uma silenciosa (23). O segundo trabalho descreve um portador de PAIS no qual foi identificada uma mutação nova (W718S) no gene do AR (24).

Analisamos a região codificadora do gene do AR em 33 pacientes de 21 famílias, com quadro clínico e hormonal sugestivo de AIS. Onze pacientes (9 famílias) com diagnóstico de CAIS e 22 pacientes (12 famílias) com diagnóstico de PAIS. Nas tabelas 1-7 e figura 1 encontram-se os dados clínicos, hormonais e moleculares das famílias estudadas na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e Laboratório de Hormônios e Genética Molecular – LIM 42, Disciplina de Endocrinologia da FMUSP.

Identificamos mutações no gene do receptor androgênico e a etiologia da síndrome de insensibilidade aos andrógenos em 86% das 21 famílias estudadas: 100% das famílias com insensibilidade completa aos andrógenos e 75% das famílias com insensibilidade parcial aos andrógenos. O expressivo número de mutações identificadas em pacientes com insensibilidade parcial aos andrógenos foi consequência da utilização, entre os critérios de inclusão, da história familiar positiva e/ou ginecomastia. A análise de toda a região codificadora do gene do receptor androgênico contribuiu para o elevado percentual de mutações detectadas (25).

O quadro clínico de insensibilidade aos andrógenos nos pacientes estudados foi semelhante ao dos pacientes descritos na literatura (tabelas 1 a 6).

Identificamos mutações na região *hot spot* para mutações no gene do receptor androgênico, exons 5 e 7, em 43% das famílias estudadas. 50% das mutações encontradas em todo o gene estavam localizadas nesta região (tabela 7 e figura 1) (25).

Identificamos 9 mutações descritas anteriormente na literatura (N705S, W741C, M742V, R752X, Y763C, R779W, M807V, R855C e R855H). Os pacientes portadores destas mutações apresentavam fenótipo semelhante ao dos pacientes descritos na literatura com as mesmas mutações. Identificamos ainda 6 mutações novas no gene do AR (S119X, T602P, L768V, R840S, I898F e P904R). O fenótipo destes pacientes foi compatível com a natureza da alteração molecular na proteína do receptor androgênico (25,26). Identificamos ainda a mutação IVS3 – 60 G>A em paciente portadora de PAIS. A ausência de mutação IVS3 – 60 G>A, pesquisada em 103 alelos de indivíduos normais, indica não se tratar de polimorfismo. Porém, os estudos de

Tabela 1. Dados da história clínica das pacientes portadoras de CAIS.

Família	Paciente	Idade (anos)	História familiar	Queixa principal	Idade do início do desenvolvimento (anos)		Atividade sexual
					Mamas	Pêlos pubianos	
I	1	14	Negativa	Amenorréia primária + Hérnia Inguinal	13	13,5	Início aos 21 anos. Dispareunia (algumas vezes) Freqüência 3x/semana
II	2**	17	+	Amenorréia primária	13	16	-
	3	16	+	Amenorréia primária	12	14	Início aos 20 anos, com dispareunia e sangramento. Atualmente sem dispareunia
III	4	16	Negativa	Hérnia Inguinal	12	11,5	Dispareunia + diminuição da lubrificação vaginal
IV	5	14,5	+	Amenorréia primária + Assimetria das mamas	13	14	-
V	6	19,8	Ignorada	Amenorréia primária	15	17	Dispareunia + diminuição da lubrificação vaginal
VI	7	34	+	Amenorréia primária	11	11	Relação sexual satisfatória. Sem dispareunia ou sangramento
VII	8*	9,5	+	Hérnia Inguinal	-	-	-
	9*	43	+	Hérnia Inguinal	-	-	Relação sexual satisfatória
VIII	10*	5,8	Negativa	Hérnia Inguinal	-	-	-
IX	11	19	Negativa	Amenorréia primária	-	-	-

Tabela 2: Dados da história clínica dos pacientes portadores de PAIS.

