

Juliana Beaudette Drummond

**ESTUDO DOS GENES *WNT4* E *CTNNB1* NA SÍNDROME DE MAYER-
ROKITANSKY-KÜSTER-HAUSER**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2007

Juliana Beaudette Drummond

**ESTUDO DOS GENES *WNT4* E *CTNNB1* NA SÍNDROME DE MAYER-
ROKITANSKY-KÜSTER-HAUSER**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Luiz Armando De Marco

Co-orientador: Prof. Fernando M. Reis

Universidade Federal De Minas Gerais

Belo Horizonte

2007

AGRADECIMENTOS

Ao professor Luiz Armando De Marco, por sua orientação, amizade, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade de ter realizado esse trabalho.

Ao professor Fernando M. Reis, por ceder as pacientes ao estudo, pelo incentivo na carreira acadêmica, e por suas palavras sempre encorajadoras nos momentos difíceis.

À professora Wolfanga Lentz Monteiro Boson, exemplo maior de dedicação à medicina e seriedade no trabalho desenvolvido no laboratório, por sua preciosa ajuda e amizade.

Aos meus pais, fonte incondicional de apoio, por todo o amor e doação infindável aos meus projetos de vida.

Ao meu irmão João Miguel, por seu carinho e amizade.

Ao meu marido César, por seu amor, companheirismo, compreensão e incentivo.

À professora e amiga Maria Marta Sarquis Soares, por sua ajuda constante e por seu exemplo de motivação com a endocrinologia e a biologia molecular.

Aos mestres Thomaz, Eduardo, Víctor e toda equipe do Hospital Felício Rocho, que me introduziram na “arte” da Endocrinologia e me proporcionaram a oportunidade de crescer como pessoa e profissional.

Ao Dr. Paulo Dias do Nascimento, pelo convite à Integração da Equipe do Hospital Mater Dei, à Bia, pelo exemplo de determinação e alegria, e às demais queridas colegas de trabalho: Márcia, Érika e Suélem.

Aos colegas de Laboratório: Juliana, Paulo, Débora, Bete, Gislene, Ana Luiza, Gui, Gabriela, Bruna, Júlia, Dani, Bruno, Renan e Karen pelo apoio, ajuda, amizade e pela boa convivência que tornaram muito mais amenos os momentos difíceis durante os experimentos, e, em especial, ao Flávio, à Paôlla e à Letícia, pelo acolhimento e ensinamentos valiosos, e à Cidinha, pela preciosa contribuição ao trabalho.

Às técnicas Marília, Viviane e Altina pelo trabalho que tanto adianta e facilita nossa vida no laboratório.

Aos pacientes e familiares pela boa vontade em participar desse projeto.

Aos meus amigos e a todos aqueles que acreditaram e que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

A Deus, pela a graça de uma nova vida que muito nos alegrará em 2007.

LISTA DE ABRAVIATURAS

A	absorbância
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>
AMH	hormônio anti-Mülleriano
AMHRII	receptor tipo 2 do AMH
APC	<i>adenomatous polyposis of the colon</i>
BMP	proteína óssea morfogenética
<i>BMP-4</i>	proteína óssea morfogenética, gene 4
cDNA	DNA complementar
<i>CTNNB1</i>	β -catenina-1, gene
<i>Cyp26b1</i>	família 26 do citocromo P450, membro b1
dATP	desoxi-adenosina trifosfato
<i>DAX1</i>	<i>dosage-sensitive sex-reversal(DSS)-adrenal hypoplasia congênita (AHC)</i> <i>critical region on the X chromossome, gene 1</i>
dCTP	desoxi-citidina trifosfato
dGTP	desoxi-guanosina trifosfato
DNA	ácido desoxiribonucleico
ddNTP	didesoxi-nucleotídeo trifosfato
Dkks	<i>dickkopf</i>
dNTP	desoxi-nucleotideo trifosfato
dsDNA	DNA de fita dupla
<i>DSH</i>	<i>dishevelled, gene</i>

dTTP	desoxi-timidina trifosfato
E	dia embrionário
EDTA	ácido tetra etileno diamino
<i>Emx-2</i>	<i>empty spiracles, drosophila, 2, homolog of, gene</i>
FISH	hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
FSH	hormônio folículo estimulante
FZ	<i>frizzled</i>
g	gravidade
<i>GALT</i>	<i>galactose-1-phosphate uridyl-transferase, gene</i>
GATA-4	<i>gata-binding protein 4</i>
GSK-3 β	<i>glycogen synthase kinase 3 β</i>
<i>HOXA</i>	<i>homeobox a</i>
HOS	síndrome de Holt-Oram
HSPG	<i>heparin-sulfated forms of proteoglycans</i>
Insl 3	fator de crescimento insulina símile tipo 3
Kb	kilobase
KFS	síndrome de Klippel-Feil
LEF/TCF	<i>lymphoid enhancer binding factor/ T cell-specific factor</i>
<i>LHX-9</i>	<i>lim-homeobox gene 9</i>
LHX-1	<i>Lim-homeobox protein-1</i>
LRP	<i>lipoprotein related protein</i>
LTAP	<i>loop tail associated protein</i>
Mb	megabase

MgCl ₂	cloreto de magnésio
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
mM	milimolar
MMP2	<i>matrix metalloproteinase gene family member 2</i>
MUCRS	aplasia mulleriana, aplasia renal, displasia cérvico-torácica
ng	nanogramas
nm	nanômetro
nmol	nanomol
ml	mililitro
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PAX-2	<i>paired box gene 2</i>
PAX-8	<i>paired box gene 8</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
pb	pares de base
PBX1	<i>pre-b-cell leukemia transcription factor-1</i>
pH	potencial de hidrogênio
pmol	picomol
RAR	receptor do ácido retinóico
RXR	receptor retinóide X
RNA	ácido ribonucléico
SDHEA	sulfato de dehidroepiandrosterona
Sf1	<i>steroidogenic factor -1, gene</i>
SFRP	<i>secreted frizzled related protein</i>

siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Smad	<i>mothers against decapentaplegic related gene product</i>
SMRKH	síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser
SOX-9	<i>sry-related high-mobility group (HMG) box 9, gene</i>
SRY	<i>sex-determining region on the Y chromossome, gene</i>
SSCP	polimorfismo conformacional de fita única
STRA8	<i>stimulated by retinoic acid gene 8</i>
Taq	<i>thermus aquaticus</i>
TAR	<i>trombocytopenia-absent-radius syndrome</i>
TBX1	<i>t-box factor 1, gene</i>
TBX5	<i>t-box factor 5, gene</i>
TE	TRIS-EDTA
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TRIS	tris-hidroximetilētilenodiamino
TSR	<i>template supression reagent</i>
VANGL-2	<i>van gogh-like 2, gene</i>
WIF	fator inibidor dos WNTs
WNT	<i>wingless-type MMTV integration site family</i>
WNT4	<i>wingless-type MMTV integration site family, member 4</i>
WT1	<i>Wilms tumor, gene</i>

CÓDIGOS PARA NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS

NUCLEOTÍDEOS

A Adenina

C Citosina

G Guanina

T Timina

AMINOÁCIDOS

D	Ácido Aspártico	I	Isoleucina
E	Ácido Glutâmico	L	Leucina
A	Alanina	K	Lisina
R	Arginina	M	Metionina
N	Asparagina	P	Prolina
C	Cisteína	S	Serina
F	Fenilalanina	Y	Tirosina
G	Glicina	T	Treonina
Q	Glutamina	W	Triptofano
H	Histidina	V	Valina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alterações fenotípicas do trato reprodutor feminino (TRF) relacionadas a deleções gênicas em camundongos.....	14
Tabela 2: Características clínicas e laboratoriais das pacientes portadoras da SMRKH estudadas.....	29
Tabela 3: Protocolo de coloração pela prata	39
Tabela 4: Componentes para a reação de sequenciamento.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Origem das gônadas bi-potenciais.....	04
Figura 2: Migração das células germinativas durante a embriogênese.....	05
Figura 3: Padrão sexual dimórfico do desenvolvimento das células germinativas.....	06
Figura 4: Via canônica da sinalização dos WNTs.....	08
Figura 5: Gene <i>WNT4</i>	09
Figura 6: Papel do <i>WNT4</i> na determinação do sexo feminino.....	11
Figura 7: Determinação e diferenciação sexual dimórficas.....	12
Figura 8: Vias de sinalização do AMH.....	19
Figura 9: Ação do AMH na crista urogenital.....	20
Figura 10: MMP2 como efetor da via AMH.....	22
Figura 11: Estrutura e localização do gene <i>CTNNB1</i>	23
Figura 12: PAGE - gene <i>WNT4</i>	44
Figura 13: Segmento de cromatograma do gene <i>WNT4</i> (paciente 3).....	45
Figura 14: Segmento de cromatograma do gene <i>WNT4</i> (controle).....	45
Figura 15: PAGE - exon 3 do gene <i>CTNNB1</i>	46
Figura 16: Segmento de cromatograma do gene <i>CTNNB1</i>	46

RESUMO

A Síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (SMRKH), caracterizada pela malformação congênita do trato genital feminino, é a segunda causa mais freqüente de amenorréia primária em nosso meio, acometendo uma em cada 5000 mulheres nascidas vivas. No entanto, a base molecular da SMRKH ainda não é conhecida. A elucidação dos processos envolvidos na patogênese da SMRKH não só nos permitiria a compreensão desta condição relativamente comum, como também faria uma grande contribuição ao conhecimento sobre o controle genético da diferenciação sexual dos seres humanos, principalmente no tocante ao sexo feminino, que até recentemente, foi considerado o sexo da ausência.

Com esses objetivos em vista, procuramos estudar dois genes amplamente envolvidos na determinação e diferenciação do sexo feminino – *WNT4* e *CTNNB1* (*β-catenina 1*, gene) – em pacientes portadoras da SMRKH. O gene *WNT4* é crucial para a manutenção da arquitetura ovariana durante o desenvolvimento embrionário e para a formação dos ductos de Müller. Recentemente, mutações no gene *WNT4* foram descritas em pacientes portadoras de anomalias do trato genital feminino e hiperandrogenismo. No entanto, tais achados não foram confirmados em outros grupos de pacientes portadoras da SMRKH.

A *β-catenina* tem participação importante nas vias de sinalização dos WNTs e do hormônio anti-Mülleriano (AMH), principal responsável pela regressão dos ductos de Müller no sexo masculino. A estimulação das células mesenquimais peri-ductais pelo AMH determina acúmulo da *β-catenina*. O exon 3 do gene *CTNNB1* abriga seqüências nucleotídicas responsáveis pela codificação dos sítios de fosforilação da *β-catenina*, essenciais para sua degradação; mutações nesses sítios determinam acúmulo citoplasmático e nuclear da *β-catenina*, e poderiam determinar, em última instância, regressão anômala dos ductos de Müller nas pacientes afetadas.

Estudamos seis pacientes portadoras da SMRKH, provenientes de um centro de infertilidade no Brasil. Os 5 exons do gene *WNT4* e o exon 3 do gene *CTNNB1* foram amplificados por PCR, com a utilização de iniciadores específicos, a partir de DNA genômico. Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados em um sequenciador

automático. Não encontramos mutações nos cinco exons do gene *WNT4*, tampouco no exon 3 do gene *CTNNB1* no grupo de pacientes estudadas.

Em nosso estudo, concluímos que mutações da região codificadora do gene *WNT4* não estão associadas com a SMRKH e a procura de mutações nesse gene deve ser reservada para pacientes com anormalidades nos derivados de Müller associadas ao hiperandrogenismo. A presença de mutações no exon 3 do gene *CTNNB1* é uma causa improvável da SMRKH. Outras moléculas efetoras das vias de sinalização WNT e AMH deveriam ser estudadas em busca do esclarecimento da base molecular da SMRKH, que ainda permanece obscura.

ABSTRACT

The Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome is a congenital malformation of the female genital tract and is the second cause of primary amenorrhea, affecting one in every 5000 female live births. The genetic defect associated with the Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome has not been determined. Its elucidation would not only shed light up on the pathogenesis of the MRKH syndrome, but would greatly contribute to the general understanding of the genetic control of human fetal sexual development, specially the female sex, which has always been considered the default pathway.

We conducted this study to investigate whether two genes extensively involved with female sexual determination and differentiation - *WNT4* and *CTNNB1* (*β -catenin-1, gene*) - are affected in patients with Müllerian defects. The gene *WNT4* is crucial for maintenance of ovarian structure during fetal life and for Müllerian duct formation. Recently, *WNT4* gene mutations were described in patients with Müllerian duct regression and hyperandrogenism. Nevertheless, this finding has not been confirmed in other groups of patients with the MRKH syndrome.

β -catenin is a key downstream component of both WNTs and AMH (anti-Müllerian hormone) signaling pathways; AMH is directly responsible for Müllerian duct regression in males and leads to β -catenin stabilization in periductal mesenchymal cells. β -catenin serine/threonine phosphorylation sites are codified by nucleotidic sequences in the exon 3 of the *CTNNB1*. Mutations affecting this exon protect β -catenin protein from degradation, leading to its accumulation in the cytoplasm and nucleus, which could ultimately contribute to a putative abnormal regression of the Müllerian ducts.

Six female patients with the MRKH syndrome presenting to a Brazilian infertility center were studied. DNA was extracted from peripheral blood and subjected to PCR. After purification of PCR products, direct DNA automated sequencing to screen for nucleotide variation of the five coding exons of the *WNT4* and the exon 3 of the *CTNNB1* gene was performed. No significant nucleotidic variations on the *WNT4* gene or on the exon 3 of *CTNNB1* were found in this group of MRKH patients.

In our study we concluded that *WNT4* gene mutations are not associated with the MRKH syndrome. Screening for WNT4 mutations should be reserved for patients presenting with Müllerian defects and associated hyperandrogenism. Mutations on the exon 3 of *CTNNB1* gene are an unlikely cause of the MRKH syndrome. Other downstream effector molecules of the WNTs and AMH signaling pathways should be investigated in attempt to elucidate the genetic defect associated with the MRKH syndrome.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 Determinação sexual.....	3
1.1.1 Formação da gônada bi-potencial.....	4
1.1.2 Importância das células germinativas.....	5
1.1.3 Fatores somáticos envolvidos na gênese ovariana – gene <i>WNT4</i>	7
1.2 Diferenciação sexual	11
1.2.1 Biologia molecular da formação e diferenciação dos ductos de Müller....	13
1.2.2 Regressão dos ductos de Müller.....	17
1.2.2.1 Hormônio anti-Mülleriano (AMH).....	17
1.2.2.2 Ação do AMH nos tecidos.....	19
1.2.3 β -catenina/LEF-1 figuram como mediadores da ação do AMH.....	22
2.Objetivos.....	25
3. Materiais e métodos.....	27
3.1 Pacientes.....	28
3.2 Amostras de sangue	33
3.3 Extração do DNA	33
3.3.1 Extração do DNA de leucócitos periféricos (genômico).....	33
3.3.2 Separação de leucócitos do sangue total.....	34
3.4 Quantificação do DNA.....	35
3.5 Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	36
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	38
3.7 Coloração pela prata.....	39
3.8 Purificação dos produtos de PCR.....	40

3.9 Sequenciamento automático.....	41
4. Resultados.....	43
4.1 Estudo do gene <i>WNT4</i>	44
4.2 Estudo do gene <i>CTNNB1</i>	46
5. Discussão.....	47
6. Conclusões.....	56
7. Referências bibliográficas.....	58
8. Anexos.....	70
Anexo A.....	71
Anexo B.....	72
Anexo C.....	73
Anexo D.....	74
Anexo E.....	75
Anexo F.....	76
Anexo G.....	77
Anexo H.....	78
Anexo I.....	80
Anexo J.....	81
Anexo L.....	82

1-INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (SMRKH) (MIM #277000) é um distúrbio de diferenciação sexual que acomete cerca de 1 em cada 5000 mulheres nascidas vivas (Hughes, 2004). A SMRKH se caracteriza por amenorréia primária e malformações do trato genital interno em mulheres com função ovariana normal e características sexuais secundárias bem desenvolvidas.