Família	Paciente	Sexo social	Idade (anos)	História familiar	Queixa principal	Idade do início do desenvolvimento (anos)		Atividade sexual
						Mamas	Pêlos pubianos	
X	12	F	30	+	GA	13	13	Vida sexual ativa, sem dispareunia
	13	M	7,8	+	GA	12	13	-
	14#	M	16,5	+	GA	12	13,8	Casado. Libido e ereção normais Sem ejaculação
XI	15#	F	19	+	GA	> 12	12	Início aos 14 anos. Vida sexual satisfatória
	16	F	18	+	Amenorréia primária + HI	14	14	Casada. No início com dispareunia e sangramento. Atualmente satisfatória
XII	17	F	20	+	HI	12,5	-	Relação homossexual
	18	F	14	+	GA	11,5	14	Atualmente relação homossexual.
	19*#	M	27	+	GA	-	13	Bissexual
	20	F	1,25	+	GA	16	-	Relação sexual satisfatória
	21*	F	17,5	+	GA	-	16	-
XIII	22	F	4,6	+	GA	-	-	-
	23*	F	9,4	+	GA	-	-	-
	24	M	25	Negativa	GA	-	-	-
	25	M	13,8	Negativa	GA	14,3	-	-
XIV	26	M	2,6	+	GA	-	14,8	-
	27	M→F	1	+	GA	-	-	-
XV	28	M	2,5	+	GA	12,5	-	-
XVI	29	M	16	+	GA	-	12,5	-
	30	M	7,25	+	GA	-	-	-
XVII	31	M	22	Negativa	Hipospadia	17	-	Libido, ereção, ejaculação normais
XVIII	32	M	11,8	Negativa	Hipospadia	11,5	-	-
XIX	33	M→F	30	Negativa	GA	13,5	11,5	Desejo, excitação, orgasmo normais
XX							13,5	
XXI								

GA = genitália ambígua; HI = hérnia inguinal

Tabela 3. Dados do exame físico e exames de imagem das pacientes portadoras de CAIS.

Família	Paciente	Idade (anos)	Mamas (Tanner)	Pêlos axilares	Pêlos pubianos (Tanner)	Vagina (cm)	Posição das gônadas
I	1	14	III	+/4+	II	Presente (3,0)	Inguinal
II	2**	17	V	Ausentes	III	Presente (3,0)	Abdomen
	3	16	IV	Ausentes	III (rarefeitos)	Presente (4,0)	Abdomen
III	4	16	V	Ausentes	IV (rarefeitos)	Presente (2,5)	Inguinal
IV	5	14,5	III (assimétricas)	+/4+	II	Presente	Abdomen
V	6	19,8	V	Ausentes	IV (rarefeitos)	Presente (5,0)	Grandes lábios
VI	7	34	V	Ausentes	IV (rarefeitos)	Presente	Inguinal
VII	8*	9,5	I	Ausentes	I	Presente	Inguinal
	9*	43	IV	+/4+	II	Presente	Inguinal
VIII	10*	5,8	I	Ausentes	I	Presente	Inguinal
IX	11	19	IV	Ausentes	III (rarefeitos)	Presente	Abdomen

Tabela 4. Dados do exame físico e exames de imagem dos pacientes portadores de PAIS.

Família	Paciente	Sexo social	Idade (anos)	Mamas (Tanner)	Pêlos axilares	Clitóris ou falo (cm)	Pêlos pubianos (Tanner)	Orifício vaginal e uretral	Vagina (cm)	Localização gônadas	Hipospadia
X	12	F	30	IV	-	3,2	IV	Único	Presente	Inguinal	Perineal
XI	13	M	7,8	I	Ausentes	2,8	I	Único	Ausente	Inguinal	Perineal
	14#	M	16,5	A/C	Ausentes	5	III	-	-	-	-
	15#	F	19	V	+++	-	V	Único	Presente	Inguinal	-
	16	F	18	V	Ausentes	4,5	IV	Isolados	Presente (1,5)	Inguinal	Perineal
XII	17	F	20	IV	+++	4	V	Isolados	Presente (4,0)	Inguinal	Perineal
	18	F	14	IV	++	4	IV	Isolados	Presente (3,0)	Grandes lábios	Perineal
XIII	19*#	M	27	A/C	+	6	IV	-	-	-	-
	20	F	1,25	I	Ausentes	2,8	I	Único	Presente	Inguinal	Perineal
	21*	F	17,5	-	-	3,5	-	Isolados	Presente	Inguinal	Perineal
	22	F	4,6	I	Ausentes	3,2	I	Único	Presente	Inguinal	Perineal
	23*	F	9,4	I	Ausentes	3,8	I	Único	Presente (2,8)	-	Perineal
XIV	24	M	25	G	-	6	-	Único	Presente (3,0)	Bolsa	Perineal
XV	25	M	13,8	I	Ausentes	4	I	Único	Presente	Inguinal	Perineal
XVI	26	M	2,6	I	Ausentes	3	I	Único	Presente	Inguinal	Perineal
	27	F	1	I	Ausentes	1,5	I	Único	Presente	Inguinal	Perineal
XVII	28	M	2,5	I	Ausentes	3,8	I	Único	-	Bolsa	Perineal
XVIII	29#	M	16	IV	Ausentes	3,2	-	Único	Presente	-	Perineal
	30	M	7,25	I	Ausentes	2,5	I	Único	-	Inguinal	Perineal
XIX	31#	M	22	IV	++	9,5	V	-	-	-	Perineal
XX	32#	M	11,8	III	-	6,4	III	-	-	-	Perineal
XXI	33	F	30	G	-	4	-	Único	Presente	Inguinal	Perineal

A/C= retirada por cirurgia; G= ginecomastia

Tabela 5. Dados hormonais das pacientes portadoras de CAIS.

Família	Paciente	Idade (anos)	LH (UI/L)	FSH (UI/L)	Testo (ng/dL)	DHT (ng/dL)	Relação Testo/DHT	E2 (pg/mL)	T X LH (ng/dL X UI/L)
I	1	14	22	4,1	790	9,3	84	< 20	17380
	2*	17	32	16	286	22	13	22	9152
II	3	16	43	13	1033	58	17	< 10	44419
III	4	16	23	11	317	5,2	60	27	7291
IV	5	14,5	30	8	186	21	8,8	-	5580
V	6	19,8	27	5	275	51	5,3	30	7425
VI	7	34	24	6,9	815	30	27	40	19560
VII	8**	9,5	< 0,6	5,5	< 14	-	-	< 13	-
	9**	43	-	-	-	-	-	-	-
VIII	10**	5,8	< 0,6	11	< 7	-	-	-	-
IX	11	19	14,4	3,5	365	-	-	36	5256
Valores normais adultos			1,4-9,2	1-10,5	200-950	36-56	8,8-19,2	10-40	< 3089
Valores normais após hcg			1,0-10	1-12	262-520	21-37	9-19		

Tabela 6. Dados hormonais dos pacientes portadores de PAIS.