O trato genital interno feminino pode apresentar diferentes graus de acometimento, compreendendo desde atresia do terço superior da vagina até completa agenesia das tubas uterinas, útero e terço superior da vagina. Malformações renais, esqueléticas e auditivas também podem estar presentes (Griffin, 1976).

O trato genital interno feminino se origina a partir da diferenciação dos ductos de Müller, ductos primordiais presentes na crista urogenital em ambos os sexos. A partir da oitava semana de gestação, ocorre a diferenciação dos ductos de Müller no sexo feminino, enquanto, no sexo masculino, sob a ação do hormônio anti-Mülleriano (AMH), há regressão completa dos mesmos.

Nas pacientes portadoras da SMRKH, algum fator ainda desconhecido interfere nesse processo tão crucial, seja inibindo a formação e/ou correta diferenciação dos ductos de Müller ou determinando a regressão anômala dos mesmos (Mello, 2005).

Para melhor compreendermos os processos patológicos que possam estar presentes na SMRKH, detalharemos os mecanismos moleculares envolvidos na determinação e diferenciação sexual, enfatizando os genes envolvidos na formação dos genitais internos do sexo feminino.

1.1-Determinação sexual

A determinação sexual depende da combinação cromossômica do embrião. Formam-se testículos, na presença do cromossomo Y (46,XY), ou ovários, na ausência de um cromossomo Y e presença de um segundo cromossomo X (46,XX) (MacLaughlin, 2004).

A identificação do gene *SRY* (*Sex-determining Region on the Y chromosome* – fator determinante testicular), localizado no braço curto de cromossomo Y (Page, 1987), permitiu aguçar nossa compreensão sobre os mecanismos envolvidos no processo de determinação sexual. Acredita-se que a função da proteína SRY seja regular a expressão de vários outros genes envolvidos na diferenciação testicular, resultando na produção de testosterona pelas células de Leydig e de AMH pelas células de Sertoli, hormônios cruciais para a determinação do fenótipo masculino (Mello, 2005).

Em seres humanos, a expressão do *SRY* se inicia na sexta semana de gestação, coincidindo com a diferenciação das gônadas primordiais em testículos. Em camundongos, sua expressão na gônada XY se inicia por volta do décimo dia embrionário (E 10.5-E 11), quando as glândulas bi-potencias são ainda morfologicamente indistinguíveis.

A produção de camundongos transgênicos 46,XX que desenvolveram fenótipo masculino pela introdução do gene *Sry* no seu genótipo (Koopman 1991) e a detecção do gene *SRY* em 80% dos casos de Homem XX (MIM 278850) (Abbas,1990) comprovam o papel biológico da proteína SRY na determinação testicular. No entanto, a não detecção da proteína SRY no restante dos casos de Homem XX indica que outros genes, que não o *SRY*, autossômicos e/ou ligados ao X, têm participação efetiva na determinação sexual e fazem parte de um mecanismo muito mais complexo do que antes se supunha.

No tocante ao desenvolvimento sexual feminino, o antigo conceito de que este seria consequente à simples ausência do *SRY*, ou seja, o desenvolvimento da “falta”, tem sido rebatido. Inúmeras evidências indicam que a diferenciação das gônadas bi-potenciais em ovários seja um processo extremamente ativo e dependente da interação de vários fatores, entre esses o *SRY* (Hughes, 2004), como veremos a seguir.

1.1.1- Formação da gônada bi-potencial

A maior parte de nossos conhecimentos sobre a formação da gônada bi-potencial resulta de estudos em camundongos. Nesses mamíferos, a gônada bi-potencial se origina a partir da crista urogenital, que, por sua vez, se origina da superfície do mesonéfron no décimo dia embrionário (E 10). O mesonéfron origina-se do mesoderma intermediário, presente na região dorsal da cavidade celômica. Vários fatores de transcrição estão envolvidos nesse processo, tais como *Emx-2*, *Wt1*, *Lhx-9*, *Sf-1* e *Gata-4*, sendo que a deleção dos seus respectivos genes resulta na degeneração das gônadas, em ambos os sexos (Yao, 2005) (Figura 1).

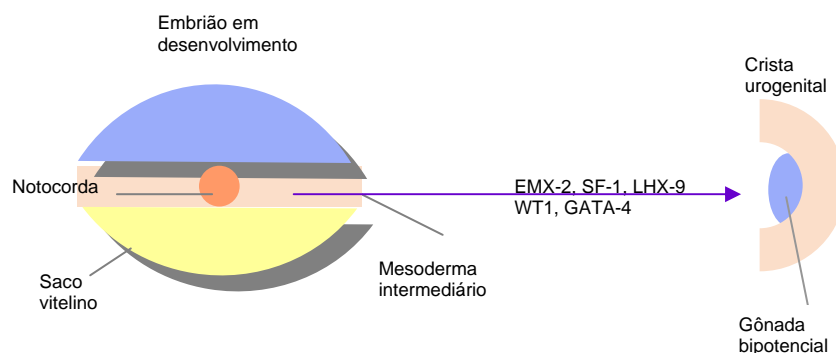


Figura 1: Origem das gônadas bi-potenciais: Desenho esquemático demonstrando origem mesodérmica das gônadas bi-potencias, dependente de vários fatores de transcrição. Adaptada de Maclaughlin, 2004

1.1.2 Importância das células germinativas

As células germinativas primordiais, inicialmente detectadas no epiblasto proximal, migram até a crista urogenital, onde se formará a gônada bi-potencial (MacLaughlin, 2004). Essa migração é dependente da interação de diversos fatores de transcrição. A inibição da expressão dos genes *Fragilis* e *Stella* resulta na ausência de células germinativas na crista urogenital. *Bmp4* (*bone morphogenic protein-4*) é responsável pela indução da expressão de *Fragilis* e *Stella*, integrando também a lista dos genes envolvidos neste complexo processo (figura 2). Somente as células germinativas que alcançam a crista genital sobrevivem; as demais sofrem apoptose, exceto em raras exceções, podendo, no futuro, formar tumores de células germinativas (MacLaughlin, 2004).

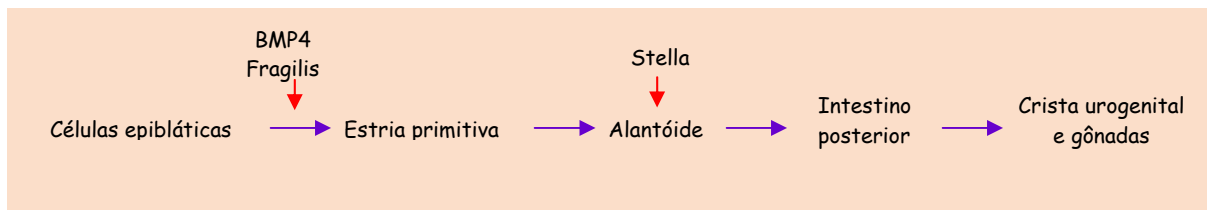


Figura 2: Migração das células germinativas durante a embriogênese. Adaptada de MacLaughlin, 2004

O desenvolvimento sexual dimórfico, ou seja, diferente no sexo masculino e feminino, se inicia logo após a formação da gônada bi-potencial. A principal diferença entre as organizações testicular e ovariana é o envolvimento das células germinativas. O desenvolvimento testicular progride normalmente na ausência das células germinativas; em contraste, na gônada XX, os folículos ovarianos não se formam na ausência das mesmas, evidenciando o seu papel crítico na organização e manutenção da arquitetura ovariana (Yao, 2005).

O início da meiose das células germinativas nos dois sexos ocorre em diferentes etapas e esta divergência parece ser de extrema importância para o desenvolvimento sexual dimórfico. As células germinativas femininas iniciam a meiose ainda durante a embriogênese, em E 13.5. Já as células germinativas masculinas somente iniciam a meiose após o nascimento (Koubova, 2006).

Estudos recentes indicam que a expressão de *Stra 8* (*Stimulated by Retinoic Acid Gene 8*) pelas células germinativas é essencial para a iniciação da meiose em ambos os sexos. A expressão de *Stra 8*, estimulada pelo ácido retinóico, é observada nos ovários embrionários em E 12.5, precedendo em 1 dia o início da meiose. Ao contrário, a expressão de *Stra 8* não é detectada nos testículos embrionários, e só o será nas células germinativas no período pós-natal. Especula-se que *Sry* estimule indiretamente a expressão de *Cyp26b1*, enzima responsável pela degradação do ácido retinóico, nas células somáticas próximas aos cordões testiculares em formação, inibindo assim a expressão de *Stra 8*, e conseqüentemente, o início da meiose durante a embriogênese nas gônadas XY (Koubova, 2006) (figura 3).

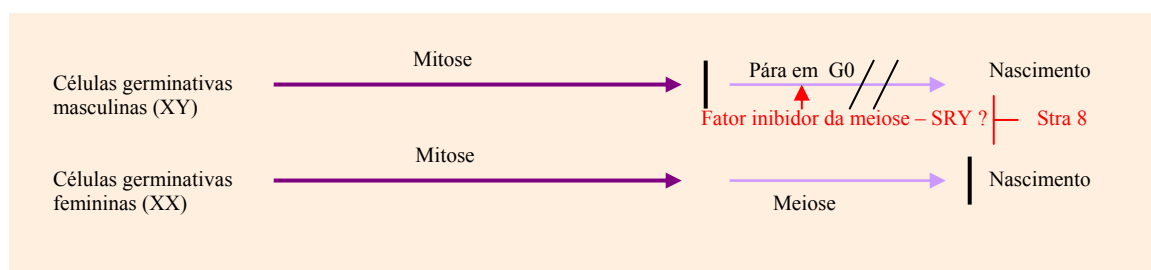


Figura 3: Padrão sexual dimórfico do desenvolvimento das células germinativas. No sexo masculino, as células germinativas só iniciam a meiose após o nascimento. *Sry* atua através da inibição de *stra 8*, inibindo assim o início da meiose. No sexo feminino, a meiose se inicia no período embrionário, sendo essencial para a correta diferenciação da estrutura ovariana. Adaptada de MacLaughlin, 2004

1.1.3 Fatores somáticos envolvidos na gênese ovariana – gene *WNT4*

Até recentemente, acreditava-se que as células somáticas das gônadas XX não eram importantes para o desenvolvimento inicial dos ovários. Com a expansão dos estudos na área, foram identificados vários genes autossômicos envolvidos na determinação sexual com destaque especial para o gene *WNT4* (*Wingless-type MMTV integration site family, member 4*) (Mello, 2005; Mittwoch, 2005).

O *WNT4* pertence à família WNT de fatores de sinalização. A família dos genes WNT codifica um grande grupo de glicoproteínas altamente conservadas, que apresentam ação crucial em processos de desenvolvimento embrionário (Logan, 2004).

Para exercer sua função, esses fatores de sinalização devem se ligar ao domínio extracelular rico em cisteína dos receptores *frizzled* (FZ), que constituem uma grande família de receptores transmembrânicos, associados à proteína G (Logan, 2004).

Os fatores de sinalização WNTs podem regular os eventos celulares por diferentes vias. A via canônica, principal via envolvida na determinação sexual e a mais bem estudada, envolve a regulação da β -catenina (figura 4). As vias não canônicas incluem as vias Wnt/ Ca^{+} e Wnt/ras que afetam primariamente o citoesqueleto de actina e a polaridade planar celular (processo em que as células se desenvolvem com orientação uniforme dentro do plano de um epitélio) (Hou, 2004).

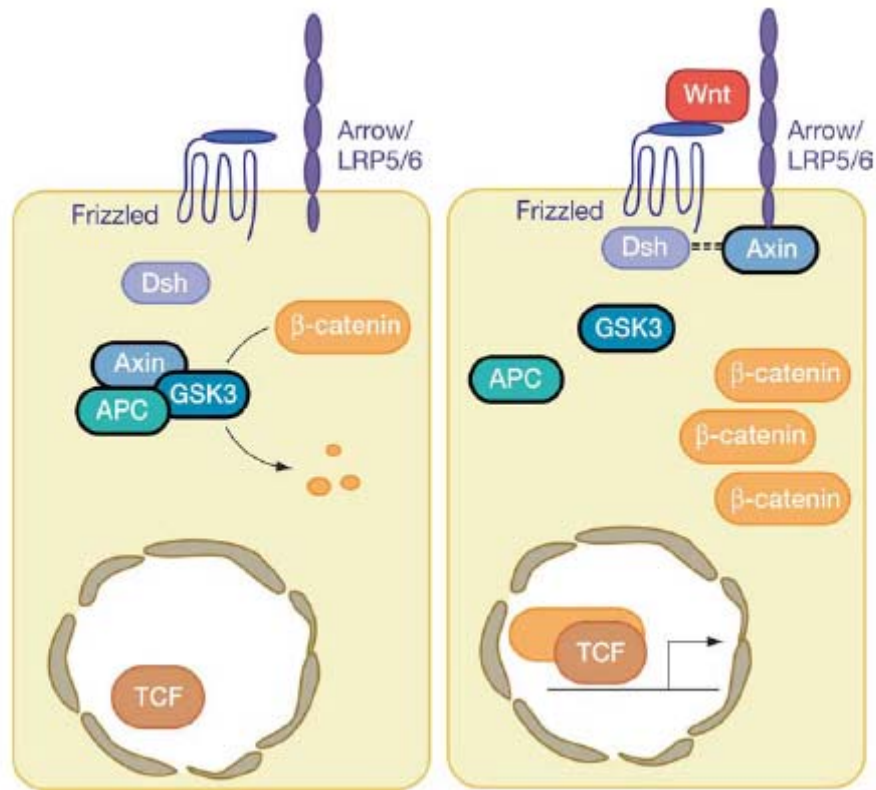


Figura 4: Via canônica da sinalização dos WNTs. Em células não expostas aos WNTs (*esquerda*), o complexo GSK-3 β /APC/Axina fosforila a β -catenina, estimulando sua degradação. As proteínas WNTs (*direita*), ao se ligarem aos receptores de membrana FZ/ LRP (complexo *Frizzled/ Low Density Lipoprotein (LDL)-receptor related protein*), transmitem o sinal para proteínas citoplasmáticas, Axina e Dsh, que provavelmente interagem diretamente, desestabilizando o complexo GSK-3 β /APC/Axina, inibindo sua atividade serina-treonina quinase, determinando um acúmulo de β -catenina no citoplasma. Conseqüentemente, há translocação da β -catenina para o núcleo, formando complexos com fatores de transcrição, tais como LEF/TCF, estimulando a transcrição de genes alvo. Adaptada de Logan, 2004

O gene WNT4 é composto por cinco exons, e está localizado no braço curto do cromossomo um (1p31-1p35) (figura 5). A duplicação dessa região está associada com reversão sexual XY em seres humanos, ou seja indivíduos XY com fenótipo feminino (Jordan, 2001). A hipótese mais aceita para explicar esse intrigante achado é que WNT4 ative a transcrição de *DAX-1 (Dosage-sensitive sex-reversal (DSS)-adrenal hypoplasia congênita (AHC) critical region on the X chromossome, gene 1)*, também conhecido como

fator antitesticular, cuja duplicação em seres humanos causa disgenesia gonadal e reversão sexual XY (MIM #300018) (Bardoni, 1994).