Família	Paciente	Sexo Social	Idade (anos)	LH (UI/L)	FSH (UI/L)	Testo (ng/dL)	DHT (ng/dL)	Relação T/DHT	E2 (pg/mL)	T X LH (ng/dL X UI/L)
X	12	F	30	30	9,2	798	81	9,8	109	23940
XI	13	M	7,8	< 0,6	< 1	386A	-	-	-	-
	14#	M	16,5	9,3	11	1022	303	3,3	20	9504
XII	15#	F	19	30	7,5	1042	-	-	56	31260
	16	F	18	13	1,1	1592	71	22	49	20696
	17	F	20	22	11	243	-	-	-	5346
	18	F	14	15	10	1355	-	-	-	20325
XIII	19*#	M	27	-	-	-	-	-	-	-
	20	F	1,25	30	< 4	332	34	9,7	-	-
	21*	F	17,5	-	-	-	-	-	-	-
	22	F	4,6	-	-	-	-	-	-	-
	23*	F	9,4	-	-	-	-	-	-	-
XIV	24	M	25	49	11	1100	53	20,7	-	53900
XV	25	M	13,8	6,3	5,1	175 (413A)	11,5 (29A)	15 (14A)	< 10	-
XVI	26	M	2,6	< 0,6	< 1	1140A	211A	5,4	-	-
	27	F	1	8,1	4,2	600	110	5,4	-	-
XVII	28	M	2,5	-	4,6	355A	47A	7,5	< 10	-
XVIII	29	M	16	130	34	157 (292A)	26 (32,5A)	6 (9A)	< 20	20410
	30	M	7,25	-	-	110A	13,9	7,9	-	-
XIX	31	M	22	5,5	4,2	647	51,7	12,5	-	3558
XX	32	M	11,8	2,0	1,7	299	34,6	8,7	18	598
XXI	33	M→F	30	-	-	-	-	-	-	-
Valores normais adultos				1,4-9,2	1-10,5	200-950	36-56	8,8-19,2	10-40	< 3089
Valores normais após hCG				1-10	1-12	262-520	21-37	11,3-30,7		

Tabela 7. Mutações identificadas no gene do receptor de andrógenos em pacientes portadores de AIS.

Paciente	Forma clínica	Nucleotídeo	Codon	Aminoácido	Exon	Designação	Tipo substituição	Aminoácido substituído
8 e 9	CAIS	433 - TCG → TAG	119	S → Stop	1	S119X	Nonsense	-
29 e 30	PAIS	2307 - ACT → CCT	602	T → P	3	T602P	Não conservativa	-
33	PAIS	IVS3 -60 G > A			Intron 3	IVS3 -60 G > A		-
7 e 11	CAIS	2469 - AAT → AGT	705	N → S	4	N705S	Conservativa	Conservado
28	PAIS	2585 - TGG TGC	741	W → C	5	W741C	Não conservativa	Conservado
12	PAIS	2586 - ATG → GTG	742	M → V	5	M742V	Conservativa	Conservado
5	CAIS	2616 - CGA → TGA	752	R → Stop	5	R752X	"Nonsense"	Conservado
24	PAIS	2650 - TAC → TGC	763	Y → C	5	Y763C	Conservativa	Não conservado
6	CAIS	2664 - CTG → GTG	768	L → V	5	L768V	Conservativa	Conservado
1	CAIS	2697 - CGG → TGG	779	R → W	6	R779W	Não conservativa	Não conservado
4	CAIS	2781 - ATG → GTG	807	M → V	6	M807V	Conservativa	Conservado
13, 14	PAIS	2880 - CGT → AGT	840	R → S	7	R840S	Não conservativa	Não conservado
2,3	CAIS	2925 - CGC → TGC	855	R → C	7	R855C	Não conservativa	Conservado
25, 26, 27	PAIS	2926 - CGC → CAC	855	R → H	7	R855H	Conservativa	Conservado
15, 16, 17 e 18	PAIS	3055 - ATC → TTC	898	I → F	8	I898F	Conservativa	Conservado
10	CAIS	3073 - CCC → CGC	904	P → V	8	P904V	Conservativa	Conservado