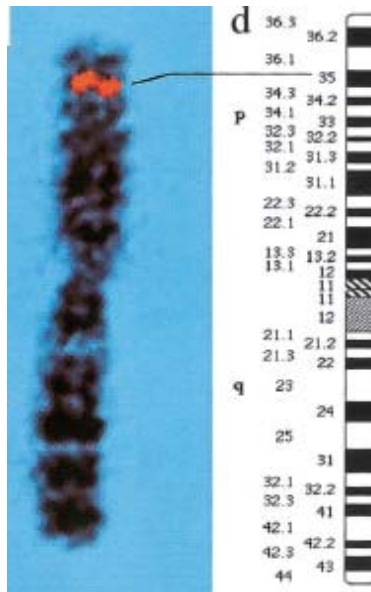


Figura 5: Gene *WNT4*: Marcação por FISH e figura esquemática com marcação por banda G – cromossomo 1. Adaptada de Jordan, 2001.

Consistente com essa hipótese, observou-se que, em camundongos, a ativação da via canônica pelo *Wnt4* permite a estabilização da β -catenina, que, por sua vez, através da sua heterodimerização com LEF/TCF, em sinergismo com Sf-1, ativa a região promotora de *Dax-1*. Observou-se ainda que a formação de heterodímeros entre *Dax-1* e Sf-1 reprimiria a expressão de genes determinantes testiculares, como *Sry* e *Sox-9* (Swain, 1998, Mizusaki, 2003).

A deleção de *Wnt-4* em camundongos resulta em agenesia renal e agenesia dos ductos de Müller em ambos os sexos. No sexo feminino, a deleção de *Wnt-4* determina

ainda produção ectópica de testosterona, persistência dos ductos de Wolff, e perda das células germinativas (Vainio, 1999).

Assim, a gonadogênese feminina parece depender não só da ausência de expressão de *SRY*, mas também da expressão de *WNT4* e *DAX-1* (Vainio, 1999; Menke, 2002). A molécula de sinalização WNT4 inibe o desenvolvimento do vaso celômico (marcador precoce do desenvolvimento testicular) nas gônadas femininas e preserva as células germinativas ovarianas em meiose (Yao, 2005), fundamentais para a manutenção da arquitetura ovariana. Além do seu papel crucial na determinação sexual feminina, a molécula de sinalização Wnt 4 é também essencial no processo de invaginação do epitélio celômico para a formação dos ductos de Müller.

Em 2004, mutação em heterozigose do gene *WNT4* foi descrita em uma paciente com fenótipo semelhante à SMRKH – amenorréia primária, características sexuais secundárias femininas bem desenvolvidas, agenesia uterina e vaginal, aplasia renal unilateral, cariótipo 46 XX – além de hiperandrogenismo clínico e laboratorial, e ovários ectópicos. Sequenciamento do DNA genômico dessa paciente revelou uma mutação “missense” (de sentido trocado) no exon cinco, determinando a troca do glutamato na posição 226 por uma glicina. O estudo funcional da mutação demonstrou alteração na modificação lipídica da proteína mutante com conseqüente prejuízo na sua secreção parácrina. Células transfectadas com a proteína mutante não apresentaram estabilização dos níveis de β -catenina, em contraposição às células selvagens, evidenciando o defeito na cascata de sinalização do *WNT4* (Biason-Lauber, 2004).

O achado dessa mutação em uma paciente com distúrbio da formação do trato genital interno feminino reforçou ainda mais o importante papel do gene *WNT4* na cascata de desenvolvimento sexual feminino, que pode ser representado pela figura 6:

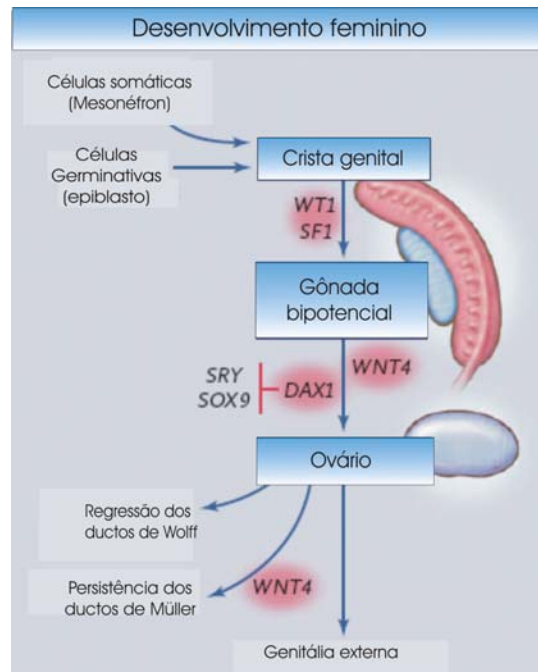


Figura 6: Papel do *WNT4* na determinação do sexo feminino. Após a formação da gônada bi-potencial, a ação sinérgica entre *DAX-1* (fator antitesticular) e *WNT4* (fator pró-ovariano) inibe a expressão de *SRY* e *SOX-9*, permitindo a correta diferenciação da gônada bi-potencial em ovários. O gene *WNT-4* é também essencial para a formação dos ductos de Muller. Adaptada de Hughes, 2004.

1. 2- Diferenciação sexual

Após a determinação sexual, ocorre a diferenciação sexual, ou seja, resposta tecidual aos hormônios produzidos pelas gônadas, ovários ou testículos. Curiosamente, os primórdios do trato genital feminino e masculino estão presentes em ambos os sexos. A teoria clássica da diferenciação sexual propõe que, no sexo masculino, após a determinação sexual, o testículo fetal secreta, entre outros hormônios, AMH, testosterona e fator de crescimento insulina símile tipo 3 (*InsI3*). A testosterona promove a diferenciação dos

ductos de Wolff em epidídimos, ductos deferentes e vesículas seminais, o AMH promove a regressão dos ductos de Müller e os três hormônios em conjunto contribuem para a descida testicular. No sexo feminino, na ausência destes hormônios, há degeneração dos ductos de Wolff e os ductos de Müller se diferenciam em tubas uterinas, útero, cérvix e terço superior da vagina (figura 7) (Kobayashi, 2003).

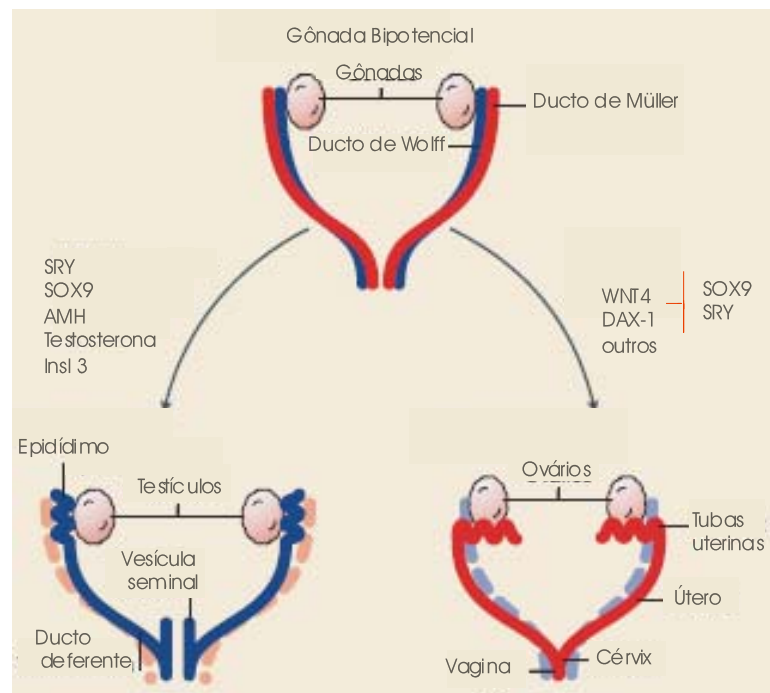


Figura 7: Determinação e diferenciação sexual dimórfica. Após a formação de testículos no sexo masculino, sob influência de SRY e SOX-9, a secreção de AMH, testosterona e Insl3 determinam conjuntamente a regressão dos ductos de Müller e diferenciação dos ductos de Wolff em genitália interna masculina. No sexo feminino, na ausência desses hormônios, ocorre exatamente o contrário – regressão dos ductos de Wolff e diferenciação dos ductos de Müller em genitália interna feminina. Adaptada de Kobayashi, 2003.

Novos conhecimentos sobre a diferenciação sexual no sexo feminino têm, no entanto, despertado críticas à teoria clássica. A diferenciação dos ductos de Müller no trato genital interno feminino é um processo complexo, que não depende apenas da ausência dos hormônios masculinos. A compreensão dos fatores envolvidos na formação da genitália interna feminina pode nos fornecer informações importantes na elucidação dos mecanismos patológicos envolvidos na SMRKH.

1.2.1 Biologia molecular da formação e diferenciação dos ductos de Müller

Os ductos de Müller se formam através de uma invaginação do epitélio celômico, lateralmente aos ductos mesonéfricos. Além do papel crucial do gene *Wnt4* nesse processo, vários outros genes que codificam fatores de transcrição e moléculas de sinalização como *Pax-2* (*paired-box-gene 2*), *Pax-8* (*paired-box-gene 8*), *Lhx-1* (*lim-homeobox protein-1*), *Emx-2* (*empty spiracles, drosophila 2, homolog of, gene*), *Ltap* (*loop tail associated protein*), *Hoxa* (*homeobox a*) 10, *Hoxa 11*, *Hoxa 13*, *Wnt5a*, *Wnt7* e genes dos receptores do ácido retinóico (*RAR α1*, *RXRα1*, *RARβ2* e *RARγ*) são importantes para a correta formação e diferenciação do trato reprodutor feminino em mamíferos – tabela 1 (Kobayashi, 2003). Em camundongos, deleções desses genes causam defeitos na formação do trato reprodutor feminino. Em seres humanos, mutações dos mesmos poderiam estar envolvidas na patogênese da SMRKH.

Tabela 1: Alterações fenotípicas do trato reprodutor feminino (TRF) relacionadas a deleções gênicas em camundongos

Gene	Localização	Fenótipo
<i>Pax 2</i>	Ch 19	Ausência do TRF
<i>Lhx1</i>	Ch 11	Ausência do TRF
<i>Emx2</i>	Ch 19	Ausência do TRF
<i>Wnt4</i>	Ch 4	Ausência do TRF
<i>Wnt5a</i>	Ch 14	Anormalidades das glândulas uterinas
<i>Wnt7a</i>	Ch 6	Transformação homeótica* das tubas em útero e útero em vagina
<i>Ltap</i>	Ch 1	Vagina em fundo cego
<i>Hoxa 10</i>	Ch 6	Transformação homeótica do útero anterior em tubas
<i>Hoxa 11</i>	Ch 6	Transformação homeótica parcial do útero anterior em tubas
<i>Hoxa 13</i>	Ch 6	Transformação homeótica da cérvix em útero
<i>RARα</i>	Ch 11	Ausência de TRF
<i>RARβ</i>	Ch 14	Ausência de TRF
<i>RXR</i>	Ch 2	Ausência de TRF

*Transformação homeótica: transformação de uma estrutura em outra adjacente.

Pax-2 é amplamente expresso nos tecidos mesenquimais e epiteliais do sistema urogenital e controla múltiplos processos durante seu desenvolvimento. *Pax-2* e *Pax-8* parecem atuar em conjunto na formação e desenvolvimento dos ductos de Müller. Camundongos nocautes para *Pax-2* não formam rins, ductos de Müller ou ductos de Wolff (Torres, 1995), enquanto camundongos nocautes para *Pax-8* desenvolvem normalmente o

trato reprodutivo e o sistema renal. O desenvolvimento dos ductos de Müller em duplos mutantes ainda não foi estudado.

Lhx-1 parece ser essencial para a formação do epitélio dos ductos de Müller. A expressão de *Lhx-1* é detectada nas células precursoras dos ductos de Müller, na porção anterior do mesonéfron. Camundongos do sexo feminino nocautes para *Lhx-1* não desenvolvem as tubas uterinas, útero e terço superior da vagina, enquanto os machos não desenvolvem os ductos de Wolff. *Lhx-1* mantém estreita ligação com *Wnt-4*. Camundongos nocautes para *Wnt-4* expressam *Lhx-1* nas células precursoras dos ductos de Müller, no entanto, na ausência do estímulo pelo *Wnt-4*, estas células não são capazes de invaginar para a formação dos mesmos. *Lhx-1* também é importante para o desenvolvimento cerebral anterior e, na grande maioria das vezes, sua deleção é incompatível com vida por falência na fusão córion-alantóide, impossibilitando conexão materno-fetal (Kobayashi, 2004).

Emx-2 é expresso nos componentes epiteliais do sistema urogenital, além de ser essencial para o desenvolvimento do telencéfalo dorsal. A deleção de *Emx-2* determina agenesia do trato reprodutivo, gônadas e rins em ambos os sexos, fenótipo incompatível com a vida (Miyamoto, 1997). Nesses animais a expressão de *Pax-2* e *Lim-1* no mesênquima metanéfrico está significativamente reduzida e a expressão de *Wnt-4* não é detectável. Como vimos anteriormente, o gene *Wnt-4* é essencial para a invaginação do epitélio celômico, passo inicial na formação dos ductos de Müller.

O gene *Ltap* codifica a proteína Ltap (ou Vangl2), essencial na via de polarização planar celular, (Montcouquiol, 2003). Camundongos do sexo feminino, mutantes para *Ltap*, apresentam imperfuração da vagina. É provável que *Ltap* atue através da modulação da sinalização da via Wnt (Kobayashi, 2003).

Os receptores do ácido retinóico são importantes para diversas etapas do desenvolvimento embriológico de diferentes órgãos e tecidos (Mendelsohn, 1994). A deleção isolada de um único receptor do ácido retinóico parece não afetar a diferenciação dos ductos de Müller, enquanto deleções combinadas podem determinar desde defeitos parciais até completa agenesia do trato genital feminino. Duplos mutantes *RAR α /RAR β 2* e *RXR α /RAR α* apresentam agenesia bilateral completa dos derivados mullerianos, enquanto a combinação da deleção de *RXR α* com a inativação de qualquer outro RAR determina defeitos no desenvolvimento da porção caudal dos mesmos (Kastner, 1997).

Genes *Hox* (*homeobox*) também têm um papel bem definido no desenvolvimento embrionário: eles determinam a identidade no eixo corporal antero-posterior, sendo fundamentais na correta segmentação do organismo (Daftary, 2006). *Hoxa-13* é expresso na cérvix uterina e no terço superior da vagina e parece ser importante para a formação dos ductos de Müller em ambos os sexos. Camundongos do sexo feminino nocautes para *Hoxa-13* não desenvolvem a porção distal do trato genital. O gene *Wnt-5a* interage com outros genes *Hox* (*Hoxa 10 e 11*) e juntos participam também da correta diferenciação segmentar dos ductos de Müller. Mutações no gene *Hoxa10*, por exemplo, causam transformação homeótica anterior no trato genital, ou seja, a porção anterior do útero se transforma na porção mais anterior das tubas uterinas nas fêmeas (Benson, 1996). O gene *Wnt5-a* é necessário para as interações epitélio-mesenquimais uterinas, tendo sua fundamental importância na estimulação do crescimento do trato reprodutivo feminino após o nascimento, na formação das glândulas uterinas e modulando sua resposta ao estímulo estrogênico (Mericskay, 2004).

Os ductos de Müller em formação expressam ainda outro membro da família WNT, o *Wnt7-a*, essencial para a correta diferenciação dos mesmos. A deleção de *Wnt7-a* em

camundongos do sexo feminino determina infertilidade por desenvolvimento anômalo de tubas uterinas e útero, enquanto a deleção no sexo masculino determina persistência dos ductos de Müller, uma vez que na ausência de *Wnt7-a* não há expressão do receptor tipo 2 do hormônio anti-Mülleriano (AMHRII) (Parr, 1998).

Constatamos, portanto, que a formação e a diferenciação dos ductos de Müller são processos complexos, dependentes da interação de diversos fatores coordenados; perda e/ou prejuízo de função de um ou mais desses poderiam estar associados com o fenótipo observado nas pacientes portadoras da SMRKH.

Como alternativa a um defeito de formação e/ou diferenciação dos ductos de Müller para explicar as alterações presentes na SMRKH, especula-se sobre a hipótese de que esses se formariam corretamente, mas sofreriam regressão, como ocorre no sexo masculino, por algum defeito no controle dos fatores envolvidos nesse processo. Detalharemos abaixo o processo normal de regressão dos ductos de Müller, a fim de identificarmos os principais mecanismos moleculares que poderiam sofrer alterações nas pacientes portadoras da SMRKH, determinando disgenesia do trato genital feminino.

1.2.2 Regressão dos ductos de Müller

1.2.2.1 Hormônio anti-Mülleriano (AMH)

A regressão dos ductos de Müller no embrião do sexo masculino é um efeito inequívoco do hormônio anti-mulleriano (AMH), uma glicoproteína secretada pelas células de Sertoli (Allard, 2000).

A presença de uma substância com propriedades anti-Müllerianas foi sugerida pela primeira vez por um pioneiro cientista francês, Alfred Jost (1973). Ele comparou a diferenciação sexual em fetos castrados submetidos a transplante com tecido testicular ou

implante de propionato de testosterona. Ele observou que no primeiro grupo houve diferenciação dos ductos de Wolff no trato genital masculino e regressão dos ductos de Müller. No entanto, no grupo que recebeu apenas testosterona, os ductos de Müller se diferenciaram em trato genital feminino e os ductos de Wolff em trato genital masculino. Desta forma, Jost provou que um outro “produto” testicular diferente da testosterona era responsável pela regressão dos ductos de Müller nos fetos masculinos. Em 1978 foi elucidada a natureza glicoprotéica homodimérica do AMH e, em 1986, a sequência codificadora do AMH foi descrita (Rey, 2005).

Evidências robustas da importância da ação do AMH na regressão dos ductos de Müller advêm de estudos em animais: camundongos transgênicos do sexo feminino que hiperexpressam o gene *Amh* não desenvolvem tubas uterinas ou útero, indicando que as fêmeas possuem todo o aparato necessário para a regressão dos ductos de Müller, uma vez estimuladas pelo *Amh*. Por outro lado, camundongos do sexo masculino com deleção de *Amh* apresentam persistência dos ductos de Müller (Allard, 2000).

A janela de sensibilidade dos ductos de Müller ao AMH é transitória, ocorrendo entre E13.5 e 14.5 nos camundongos e entre a oitava e a nona semana de gestação nos seres humanos. Após esse período crítico, os ductos de Müller se tornam insensíveis ao AMH, ressaltando a importância de um estrito controle cronológico durante a embriogênese (Rey, 2005).

Curiosamente, o AMH também é produzido pelas células granulosas do ovário, homólogas às células de Sertoli testiculares, onde participa do controle do recrutamento do folículo primordial e na seleção do folículo dominante durante a ovulação (Visser, 2006). No entanto, esta produção só se inicia no período peri-natal, fora da janela de sensibilidade (Rajpert-De Meyts, 1999).

A expressão do AMH é ativada pela ligação de SOX-9 à sua região promotora. Vários outros fatores, como SF-1, GATA-4 e WT-1, são co-ativadores da transcrição de AMH, enquanto DAX-1, conhecido como fator antitesticular, induz sinal inibitório (Rey, 2005).

1.2.2.2 Ação do AMH nos tecidos.

O AMH é membro da família TGF- β (*Transforming growth factor β*) e sinaliza através do acoplamento de dois receptores com atividade serina/treonina quinase. Após a ligação do AMH ao seu receptor tipo 2 (tecido-específico), um receptor tipo 1 não específico (ALK 2,3 ou 6) é recrutado para que ocorra a transmissão do sinal (figura 8). Os receptores do tipo 1 também participam da cascata de sinalização das proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) e fosforilam R-smads (*receptor-regulated mothers against decapentaplegic related gene product*) 1,5 e 8 (Zhan, 2006).

Outras vias propostas de sinalização do AMH incluem a estimulação do acúmulo de β -catenina e sua associação com LEF-1, e a indução da ligação das subunidades do fator nuclear $\kappa\beta$ ao DNA (Josso, 2003).

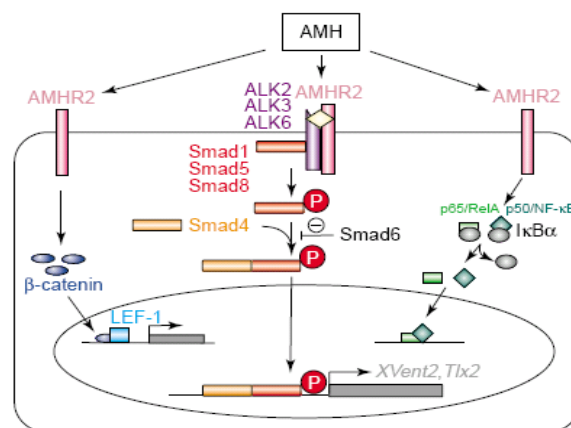


Figura 8: Vias de sinalização do AMH. A ligação do AMH ao receptor tipo 2 (AMHR2) determina a formação de um complexo entre este e um dos receptores do tipo 1 (ALK 2,3 e 6). A ativação do receptor tipo 1 leva à fosforilação das moléculas Smads 1,5 ou 8, que se ligam à Smad 4 e entram no núcleo para ativar genes específicos das vias Bmp como *Xvent2* e *Tlx2*. Vias de sinalização acessórias incluem a estabilização da β -catenina com consequente translocação nuclear e sua ligação à LEF-1, e a indução da atividade de NF κ B. Adaptada de Josso, 2003.

O padrão dimórfico de expressão do receptor tipo 2 do AMH (AMHR2) parece ser crucial para a regressão ou não dos ductos de Müller. A expressão do AMHR2 é detectada inicialmente no epitélio celômico em ambos os sexos. No sexo masculino, a presença do AMH induz a migração das células que expressam o AMHR2 do epitélio celômico para a mesênquima que circunda os ductos de Müller, enquanto no sexo feminino, na ausência do AMH, o padrão de expressão no epitélio celômico é mantido (figura 9). Essa transição epitélio-mesênquimal, AMH dependente, é de fundamental importância no processo de regressão dos ductos de Müller no sexo masculino (Zhan, 2006), ao passo que, a ausência da migração das células que expressam o AMHR2 para a mesênquima peri-ductal, no sexo feminino, em condições fisiológicas, impede a regressão dos mesmos.

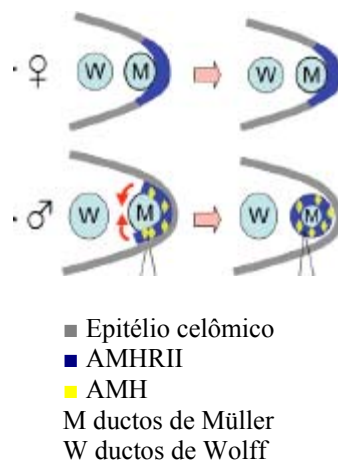


Figura 9: Ação do AMH na crista urogenital. No sexo masculino a ligação do AMH ao seu receptor estimula a migração das células que expressam o AMHR2 do epitélio celômico para a mesênquima peri-ductal, contribuindo para a regressão dos ductos de Müller. No sexo feminino, na ausência do AMH, estas células permanecem no epitélio celômico, não ocorrendo, portanto, a regressão dos ductos de Müller. Adaptada de Zhan, 2006.

A ligação do AMH aos seus receptores nas células mesenquimais determina apoptose das células epiteliais dos ductos de Müller por dois diferentes processos: (1) apoptose tipo 1, rápida fagocitose dos corpos apoptóticos pelas células vizinhas; (2) apoptose tipo 2, específica dos ductos de Müller no sexo masculino, caracterizada pela ruptura da membrana basal e entrada das células epiteliais no compartimento mesenquimal (transformação epitélio-mesenquimal), onde os corpos apoptóticos são fagocitados (Xavier, 2003). A regressão dos ductos de Müller segue um padrão crânio-caudal, concordante com a cronologia crânio-caudal da expressão do AMHRII.

O AMH não tem, portanto, efeito direto sobre as células epiteliais. A sua ação depende da interação epitélio-mesenquimal. Acredita-se portanto que o mesênquima que circunda os ductos de Müller produza um fator parácrino que determina a apoptose das células epiteliais ou reprima um fator necessário para a sobrevivência das mesmas. (Roberts, 2002).

A proteína MMP2 (*matrix metalloproteinase 2*) figura como provável candidata a esse papel (figura 10). MMP2 é secretada pelas células mesenquimais que circundam os ductos de Müller e apresenta em sua região promotora proximal e distal múltiplos sítios de ligação para as proteínas Smads, moléculas efetoras da sinalização AMH/Alk2.

MMP2 tem sua expressão estimulada nas cristas genitais masculinas durante a fase de regressão dos ductos de Müller. O mais interessante é que essa expressão co-localiza-se com a expressão do AMHRII, em forma de anel em torno do ducto em regressão. A perda da expressão de MMP2 em camundongos nocautes para AMH é mais uma evidência que *Mmp2* é um gene efetor candidato da cascata do AMH. O bloqueio da atividade da MMP2 com oligonucleotídeos “*anti-sense*” resultou no bloqueio parcial da regressão dos ductos de Müller. No entanto, camundongos nocaute para *Mmp2* tem desenvolvimento urogenital

normal, provavelmente indicando redundância funcional na família das metaloproteinases (Roberts, 2002).

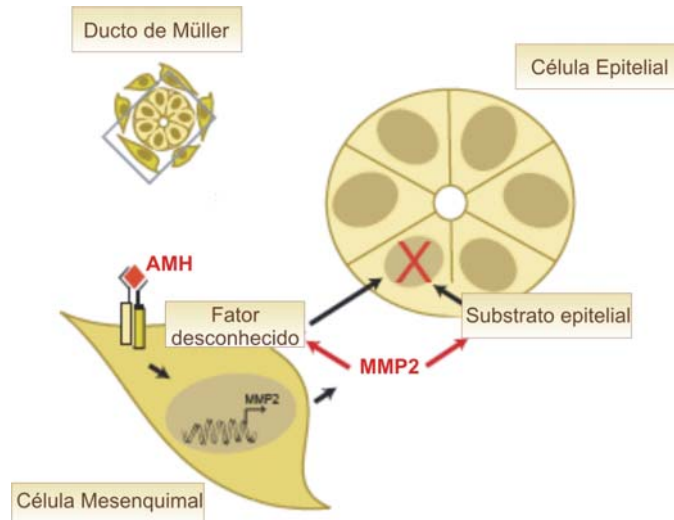


Fig 10: MMP2 como efetor da via AMH. Ativação da cascata de sinalização do AMH induziria a expressão de MMP2 no mesênquima peri-ductal. MMP2 ativaria ou inibiria outros fatores, determinando, em última instância, lise da membrana basal, e conseqüentemente, regressão dos ductos de Müller. Adaptada de Roberts, 2002.

1.2.3 β -catenina/LEF-1 figuram como mediadores da ação do AMH.

A estabilização da β -catenina pela via de sinalização do AMH também parece ser crucial para a regressão dos ductos de Müller. A ligação do AMH às células peri-ductais mesenquimais induz acúmulo citoplasmático e nuclear de β -catenina, seguindo padrão crânio-caudal, correlacionando-se com a expressão do AMHRII (Allard, 2000). A heterodimerização da β -catenina aos fatores de transcrição LEF/TCF, em sinergismo com Sf-1, é capaz de ativar diretamente a região promotora do AMHRII, induzindo a expressão deste receptor tão importante para a regressão dos ductos de Müller (Hossain, 2003).

Relevando ainda mais o papel da β -catenina como mediadora da ação do AMH na regressão dos ductos de Müller, Hossain (2003) demonstrou que a transfecção de células HeLa com β -catenina mutante (modificada em seus resíduos de fosforilação, impedindo, conseqüentemente, sua degradação pelo complexo GSK3 β /APC/Axina) potencializou, ainda mais, a ativação da região promotora do AMHRII.

Considerando a importância da β -catenina nas vias de sinalização WNT e AMH, e seu papel fundamental na regressão dos ductos de Muller, especula-se que mutações no gene *CTNNB1* poderiam estar associadas com distúrbios da formação dos ductos de Müller.

O gene *CTNNB1* é composto por 16 exons e está localizado no braço curto do cromossomo três (3p21.3) (figura 11).