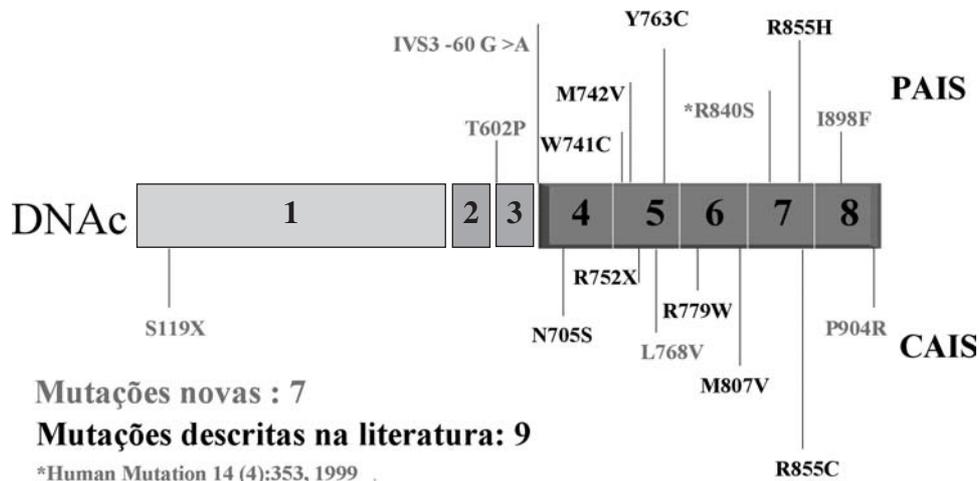


Figura 1. Mutações identificadas no receptor androgênico em pacientes com AIS desta casuística.

expressão desta mutação são necessários para a compreensão da possível relação entre o genótipo e o fenótipo apresentados pela nossa paciente.

Não identificamos mutações no gene do AR nas famílias XIII, XIX e XX. Os pacientes 19, 20, 21, 22 e 23, pertencentes à família XIII, possuem história familiar sugestiva de AIS; a identificação de 21 repetições CAG nos 3 pacientes analisados sugere que estes pacientes possuem um alelo comum do AR. A história familiar destes pacientes é caracteristicamente ligada ao cromossomo X, visto que todos os afetados desta família são relacionados através das mães. A intensa rarefação dos pêlos corporais e o desenvolvimento de ginecomastia destes pacientes também são características da AIS. Estes dados são sugestivos de defeito molecular no AR que provavelmente está localizado na região promotora

ou região intrônica deste gene.

Os pacientes 31 (família XIX) e 32 (família XX), apesar de não possuírem história familiar sugestiva de herança ligada ao X, apresentaram ambigüidade de genitália externa ao nascimento, desenvolveram ginecomastia, submetendo-se à mastectomia e apresentaram quadro hormonal sugestivo de AIS. Estes pacientes acima descritos podem possuir mutações em regiões não-codificadoras do gene do AR. Um dado interessante observado durante a composição deste trabalho é que estes são os 2 pacientes que possuem o produto T x LH mais baixo entre todos portadores de AIS da nossa casuística, sendo igual aos valores encontrados nos controles normais, no paciente 32 e apenas discretamente elevado no paciente 31. Apesar deste dado, estes pacientes apresentam características compatíveis com

AIS e n3o com outras causas conhecidas de pseudo-hermafroditismo masculino. N3o podemos excluir a possibilidade de que estes pacientes sejam portadores de muta73o localizada na regi3o intr3nica ou promotora do gene do AR, ou de defeitos em outros genes que possuam atividade relacionada com o AR, como por exemplo os co-ativadores ou co-repressores.