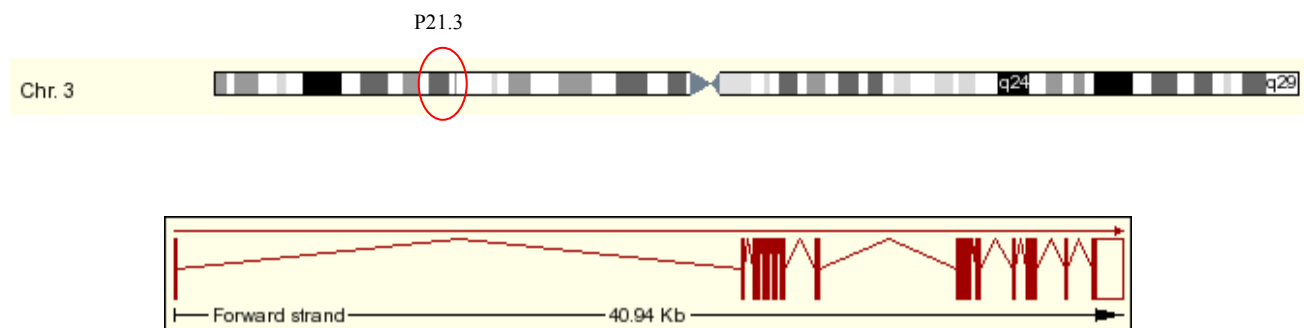


Figura 11: Localização e estrutura do gene *CTNNB1*

O exon três do gene *CTNNB1* codifica diversos resíduos serina/treonina que constituem sítios de fosforilação pela GSK3 β , importantes no processo de degradação da β -catenina. Mutações que determinam alterações nesses resíduos interrompem a maquinaria de fosforilação/ubiquinação da β -catenina, determinando sua estabilização no citoplasma, acúmulo nuclear e conseqüente ativação de promotores TCF/LEF (Kikuchi, 2003). Em

diferentes tipos de neoplasias – intestino, melanoma, ovários e próstata - foram detectadas mutações no exon 3 da β -catenina (Polakis, 2000), sendo considerado, portanto, uma região gênica de alta prevalência de mutações (*hotspot*).

No caso de pacientes portadoras da SMRKH, mutações nos resíduos de fosforilação da β -catenina poderiam elevar os seus níveis citoplasmáticos e nucleares no mesênquima peri-ductal, independente da presença do estímulo do AMH, contribuindo para regressão anômala dos ductos de Müller no sexo feminino, seja através da ativação constitutiva da região promotora do AMHRII, ativação de outros genes ainda desconhecidos ou ainda através de alterações na polaridade planar celular.

2- OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1- Frente às fortes evidências da importância do gene *WNT4* na determinação e diferenciação do sexo feminino, associadas ao achado de uma mutação em uma paciente com fenótipo semelhante à SMRKH, tivemos como objetivo:

- Investigar a presença de mutações no gene *WNT4* em pacientes portadoras da SMRKH, em nossa população, através da técnica de sequenciamento automático.

2- Considerando a importância da via de sinalização da β -catenina durante a determinação e diferenciação sexual feminina e a ausência de estudos sobre a β -catenina na SMRKH, decidimos:

- Investigar o exon 3 (*hotspot*) do gene *CTNNB1* em pacientes portadoras da SMRKH, em nossa população, através da técnica de sequenciamento automático.

4- RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Estudo do gene *WNT4*

Todos os 5 exons do gene *WNT4* das 6 pacientes estudadas foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico. Os produtos amplificados, utilizando-se os iniciadores específicos, corresponderam aos fragmentos esperados, visualizados no gel de poli-acrilamida. Os controles negativos de todas as reações não mostraram amplificação, excluindo a possibilidade de contaminantes na reação (Figura 12).

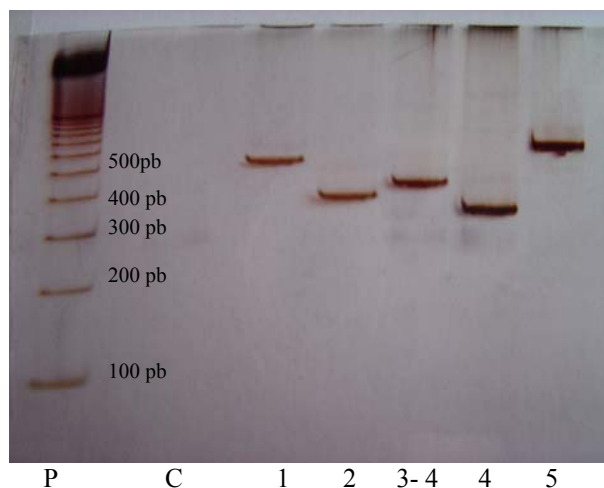


Figura 12: PAGE - gene *WNT4*

P:padrão; C:controle; 1, 2, 3-4,4 e 5:produtos de PCR dos respectivos exons (paciente 1)

O sequenciamento dos produtos, após purificação, não demonstrou alterações nas regiões codificadoras ou nos sítios de clivagem nos 5 exons das 6 pacientes estudadas (figura 13), em concordância com o sequenciamento de amostras-controle (figura 14).

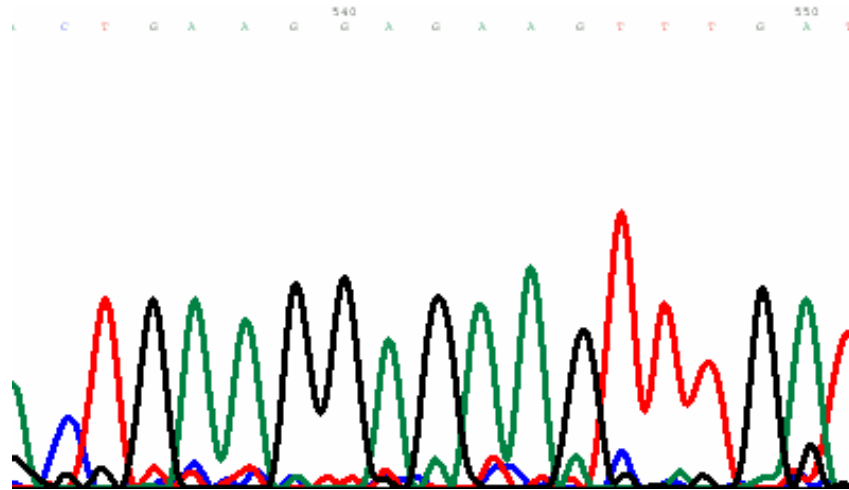


Figura 13- Segmento do cromatograma do Gene *WNT4* (exon 5 – paciente 3)
Sequência evidenciando ausência de mutações.

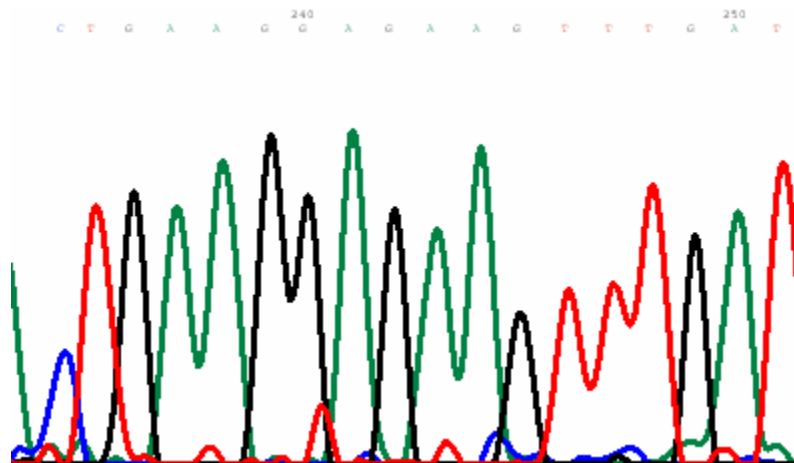


Figura 14- Segmento do cromatograma do Gene *WNT4* (exon 5 – controle)

4.2 Estudo do gene *CTNNB1*

O seqüenciamento do exon 3 do gene *CTNNB1* a partir do DNA genômico das 6 pacientes estudadas não evidenciou nenhuma mutação na região crítica de fosforilação serina-treonina (figuras 15 e 16).

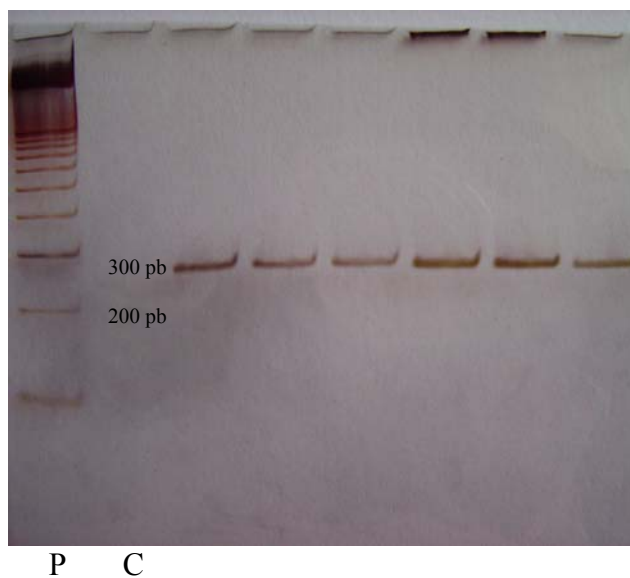


Figura 15 : PAGE- exon 3 do gene *CTNNB1* (amostras das 6 pacientes)
P: padrão; C: controle

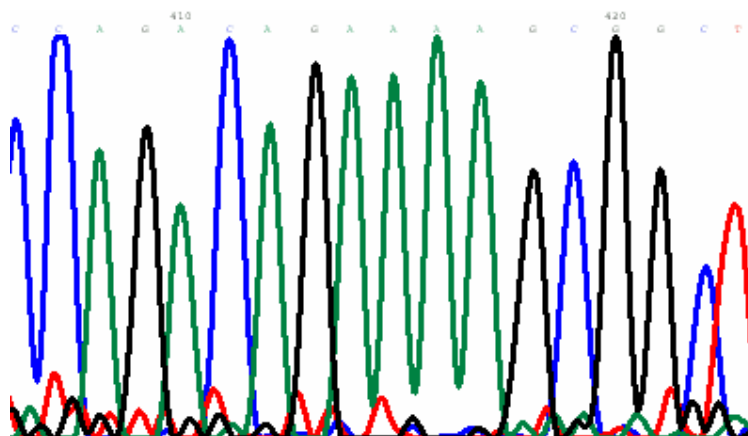


Figura 16: Segmento do cromatograma do exon 3 do gene *CTNNB1* (paciente 2)
Seqüência evidenciando ausência de mutações.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento sexual em mamíferos, especialmente no sexo feminino, ainda não foram completamente elucidados. Evidências robustas sugerem, no entanto, que o gene *WNT4* apresente papel crucial na determinação e diferenciação do sexo feminino, através da preservação da arquitetura ovariana e da formação dos ductos de Müller, respectivamente. A Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (SMRKH) é um distúrbio de diferenciação sexual comum em nosso meio, cuja etiologia ainda é desconhecida. O achado de uma mutação em uma única paciente com fenótipo semelhante à SMRKH motivou o estudo desse gene em outras pacientes portadoras da síndrome (Biason-Lauber, 2004).

Clément-Ziza e colaboradores estudaram um grupo heterogêneo de 19 pacientes com a SMRKH. Dessas pacientes, 11 apresentavam a forma típica (anomalias uterinas simétricas), enquanto 6 apresentavam útero assimétrico e anomalias renais associadas. Sete pacientes representavam casos familiares e pertenciam a 3 diferentes famílias. O sequenciamento direto das regiões codificadoras do gene *WNT4* dessas pacientes não evidenciou nenhuma mutação (Clément-Ziza, 2005).

Cheroki e colaboradores estudaram 25 pacientes com a SMRKH através da técnica de SSCP (polimorfismo conformacional de fita única) e não detectaram alterações no gene *WNT4*. Esse estudo incluiu pacientes com anomalias vertebrais (7/25), outras anomalias esqueléticas (6/25), anomalias renais (10/25), anomalias cardíacas (2/25) e déficits auditivos (2/25) (Cheroki, 2006).

A constatação de resultados divergentes na literatura nos motivou a estudar a região codificadora do gene *WNT4* em nossa população. Alterações nesse gene não foram

encontradas em nossa casuística de pacientes portadoras da SMRKH, em concordância com os demais estudos publicados que avaliaram uma amostra significativa de pacientes.

A paciente descrita por Biason-Lauber (2004), na qual foi encontrada a mutação em heterozigose no exon 5 do gene *WNT-4*, apresentava, além de fenótipo similar à SMRKH (amenorréia primária, cariótipo 46,XX, agenesia de útero e vagina, e aplasia renal unilateral), sinais clínicos e laboratoriais de hiperandrogenismo (acne, níveis séricos elevados de testosterona, androstenediona e SDHEA) e ovários ectópicos. Como o gene *WNT4* é também essencial para a supressão da diferenciação dos precursores das células de Leydig no ovário fetal (Vainio, 1999), sua perda de função determina a ativação ectópica da síntese de andrógenos, levando, em última instância, a um quadro de virilização, como pôde ser observado na paciente em questão. O estudo funcional da mutação observada nessa paciente, realizado em células ovarianas de adenocarcinoma transfectadas com a proteína mutante, revelou aumento significativo da expressão de enzimas esteroidogênicas, determinando aumento de 3 a 6 vezes nos níveis de progesterona, 17-hidroxiprogesterona, androstenediona e testosterona, quando comparados às células selvagens (Biason-Lauber, 2004).

Em relação à ausência dos derivados dos ductos de Müller observada nessa paciente, existem duas teorias que visam justificá-la: 1) produção ectópica de AMH pelos ovários fetais “masculinizados”, determinando regressão anômala dos ductos de Müller, e 2) ausência da invaginação e, conseqüentemente, da formação dos ductos de Müller pela perda de função do gene *WNT4*.

A primeira hipótese baseia-se no conceito que a ativação da via *WNT4* nos ovários fetais inibe a expressão de *SRY*, inibindo, conseqüentemente, a expressão de *AMH*. A perda de função do gene *WNT4* determinaria, em última instância a hiperexpressão de *AMH*. O

estudo da expressão do *AMH* no sangue e tecido ovariano de pacientes portadoras de mutações do gene *WNT4* poderia nos auxiliar na compreensão desse processo. Acreditamos, no entanto, que, apesar de uma provável hiperexpressão do *AMH* nos ovários dessas pacientes, a ausência da formação dos ductos de Müller seja o principal mecanismo envolvido, uma vez que estudos em camundongos nocautes para o gene *Wnt4*, em diferentes estágios da embriogênese, revelam que, tanto no sexo masculino, como no feminino, esses ductos nunca chegam a se formar (Vainio, 1999).

Recentemente, Biason-Lauber (2007) detectou uma nova mutação com perda de função, dominante negativa, (R83C), no gene *WNT-4* em outra paciente com agenesia uterina e hiperandrogenismo clínico e laboratorial. Esses achados, somados à constatação da ausência de mutações no gene *WNT4* em pacientes portadoras da SMRKH sem hiperandrogenismo, sugerem que o fenótipo associado à mutação do gene *WNT4* seja uma entidade clínica distinta da SMRKH e que o estudo do mesmo seja reservado àquelas pacientes com hiperandrogenismo associado.

Apesar do *WNT4* ter sido excluído como uma causa importante da SMRKH, outras moléculas envolvidas na via de sinalização dos WNTs são potenciais candidatos. A β -catenina, por sua importância fundamental na via canônica de sinalização dos WNTs, assim como por sua participação em via acessória de sinalização do AMH, e em particular, durante a regressão dos ductos de Müller, mereceu nossa atenção especial entre os vários candidatos. O estudo do exon 3 do gene *CTNNB1*, região gênica de alta prevalência de mutações (*hotspot*), responsável pela codificação dos sítios de fosforilação da β -catenina, e conseqüentemente, regulação dos níveis celulares e nucleares desta proteína, também não revelou alterações genéticas em nossa casuística. Como os demais 15 exons do gene *CTNNB1* não foram estudados, não podemos afirmar que mutações nesse gene estejam

definitivamente excluídas como causadoras da SMRKH, apesar de acreditarmos que a possibilidade de mutações nos demais exons do gene *CTNNB1* seja ínfima.

Outros genes que codificam componentes importantes da via de sinalização WNT, como as enzimas responsáveis pela modificação lipídica dos WNTs, os proteoglicanos HSPGs, importantes para o transporte e estabilização dos WNTs, e a proteína *dishevelled* (Dsh), envolvida na recepção do sinal pós-receptor (Logan, 2004), poderiam estar envolvidos na patogênese da SMRKH e representam alternativas para novos estudos.

Da mesma forma, a inibição da via WNT4 por outros fatores poderia resultar em um fenótipo semelhante à mutação com perda de função do gene. Acredita-se que a via de sinalização WNT possa ser inibida por membros da família SFRP (*secreted frizzled-related protein*). Essas proteínas possuem similaridade com o domínio de ligação dos receptores WNT do tipo *frizzled* e inibiriam a ligação dos WNTs ao receptor de membrana celular (Logan, 2004). O fator inibidor dos WNTs (WIF) e as proteínas *Dickkopf* (Dkks) também atuam como antagonistas da via. As últimas são consideradas potentes inibidores da via por formarem complexos com as LRPs, provocando sua internalização e inviabilizando sua interação com os receptores *frizzled*. A hiperexpressão de SFRPs, WIF ou Dkks poderia determinar fenótipo similar à deleção dos WNTs.

Os nossos conhecimentos sobre os mecanismos de regulação de expressão dos genes da família WNT ainda são escassos, especialmente dos membros da classe Wnt 5a (Wnt 5a, Wnt 4, Wnt 11). Os genes *Pax-2* e *Emx-2* codificam fatores de transcrição que figuram como possíveis elementos reguladores desse processo (Tian, 2005). O gene *PAX-2* foi estudado em um grupo de 25 pacientes portadoras da SMRKH e não foram encontradas mutações (Van Lingen, 1998).

A busca pelo gene responsável pela SMRKH tem sido intensa. Vários genes envolvidos em diferentes etapas da diferenciação dos ductos de Müller foram estudados em diversas pacientes portadoras da SMRKH. Mutações nos genes *WT1* (Van Lingen, 1998), *WNT 7A* (Timmreck, 2003), *HOXA 7, 9, 10, 11, 13*, *PBX1* (co-fator dos genes HOX) (Burel, 2006), e nos receptores do ácido retinóico *RAR-γ* e *RXR-α* (Cheroki, 2006) foram excluídas como fatores determinantes da SMRKH. Acrescendo a lista dos estudos negativos em busca do defeito genético em pacientes portadoras da SMRKH, o polimorfismo N314D do gene *GALT*, que supostamente determinaria alterações no metabolismo da galactose acarretando anormalidades vaginais, também foi excluído (Klipstein, 2003; Zenteno 2004).

Outra hipótese para justificar a ausência dos derivados de Müller em pacientes portadoras da SMRKH seria a ativação anômala da via AMH, através de mutações ativadoras nos genes *AMH* e *AMHRII*. Na síndrome da persistência dos ductos de Müller (MIM#261550), que acomete indivíduos XY, a presença de mutações inativadoras do AMH ou do seu receptor do tipo 2 é encontrada em cerca de 50% dos pacientes (Maclaughin, 2004). Os genes *AMH* e *AMHRII* foram estudados em pacientes portadoras da SMRKH e não foram encontradas mutações em suas regiões codificadoras (Resendes 2001; Zenteno, 2004). O estudo da região promotora do *AMH* em pacientes portadoras da SMRKH não revelou alterações significativas em relação ao grupo controle, assim como a análise da expressão de AMH no sangue e no líquido peritoneal dessas pacientes mostrou-se comparável ao grupo controle (Oppelt, 2005).

Outras moléculas envolvidas na via de sinalização do AMH também constituem potenciais candidatos ao estudo em pacientes portadoras da SMRKH. A presença de mutações nos receptores tipo I do AMH já foi pesquisada. Os genes *ALK2*, *ALK3* e *ALK6*

(receptores AMH tipo 1) foram estudados e não apresentaram alterações em pacientes portadoras da SMRKH (Clement-Ziza, 2005).

As moléculas Smads, transdutoras do sinal do AMH após ativação dos seus receptores, ainda não foram estudadas. A adição de si (*small interfering*) RNA para neutralizar a ação de smad 8 em cristas genitais masculinas retardou a regressão dos ductos de Müller, enquanto a adição de siRNA para neutralizar a ação de smad 5 acelerou a regressão dos mesmos (Zhan, 2006). Dessa forma, mecanismos repressores de smad 5 ou indutores de smad 8 poderiam estar envolvidos na fisiopatologia da SMRKH.

Por fim, a possibilidade de mutações ativadoras do gene *MMP2* em pacientes portadoras da SMRKH não pode ser desprezada, uma vez que a hiperexpressão da *MMP2* acarretaria, em última instância, regressão anômala dos ductos de Müller, independente da ativação da via AMH. Paralelamente à ativação da *MMP2*, outros fatores ainda desconhecidos estão envolvidos nessa complexa interação epitélio-mesenquimal dos ductos de Müller em regressão e sua elucidação possibilitaria novas vertentes de estudo em pacientes com anomalias dos derivados mullerianos.

A SMRKH, quando associada a anomalias renais e displasia dos somitos cérvico-torácicos recebe o nome de MURCS (MIM 601086). À tríade clássica, podem associar-se ainda defeitos cardíacos e auditivos (Oppelt, 2006). A sobreposição entre as alterações esqueléticas e a SMRKH é de grande interesse e ressalta o papel fundamental do mesoderma na embriogênese como estrutura unificadora do tecido esquelético e urogenital. A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nas síndromes genéticas que se associam à SMRKH poderia nos fornecer “peças” importantes nesse complexo “quebra-cabeça”.

A síndrome de Klippel-Feil (KFS) (MIM%214300/%118100), caracterizada por defeitos na formação e segmentação das vértebras cervicais, de herança autossômica dominante ou recessiva, pode se associar à SMRKH. (Oppelt, 2006). Translocações cromossômicas envolvendo o braço longo do cromossoma 5 parecem estar implicadas na KFS (Goto, 2006).

A associação entre a SMRKH e a Síndrome de Holt-Oram (HOS) (MIM#142900) é conhecida (Fakih, 1987; Ulrich, 2004). A HOS, de herança monogênica, autossômica dominante, caracteriza-se por anomalias cardíacas e malformações esqueléticas. O gene da HOS está localizado no braço longo do cromossoma 12 e codifica o fator de transcrição TBX5 (Ulrich, 2004).

A síndrome TAR (*Trombocytopenia-absent-radius*) (MIM%274000), caracterizada por ausência bilateral do rádio e trombocitopenia, também se associa à SMRKH (Greenhalgh, 2002;Griesinger, 2005;Childs, 2005). A alteração genética responsável pela síndrome TAR ainda não foi identificada.

Recentemente foi descrita deleção de 4 Mb na região 22q11 em uma paciente com útero rudimentar, agenesia vaginal, caracteres sexuais secundários normais e cariótipo 46,XX. Além das características acima, a paciente apresentava déficit cognitivo – leve a moderada dificuldade de aprendizagem, anomalias crânio-faciais sugestivas do fenótipo 22q11 (face alongada, nariz proeminente, palato em ogiva, philtrum curto), mãos alongadas, escoliose lombar, e leve aumento do arco aórtico. Deleções nessa região cromossômica causam a síndrome de DiGeorge (MIM#188400) e a síndrome velocardiofacial (MIM#192430). A haploinsuficiência do fator de transcrição TBX1 parece ser o principal responsável pelas alterações cárdio-faciais encontradas nessas síndromes (Yagi, 2003), mas não há relato da sua associação com defeitos dos ductos de Müller.

O fenótipo da deleção 22q11 usualmente não se associa a malformações uterinas, no entanto, soma-se ao relato acima, a descrição prévia de feto do sexo feminino com agenesia de útero e tubas uterinas, anomalias renais e deleção submicroscópica de 22q11 (Devriendt, 1997).

O estudo do gene TBX5 em pacientes portadoras da SMRKH, assim como estudos de ligação envolvendo a região cromossômica 22q11 em famílias afetadas constituem também alternativas interessantes para a elucidação das bases moleculares da SMRKH.

Tendo em vista as diversas síndromes genéticas que se associam às anomalias do trato genital feminino e a multiplicidade de genes envolvidos na sua formação, acreditamos que anormalidades do desenvolvimento dos ductos de Müller possam representar um fenótipo secundário a alterações em diferentes genes, sendo provável que, vários genes, e não apenas um, estejam comprometidos na SMRKH.

Uma importante limitação do nosso estudo, assim como de vários outros que estudaram alterações moleculares em pacientes portadoras SMRKH, é a utilização do sangue periférico das pacientes adultas para os estudos genéticos. O ideal seria estudarmos a expressão gênica na crista genital dos indivíduos acometidos durante a embriogênese, visto que a interação entre os diversos fatores envolvidos na diferenciação sexual é extremamente dinâmica e dependente de condições temporais e espaciais.

Os estudos em animais de laboratório vêm preencher essa lacuna e têm gerado descobertas ímpares nesse campo. A manipulação de animais geneticamente modificados, associada à utilização de tecnologias de análise de expressão gênica em alta escala nas diferentes etapas do desenvolvimento sexual, certamente nos fornecerá informações animadoras em futuro próximo, que poderão, então, ser aplicadas em estudos em seres humanos.

6- CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Este trabalho possibilita-nos as seguintes conclusões:

1- Através da técnica de sequenciamento de DNA não observamos mutações nas regiões exônicas do gene *WNT4* em seis pacientes portadoras da síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (SMRKH). O estudo do gene *WNT4* em pacientes com anomalias do trato genital feminino deve se reservar àquelas com hiperandrogenismo associado.

2- Através da técnica de sequenciamento de DNA não observamos mutações no exon 3 – “hot spot” – do gene *CTNNB1* em seis pacientes portadoras da SMRKH. A presença de mutações no exon 3 do gene *CTNNB1* é uma causa improvável da SMRKH.

3- As bases moleculares da SMRKH permanecem obscuras. Outras moléculas envolvidas nas vias de sinalização WNT e/ou AMH assim como outros fatores de transcrição que participam da diferenciação dos ductos de Müller devem ser estudados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas NE, Toublanc JE, Boucekkine C, Toublanc M, Affara NA, Job JC, Fellous M. A possible common origin of “Y negative” human XX males and XX true hermaphrodites. *Hum Genet* 1990;84:356-360.

Allard S, Adin P, Gouédard L, di Clemente N, Josso N, Orgebin-Crist MC, Picard JY, Xavier F. Molecular mechanisms of hormone-mediated duct regression: involvement of beta-catenin. *Development* 2000;127:3349-3360.

Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ER, Fraccaro M, Zuffardi O, Camerino G. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 1994;7:497-501.

Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991;196:80-83.

Benson GV, Lim H, Paria BC, Satokata I, Dey SK, Maas RL. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* 1996;122:2687-2696.

Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle EJ. A WNT4 mutation associated with Mullerian-duct regression in a 46,XX woman. *N Engl J Med* 2004;351:792-798.

Biason-Lauber A, De Filippo G, Konrad D, Scarano G, Nazzaro A, Schoenle EJ. WNT4 deficiency - a clinical phenotype distinct from the classic Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a case report. *Hum Reprod* 2007;22:224-229.

Burel A, Mouchel T, Odent S, Tiker F, Knebelmann B, Pellerin I, Guerrier D. Role of HOXA7 to HOXA 13 and PBX1 genes in various forms of MRKH syndrome (congenital absence of uterus and vagina). *J Negat Results Biomed* 2006;5:4.

Cheroki C, Krepischi-Santos AC, Rosenberg C, Jehee FS, Mingroni-Netto RC, Pavanello Filho I, Zanforlin Filho S, Kim CA, Bagnoli VR, Mendonca BB, Szuhai K, Otto PA. Report of a del22q11 in a patient with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) anomaly and exclusion of WNT4, RAR-gamma and RXR-alpha as major genes determining MRKH anomaly in a study of 25 affected women. *Am J Med Genet A* 2006;140:1339-1342.

Childs AJ, Hall LL. Hot clues to the etiology of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome? *Fertil Steril* 2005;84:544-545.

Clement-Ziza M, Khen N, Gonzales J. Exclusion of WNT4 as a major gene in Rokitansky-Kuster-Hauser anomaly. *Am J Med Genet A* 2005;137:98-99.

Daftary GS, Taylor HS. Endocrine Regulation of Hox genes. *Endocr Rev* 2006;27:331-355.

Devriendt K, Moerman P, Van Schoubroeck D, Vandenberghe K, Fryns JP. Chromosome 22q11 deletion presenting as the Potter sequence. *J Med Genet* 1997;34:423-425.

Fakih MH, Williamson HO, Seymour EQ, Pai S. Concurrence of the Holt-Oram syndrome and the Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. A case report. *J Reprod Med* 1987;32:549-550.

Greenhalgh KL, Howell RT, Bottani A, Ancliff PJ, Brunner HG, Verschuuren-Bemelmans CC, Vernon E, Brown KW, Newbury-Ecob RA. Thrombocytopenia-absent radius syndrome: a clinical genetic study. *J Med Genet* 2002;39:876-888.

Griesinger G, Dafopoulos K, Schultze-Mosgau A, Schroder A, Felberbaum R, Diedrich K. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome associated with thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Fertil Steril* 2005;83:452-454.

Griffin JE, Edwards C, Madden JD, Harrod MJ, Wilson JD. Congenital absence of the vagina. The Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Ann Intern Med* 1976;85:224-236.

Goto M, Nishimura G, Nagai, T, Yamazawa K, Ogata T. Familial Klippel-Feil anomaly and t(5;8)(q35.1;p21.1) translocation. *Am J Med Genet A* 2006;140:1013-1015.