REFER3NCIAS

1. Kupfer SR, Quigley CAE, French FS. Male pseudohermafroditism. **Semin Perinatol** 1992;16:319-31.
2. Grumbach MM, Hughes IA, Conte FA. Disorders of sex differentiation. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. **Williams Textbook of Endocrinology**. Philadelphia:W.B. Saunders Company; 2002. p.842-1003.
3. Muroso K, Mendon7a BB, Arnold JJP, Rigon ACMM, Migeon CJ, Brown TR. Human androgen insensitivity due to point mutations encoding amino acid substitutions in the androgen receptor steroid binding domain. **Hum Mut** 1995;6:152-65.
4. Quigley CA, Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. **Endocr Rev** 1995;16:271-320.
5. Hiiipakka RA, Liao S. Molecular mechanism of androgen action. **TEM** 1998;9:317-24.
6. Lazar MA. Mechanisms of action of hormones that act on nuclear receptors. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. **Williams Textbook of Endocrinology**. Philadelphia:W.B. Saunders Company; 2002.p.35-44.
7. Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. **Science** 1988;240:327-30.
8. Chang C, Kokontis J, Liao S. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. **Science** 1988;240:324-6.
9. Trapman J, Klaassen P, Kuiper TGJM, Van Der Korput JAGM, Faber PW, Van Rooij T, et al. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. **Biochem Biophys Res Commun** 1988;153:241-8.
10. Brown TR, Scherer PA, Chang YT, Migeon CJ, Ghirri P, Muroso K, et al. Molecular genetics of human androgen insensitivity. **Eur J Pediatr** 1993;152:62-9.
11. Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. **Nucleic Acids Res** 1994;22:3181-6.
12. Wilson JD, Harrod MJ, Goldstein JL, Hemsell LCDL, Usaf MC, Macdonald PC. Familial incomplete male pseudohermafroditism type 1. Evidence for androgen resistance and variable clinical manifestations in a family with the Reifenstein syndrome. **N Engl J Med** 1974;290:1097-103.
13. Keenan BS, Meyer WJ, Hadjian AJ, Jones HW, Migeon CJ. Syndrome of androgen insensitivity in man: absence of 5 α -dihydrotestosterone binding protein in skin fibroblasts. **J Clin Endocrinol Metab** 1974;38:1143-6.
14. Griffin JE, Punyashthiti K, Wilson JD. Comparison of cells from control subjects and from patients with hereditary male pseudohermafroditism due to androgen resistance. **J Clin Endocrinol Metab** 1976;57:1342-51.
15. Bangsboll S, Qvist I, Lebech PE, Lewinsky M. Testicular feminization syndrome and associated gonadal tumors in Denmark. **Acta Obstet Gynecol Scand** 1992;71:63-6.
16. Stephens JD. Prenatal diagnosis of testicular feminisation. **Lancet** 1984;2:1038-41.
17. Rutgers JL, Scully RE. The androgen insensitivity syndrome (testicular feminization): a clinicopathologic study of 43 cases. **Int J Gynecol Pathol** 1991;10:126-44.
18. Hior O, Holterhus PM, Horter T, Schulze W, Kremke B, Bals-Pratsch M, et al. Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85:2810-5.
19. Gottlieb B, Lehvaslaiho H, Beitel LK, Lumbroso R, Pinsky L, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database. **Nucleic Acids Res** 1998;26:2348.
20. McPhaul MJ. Defects of androgen action. In: Jameson JL, editor. **Principles of molecular medicine**. Totowa:Humana Press. Inc; 1998.
21. Gottlieb B, Vasilidou DM, Lumbroso R, Beitel LK, Pinsky L, Trifiro MA. Analysis of exon 1 mutations in the androgen receptor gene. **Hum Mut** 1999;16:527-39.
22. Ahmed SF, Cheng A, Dovey L, Hawkins JR, Martin H, Rowland J, et al. Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85:658-65.
23. Cabral DF, Maciel-Guerra AT, Hackel C. Mutations of androgen receptor gene in Brazilian patients with male pseudohermafroditism. **Braz J Med Biol Res** 1998;31:775-8.
24. Ribeiro ML, Cabral DF, Maciel-Guerra AT, Guerra-Junior G, Hackel C. A novel mutation in the steroid-binding domain of the androgen receptor gene in a boy with ambiguous genitalia and hypergonadotrophic hypogonadism. **J Endoc Genet** 1999;1:91-3.
25. Melo KF, Mendon7a BB, Billerbeck AE, Costa EM, Inacio M, Silva FA, et al. Clinical, hormonal, behavioral, and genetic characteristics of androgen insensitivity syndrome in a Brazilian cohort: five novel mutations in the androgen receptor gene. **J Clin Endocrinol Metab** 2003;88:3241-50.
26. Melo KFS, Lafronico AC, Costa EMF, Billerbeck AEC, Mendon7a BB, Arnold JJP. A novel point mutation (R840S) in the androgen receptor in a Brazilian family with partial androgen insensitivity syndrome. **Hum Mut** 1999;14:353.

Endere7o para correspond3ncia:

Ivo J. P. Arnold
Av. Dr En3as de Carvalho Aguiar 155, PAMB, 2 $^{\circ}$ andar, BI 06
05403-900 S3o Paulo, SP
E-mail: iarnhold@usp.br