Hossain A, Saunders GF. Synergistic cooperation between the β -catenin signaling pathway and steroidogenic factor 1 in the activation of the mullerian inhibiting substance type II receptor. *J Biol Chem* 2003;278:26511-26516.

Hou X, Tan Y, Li M, Dey SK, Das SK. Canonical Wnt Signaling is critical to estrogen-mediated uterine growth. *Mol Endocrinol* 2004;18:3035-3049.

Hughes IA. Female development – all by default? *N Engl J Med* 2004;351:748-750.

Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Delot E, Chen XN, Dewing P, Swain A, Rao PN, Elejalde BR, Vilain E. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* 2001;68:1102-1109.

Josso N, Clemente N. Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:91-97.

Jost A, Vigier B, Prepin J, Perchellet JP. Studies on sex differentiation in mammals. *Rec Prog Horm Res* 1973;29:1-41.

Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupe V, Grondona JM, Chambon P. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 1997;124:313-326.

Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathways. *Cancer Sci* 2003;94:225-229.

Klipstein S, Bhagavath B, Topipat C, Sasur L, Reindollar R, Gray M. The N314D polymorphism of the GALT gene is not associated with congenital absence of the uterus and vagina. *Mol Hum Reprod* 2003;9:171-174.

Kobayashi A, Behringer RR. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat Rev Genet* 2003;4:969-980.

Kobayashi A, Shawlot W, Kania A, Behringer RR. Requirement of *Lim1* for female reproductive tract development. *Development* 2004;131:539-549.

Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovellbadge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for *SRY*. *Nature* 1991;351:117-121.

Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2474-2479.

Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.

MacLaughlin DT, Donahoe PK. Sex determination and differentiation. *N Engl J Med* 2004;350:367-378.

Mello MP, Assumpção JG, Hackel C. Genes involved in sex determination and differentiation. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005;49:14-25.

Mendelsohn C, Lohnes D, Decimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, Mark M. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 1994;120:2749-2771.

Menke DB, Page DC. Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expr Patterns* 2002;2:359-367.

Mericskay M, Kitajewski J, Sassoon D. Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development* 2004;131:2061-2072.

Mittwoch U. Sex determination in mythology and history. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005;49:7-13.

Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S. Defects of urogenital development in mice lacking Emx-2. *Development* 1997;124:1653-1664.

Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, Yoshioka H, Swain A, Morohashi K. Dax-1(Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene1) gene transcription is regulated by Wnt 4 in the female developing gonad. *Mol Endocrinol* 2003;17:507-519.

Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW. Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* 2003;423:173-177.

Oppelt P, Strissel PL, Kellermann A, Seeber S, Humeny A, Beckmann MW, Strick R. DNA sequence variations of the entire anti-Mullerian hormone (AMH) gene promoter and AMH protein expression in patients with the Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Hum Reprod* 2005;20:149-157.

Oppelt P, Renner SP, Kellerman A, Brucker S, Hauser GA, Ludwig KS, Strissel PL, Strick R, Wallwiener D, Beckmann MW. Clinical aspects of Mayer-Rokitansky-Kuester-Hauser syndrome: recommendations for clinical diagnosis and staging. *Human Reprod* 2006;21:792-797.

Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EM, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown LG. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 1987;51:1091-1104.

Parr BA, McMahon AP. Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature* 1998;395:707-710.

Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Gene Dev* 2000;14:1837-1851.

Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3836-3844.

Resendes BL, Sohn SH, Stelling JR, Tineo R, Davis AJ, Gray MR, Reindollar RH. Role of anti-Mullerian hormone in congenital absence of the uterus and vagina. *Am J Med Genet* 2001;98:129-136.

Rey R. Anti-Mullerian hormone in disorders of sex determination and differentiation. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005;49:26-36.

Roberts LM, Visser JA, Ingraham HA. Involvement of a matrix metalloproteinase in MIS-induced cell death during urogenital development. *Development* 2002;129:1487-1496.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 1989; vol.1,2,3.

Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 1981;214:1205-1210.

Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R. *Dax1* antagonizes *Sry* action in mammalian sex determination. *Nature* 1998;391:761-767.

Tanner JM, Whitehouse RH. Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity, weight velocity, and stages of puberty. *Arch Dis Child* 1976;51:170-179.

Tian Q, Jin H, Cui Y, Guo C, Lu X. Regulation of Wnt gene expression. *Dev Growth Differ* 2005;47:273-281.

Timmreck L, Pan H, Reindollar R, Gray MR. WNT7A mutations in patients with Mullerian duct abnormalities. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2003;16:217-221.

Torres M, Gómez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P. *Pax-2* controls multiple steps of urogenital development. *Development* 1995;121:4057-4065.

Ulrich U, Schrickel J, Dorn C, Richter O, Lewalter T, Luderitz B, Rhiem K. Mayer-von Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome in association with a hitherto undescribed variant of the Holt-oram syndrome with an aorto-pumonary window. *Hum Reprod* 2004;19:1201-1203.

Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999;397:405-409.

Van Lingen BL, Reindollar RH, Davis AG, Gray MR. Further evidence that the WT1 gene does not have a role in the development of the derivatives of the mullerian duct. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:597-603.

Van Lingen BL, Eccles N, Reindollar RH, Gray MR. Molecular Genetic Analysis of the PAX2 gene in patientes with congenital absence of the uterus and vagina. *Fertil Steril* 1998;70:S42.

Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 2006;131:1-9.

Xavier F, Allard S. Anti-Mullerian hormone, beta-catenin and Mullerian duct regression. *Mol Cell Endocrinol* 2003;211:115-121.

Yao HH. The pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. *Mol Cell Endocrinol* 2005;230:87-93.

Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Joo K, Kimura M, Imamura S, Kamatani N, Momma K, Takao A, Nakazawa M, Shimizu N, Matsuoka R. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet* 2003;362:1366-1373.

Zhan Y, Fujino A, Maclaughlin D, Manganaro TF, Szotek PP, Arango NA, Teixeira J, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance regulates its receptors/SMAD signaling and causes mesenchymal transition of the coelomic epithelial cells early in Mullerian duct regression. *Development* 2006;133:2359-2369.

Zenteno J, Carranza-Lira S, Kofman-Alfaro S. Molecular analysis of the anti-Mullerian hormone, the anti-Mullerian hormone receptor, and galactose-1-phosphate uridyl transferase genes in patients with the Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 2004;269:270-273.

8- ANEXOS

ANEXO A: Iniciadores e condições de PCR utilizados na amplificação dos 5 exons do gene *WNT4*

Exon	Iniciadores (5'-3')	Temperatura Anelamento (°C)	Tampão	Mg Cl ₂	Produto de amplificação (pb)	Taq
1	F:5'-CGCCCAGGTAACCCCATCCTC-3' R:5'-GGGTGTGCAGAGGGACGTTTCG-3'	65	Tampão <i>High fidelity</i>	6mM	558	7
2	F:5'-GATGAGGAGGTGGGCTCT-3' R:5'-GCTGGTTTTGCTTCAGAAAT-3'	54	IIB	2mM	399	4
3-4	F:5'-CCCTCCCCCTCTACAAAG-3' R:5'-AGTGCCCACTACCTTCCTG-3'	55	IIB	2mM	453	4
4	F:5'-CTTCGTGTACGCCATCTCTT-3' R:5'-AGTGCCCACTACCTTCCTG-3'	55	IIB	2mM	363	4
5	F:5'-TAATTCCTAAGAGGAGGCACAA-3' R:5'-GGGTAGGTGGTGGGAGACTGTT-3'	62	Tampão <i>high fidelity</i> *	5mM	693	platinum

* Tampão *10X high Fidelity PCR buffer* – Invitrogen ® + adição de *PCRx Enhancer system* (10% do volume total da reação)

ANEXO B: Iniciadores e condições de PCR utilizados na amplificação do exon 3 do gene *CTNNB1*

Exon	Iniciadores (5'-3')	Temperatura Anelamento (°C)	MgCl ₂ (mM)	Tampão	Produto de Amplificação (pb)
3 (1°par)	F:5'-GATTTGATGGAGTTGGACATGG-3' R:5'-TGTTCTTGAGTGAAGGACTGAG-3'	60	1,5	IIB	226
3 (2°par*)	F: 5'-TGCTTTTCTTGGCTGTCTTTC-3' R: 5'-CTGTGGTAGTGGCACCAGAA-3'	55	1,0	IIB	248

* Foram utilizados dois pares de iniciadores para amplificar o exon 3 da β -catenina para averiguação de erro de amplificação no iniciador F do primeiro par.

ANEXO C: Soluções utilizadas na reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Solução de iniciadores: 10 pmoles/ μ l

Solução de cloreto de Magnésio: 25 mM

Tampão de incubação IIB (10x):

Cloreto de sódio ----- 400 mM

Tris cloridrato pH 8.4 ----- 100 mM

Triton X-100 -----1%

Tampão 10X *high Fidelity PCR buffer* – Invitrogen®

Tris-SO4 pH 8.9-----600 mM

Sulfato de Amônia-----180 mM

***PCRx Enhancer system* - Invitrogen®:** Composição não fornecida pelo laboratório.

Solução de dNTPs:

dATP 100 mM-----10 μ l

dCTP 100 mM-----10 μ l

dGTP 100 mM-----10 μ l

dTTP 100 mM-----10 μ l

760 μ l de água estéril

***Taq* DNA polimerase:** 5u/ μ l

***Taq platinum:* 5u/ μ l**

Taq DNA polimerase recombinante + *Pyrococcus* species GB-D polimerase (atividade 3'-5' exonuclease) + Anticorpo anti- *Taq* Platinum® (permitindo “hot-start”).

ANEXO D: Soluções utilizadas para eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Solução de Acrilamida /Bisacrilamida 30%

Acrilamida-----29 g
Bisacrilamida-----1g
Água destilada q.s.p.-----100 ml

Tampão TBE 10 x pH 8,3

Tris base -----60,50 g
Ácido bórico-----30,85 g
EDTA dissódico bi-hidratado ----- 3,72 g
Água destilada q.s.p.-----1000 ml

Gel de poliacrilamida a 6,5%

Solução de Acrilamida/Bisacrilamida 30% -----1,079 ml
TBE 10x-----0,65 ml
Água destilada-----3,22 ml
Persulfato de amônio 10% ----- 40 µl
TEMED----- 4 µl

Tampão TBE 1x

TBE 10 x----- 10 ml
Água destilada q.s.p -----100 ml

Tampão de amostra (*Gel loading buffer*)

Azul de bromoferol -----0.25%
Xileno cianol -----0,25%
Glicerol-----30%
Água destilada q.s.p -----100 ml

ANEXO E: Soluções utilizadas na coloração pela prata

Solução de prata (estoque)

Nitrato de prata-----20,38 g
Água destilada-----100 ml

Solução de prata (uso)

Solução do estoque-----10 ml
Água destilada qsp-----100 ml
Formaldeído 37%-----150 µl

Revelador

Carbonato de sódio-----2,97 g
Água destilada qsp-----100 ml
Formaldeído 37%-----150 µl
Tiosulfato de sódio 10 mg/ml-----40 µl

Deve ser utilizado quando em temperatura entre 10°C e 18°C.

Solução fixadora

Ácido acético glacial -----100 ml
Água destilada qsp-----1000 ml

Solução de Tiosulfato de sódio

Tiosulfato de sódio -----10 mg
Água destilada-----1 ml

ANEXO F: Soluções utilizadas para reação de sequenciamento e precipitação

Solução de *terminator ready reaction mix*:

- “A-Dye Terminator, marcado com dicloro [R6G]”
- “C-Dye Terminator, marcado com dicloro [ROX]”
- “G-Dye Terminator, marcado com dicloro [R110]”
- “T-Dye Terminator, marcado com dicloro [TAMPRA]”
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- AmpliTaq DNA polimerase
- MgCl₂,
- Pirofosfatos termo-estáveis e
- tampão tris-HCL pH: 9,0

Soluções de precipitação:

400 mM de tris-HCl pH9.0 + 10 mM de MgCl₂
ABI PRISM 310 Genetic analyser Buffer with EDTA
Template Supression Reagent (TSR)
Álcool isopropílico 75%
Etanol 70%

ANEXO G: Sequência do gene *WNT4* (cDNA) e da proteína WNT4

AGCCGCTGCCCCGGGCGGGCGCCCGGGCGGCACCATGAGTCCCCGCTCGTGCCTGCGT
.....-M--S--P--R--S--C--L--R--
TCGCTGCGCCTCCTCGTCTTCGCCGCTTCTCAGCCGCCGCGAGCAACTGGCTGTACCTG
-S--L--R--L--L--V--F--A--V--F--S--A--A--A--S--N--W--L--Y--L--
GCCAAGCTGTCTCGTGGGGAGCATCTCAGAGGAGGAGACGTGCGAGAAACTCAAGGGC
-A--K--L--S--S--V--G--S--I--S--E--E--E--T--C--E--K--L--K--G--
CTGATCCAGAGGCAGGTGCGAGATGTGCAAGCGGAACCTGGAAGTCATGGACTCGGTGCGC
-L--I--Q--R--Q--V--Q--M--C--K--R--N--L--E--V--M--D--S--V--R--
CGCGGTGCCCAGCTGGCCATTGAGGAGTGCCAGTACCAGTTCCGGAACCGGGCGCTGGAAC
-R--G--A--Q--L--A--I--E--E--C--Q--Y--Q--F--R--N--R--R--W--N--
TGCTCCACACTCGACTCCTTGCCTTTCGGCAAGGTGGTGACGCAAGGGACTCGGGAG
-C--S--T--L--D--S--L--P--V--F--G--K--V--V--T--Q--G--T--R--E--
GCGGCCTTCGTGTACGCCATCTCTTCGGCAGGTGTGGCCTTTGCAGTGACGCGGGCGTGC
-A--A--F--V--Y--A--I--S--S--A--G--V--A--F--A--V--T--R--A--C--
AGCAGTGGGGAGCTGGAGAAGTGCGGCTGTGACAGGACAGTGCATGGGGTCAGCCACAG
-S--S--G--E--L--E--K--C--G--C--D--R--T--V--H--G--V--S--P--Q--
GGCTTCCAGTGGTCAGGATGCTCTGACAACATCGCCTACGGTGTGGCCTTCTCACAGTCG
-G--F--Q--W--S--G--C--S--D--N--I--A--Y--G--V--A--F--S--Q--S--
TTTGTGGATGTGCGGGAGAGAAGCAAGGGGCGCTCGTCCAGCAGAGCCCTCATGAACCTC
-F--V--D--V--R--E--R--S--K--G--A--S--S--S--R--A--L--M--N--L--
CACAACAATGAGGCCGGCAGGAAGGCCATCCTGACACACATGCGGGTGAATGCAAGTGC
-H--N--N--E--A--G--R--K--A--I--L--T--H--M--R--V--E--C--K--C--
CACGGGGTGTGAGGCTCCTGTGAGGTAAAGACGTGCTGGCGAGCCGTGCCGCCCTCCGC
-H--G--V--S--G--S--C--E--V--K--T--C--W--R--A--V--P--P--F--R--
CAGGTGGGTACGCACTGAAGGAGAAGTTTGATGGTGCCTGAGGTGGAGCCACGCCGC
-Q--V--G--H--A--L--K--E--K--F--D--G--A--T--E--V--E--P--R--R--
GTGGGCTCCTCCAGGGCACTGGTGCCACGCAACGCACAGTTCAAGCCGCACACAGATGAG
-V--G--S--S--R--A--L--V--P--R--N--A--Q--F--K--P--H--T--D--E--
GACCTGGTGTACTTGGAGCCTAGCCCCGACTTCTGTGAGCAGGACATGCGCAGCGGCGTG
-D--L--V--Y--L--E--P--S--P--D--F--C--E--Q--D--M--R--S--G--V--
CTGGGCACGAGGGGCCGACATGCAACAAGACGTCCAAGGCCATCGACGGCTGTGAGCTG
-L--G--T--R--G--R--T--C--N--K--T--S--K--A--I--D--G--C--E--L--
CTGTGCTGTGGCCGGCTTCCACACGGCGCAGGTGGAGCTGGCTGAACGCTGCAGCTGC
-L--C--C--G--R--G--F--H--T--A--Q--V--E--L--A--E--R--C--S--C--

AAATTCCTACTGGTGTCTTTCGTCAAGTGCCGGCAGTGCCAGCGGCTCGTGGAGTTGCAC
 -K--F--H--W--C--C--F--V--K--C--R--Q--C--Q--R--L--V--E--L--H--
 ACGTGC CGATGACCGCCTGCCTAGCCCTGCGCCGGCAACCACCTAGTGGCCAGGGAAGG
 -T--C--R--*--.....
 CCGATAATTTAAACAGTCTCCCACCACCTACCCCAAGAGATACTGGTTGTATTTTTTGT

ANEXO H: Exons do gene WNT4

Exons WNT4 – iniciadores marcados em vermelho, regiões não traduzidas em verde

Exon/Intron	tamanho	Seqüência
5`upstream sequence	tgccccgggcccgtgggcccggccagggtaaccccatcctcggc ccgccccggccccccccccggcccgcccccgcccccgcccccgccccg ccgccccggccccggccatccccggcctctggggcggcgctgacagtctggc agcggggcgagcagcggcaggcctgccccggcagcagcagggcagagccccg cgccccggccccggccccggccccggccccggccccggccccggccccgg
Exon 1	113	AGCCGCTGCCCGGGCCGGGGCGCCCGCGCGGCACCATGAGTCCCCTCGTGCCTGCGT TCGTGCCTCCTCGTCTTCGCCGCTTCTCAGCCGCGGAGCAACTGGCT
Intron 1-2	12.994	gtaagtctggccggggccgagcggggcggggcggggcggggcaggccccggggcagcgg ccggtgccaggcggcggggcagcggggcggggcagccccggcaggtgtctcggccg ggaccggaggctcgtcgtccgctgccccggccaggccgaaagctccctctgcaacac cggggtccccctcctgccccg.....cagaagacagcatttccact cccttggtgcccctagagcggggcaagagggcctgtaactggatccagagagaagtccg agccagggcccagtcactgggacagtcagtccccagagaccgggctggagctcaggcct ggtccggggccaggaaaatgagggaggtgggctcctgcatcacgtgtcaccctctccccag
Exon 2	236	GTACCTGGCCAAGCTGTCGTTCGGTGGGAGCATCTCAGAGGAGGAGACGTGCGAGAACT CAAGGGCCTGATCCAGAGGCAGGTGCAGATGTGCAAGCGGAACCTGGAAGTCATGGACTC GGTGCGCCGCGGTGCCAGCTGGCCATTGAGGAGTGCCAGTACCAGTTCGGAACCGGC CTGGAAGTCTCCACTCGACTCCTTGCCCGTCTTCGGCAAGGTGGTGACGCAAG
Intron 2-3	8.039	gtgaggaagggcgtgccccggcaggggagcctgccccggcagggcagggccagca ggaaatgagagcgtcgtgagcaacgggactattgcaggtcattctgaagcaaacagc acaggacccaagtgagggcataaaggtgagagcgttggggccacaggacaggaggt gatccaggtgggatgtatgt.....acgctggtaaggaagcag attcagctattggtgtgataagaacaagcgcctggggcctagcacatgatttctgccc tgtcttgctccctcctggcctccagcaagcaggaggtccatagccctccccctctac aaaggaggggtgagggagggagccctgggaccagctctgcccctcctccccacag
Exon 3	132	GGACTCGGGAGGCGGCTTCGTGTACGCCATCTCTTCGGCAGGTGTGGCCTTTGCAGTGA CGCGGGCGTGACGAGTGGGGAGCTGGAGAAGTGCAGCTGTGACAGGACAGTGCATGGGG TCAGCCACAGG
Intron 3-4	91	gtaggtgcaggaggtggtcagagtgaggggcagggggcttggccctggccctcactcac cgcagcccttctgtgcccaccacaccccag
Exon 4	143	GCTTCCAGTGGTCAGGATGCTCTGACAACATCGCCTACGGTGTGGCCTTCTCACAGTCTG TTGTGGATGTGCGGGAGAGAAGCAAGGGGCCTCGTCCAGCAGAGCCCTCATGAACCTCC ACAACAATGAGGCCGGCAGGAAG
Intron 4-5	693	gtaggtgggactacccccaccaagagcggggtagggatagcatgggcagggccccaga ctctcccacccacagccactcagaaaacatttgtgagggctctcaccagcactggca ccttctgtaggccagtggggttcaggacagggccagaggggggtacagacaggcaggcag cgttacagaatgggtaagt.....gcaggacagtagctcgttc acctgtcaacaactgcttagcagccagtagccggtaattcctaagaggaggcaaacg gcaaatctgactgcagcgtcagccccagggaccccagtagctcggctgtcagcctccgccc cctccccctgcccctcccttgccatctcctgatggcccctctccccaccctctccccacag
Exon 5	1421	GCCATCTTGACACATATGCGGGTGGAAATGCAAGTGCACCGGGTGTGAGGCTCCTGTGAG GTAAAGACGTGCTGGCGAGCCGTGCCGCCCTTCGCCAGGTGGGTACGCACTGAAGGAG AAGTTTGATGGTGCCACTGAGGTGGAGCCACGCCGCTGGGCTCCTCCAGGGCACTGGTG CCACGCAACGCACAGTTCAAGCCGCACACAGATGAGGACCTGGTGTACTTGGAGCCTAGC

		<pre> CCCGACTTCTGTGAGCAGGACATGCGCAGCGGCGTGTGGGCACGAGGGCCGCACATGC AACAAAGACGTCCAAGGCCATCGACGGCTGTGAGCTGCTGTGCTGTGGCCGGGCTTCCAC ACGGCGCAGGTGGAGCTGGCTGAACGCTGCAGCTGCAAATCCACTGGTGTGCTTCGTC AAGTGCCGGCAGTGCCAGCGGCTCGTGGAGTTGCACACGTGCCGATGACCGCCTGCCTAG CCCTGCGCCGGCAACCACCTAGTGGCCAGGGAAGGCCGATAATTTAAACAGTCTCCAC CACCTACCCCAAGAGATACTGGTTGTATTTTTTTGTTCTGGTTTGGTTTTTGGTCCCTCAT GTTATTTATTGCCGAAACCAGGCAGGCAACCCCAAGGCACCAACCAGGGCCTCCCAA GCCTGGGCTTTTGTGGCTGCCACTGACCAAAGGGACCTTGCTCGTGCCGCTGGCTGCCCG CATGTGGCTGCCACTGACCACTCAGTTGTATCTGTGTCCGTTTTTCTACTTGCAGACCT AAGGTGGAGTAACAAGGAGTATTACCACCACATGGCTACTGACCGTGTGCATCGGGGAAGA GGGGCCTTATGGCAGGAAAATAGGTACCGACTTGATGGAAGTCAACCCCTTGAAAA AAGA ACTCTTAACTCTCCAGCACACATACATGGACTCCTGGCAGCTTGAGCCTAGAAG CCATGTCTCTCAAATGCCCTGAGAAAGGGAACAAGCAGATACCAGGTCAAGGGCACCAGG TTCATTTTCAGCCCTTACATGGACAGCTAGAGGTTGATATCTGTGGGTCCTTCCAGGCAA GAAGAGGGAGATGAGAGCAAGAGACGACTGAAGTCCACCCTAGAACCAGCCTGCCCA GCCTGCCCTTGGGAAGAGGAAACTTAACCACTCCCCAGACCCACTAGGCAGGCATATAG GCTGCCATCCTGGACCAGGGATCCCGCTGTGCCCTTGCAGTCATGCCCGAGTCACCTTT CACAGCGCTGTTCCCTCATGAACTGAAAACACACACACACACACACACACACACACAC ACACACACAGGACACACACACACACACCTGCGAGAGAGAGGGGAGGAAAGGGCTGTGCCCTT GCAGTCATGCCCTGAGTCACCTTTCACAGCACTGTTCCCTC </pre>
<i>3' downstream sequence</i>		<pre> catgaaactgaaaaaggaaaacacacacacacacacactgcgagagggagggaggaaaggg ctgtgcaataaagtctctcccattatcttactcaacacaatttattgagcaatactac gtgtctagggcctgtacaggccatctcacttgatggccacaacagtcttggaagcaga caaaccaagaatgctaatagcccatctgacatcagagacggcagtgctcccagacctctc acagcaagctggatggacaggcagggccagaagagtctccagccaagcctcctccttgg </pre>

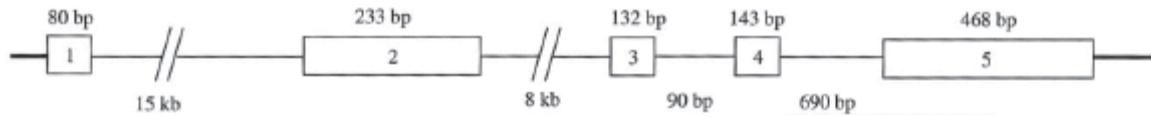


Figura adaptada de BIASON-LAUBER, 2004

ANEXO I: cDNA da β catenina:

Exon 3 marcado em vermelho, sítios de fosforilação marcados em amarelo

```
1 CTCTCGGTCTGTGGCAGCAGCGTTGGCCCCGCCCGGGAGCGGAGAGCGAGGGGAGGCGG
61 AGACGGAGGAAGGTCTGAGGAGCAGCTTCAGTCCCCGCCGAGCCGCCACCGCAGGTTCGAG
121 GACGGTCGGACTCCCGCGCGGGAGGAGCCTGTTCCCCTGAGGGTATTTGAAGTATACCA
181 TACAACGTGTTTTGAAAATCCAGCGTGGACAATGGCTACTCAAGCTGATTTGATGGAGTTG
241 GACATGGCCATGGAACCAGACAGAAAAGCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTAC
301 CTGGACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGGTAAAGGC
361 AATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATACCTCCCAAGTCTGTATGAGTGGGAACAGGGATT
421 TCTCAGTCTTCACTCAAGAACAAGTAGCTGATATTGATGGACAGTATGCAATGACTCGA
481 GCTCAGAGGTACGAGCTGCTATGTTCCCTGAGACATTAGATGAGGGCATGCAGATCCCA
541 TCTACACAGTTTGATGCTGCTCATCCCCTAATGTCCAGCGTTTGGCTGAACCATCACAG
601 ATGCTGAAACATGCAGTTGTAACTTGATTAAGTATCAAGATGATGCAGAACTTGCCACA
661 CGTGCAATCCCTGAACTGACAAAAGTCTAAATGACGAGGACCAGGTGGTGGTTAATAAG
721 GCTGCAGTTATGGTCCATCAGCTTTCTAAAAAGGAAGCTTCCAGACACGCTATCATGCGT
781 TCTCCTCAGATGGTGTCTGCTATTGTACGTACCATGCAGAATACAAATGATGTAGAAACA
841 GCTCGTTGTACCGCTGGGACCTTGCATAACCTTTCCCATCATCGTGAGGGCTTACTGGCC
901 ATCTTTAAGTCTGGAGGCATTCCTGCCCTGGTGAAAATGCTTGGTTCCAGTGGATTCT
961 GTGTTGTTTTATGCCATTACAACCTTCCACAACCTTTTTATTACATCAAGAAGGAGCTAAA
1021 ATGGCAGTGCCTTTAGCTGGTGGGCTGCAGAAAATGGTTGCCTTGCTCAACAAAACAAAT
1081 GTTAAATCTTTGGCTATTACGACAGACTGCCCTTCAAATTTAGCTTATGGCAACCAAGAA
1141 AGCAAGCTCATCATACTGGCTAGTGGTGGACCCCAAGCTTTAGTAAATATAATGAGGACC
1201 TATACTTACGAAAACTACTGTGGACCACAAGCAGAGTGTGAAGGTGCTATCTGTCTGC
1261 TCTAGTAATAAGCCGGCTATTGTAGAAGCTGGTGGAAATGCAAGCTTTAGGACTTCACCTG
1321 ACAGATCCAAGTCAACGCTCTTGTTCAGAAGTGTCTTTGGACTCTCAGGAATCTTTTCAGAT
1381 GCTGCAACTAAACAGGAAGGGATGGAAGGTCTCCTTGGGACTCTTGTTCAGCTTCTGGGT
1441 TCAGATGATATAAATGTGGTCACTGTGCAGCTGGAATTTCTTCAACCTCACTTGCAAT
1501 AATTATAAGAACAAAGATGATGGTCTGCCAAGTGGGTGGTATAGAGGCTCTTGTGCGTACT
1561 GTCCTTCGGGCTGGTGACAGGGAAGACATCACTGAGCCTGCCATCTGTGCTCTTTCGTCTAT
1621 CTGACCAGCCGACACCAAGAAGCAGAGATGGCCAGAATGCAGTTTCGCCTTCACTATGGA
1681 CTACCAGTTGTGGTTAAGCTTTACACCCACCATCCCACTGGCCTCTGATAAAGGCTACT
1741 GTTGGATTGATTGCAAACTTTGCCCTTTGTCGCCCAAATCATGCACCTTTGCGTGAGCAG
1801 GGTGCCATTCACGACTAGTTCACTGCTTGTTCGTGCACATCAGGATACCCAGCGCCGT
1861 ACGTCCATGGTGGGACACAGCAATTTGTGGAGGGGTCCGCATGGAAGAAATAGTT
1921 GAAGGTTGTACCCGAGCCCTTACATCCTAGCTCGGGATGTTCAACAACCGAATTGTTATC
1981 AGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCTCCCATTGAAAACATC
2041 CAAAGAGTAGCTGCAGGGTCTCTGTGAACTTGTCTCAGGACAAGGAAGCTGCAGAAGCT
2101 ATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTCCTCTGACAGAGTTACTTCACTCTAGGAATGAAGGT
2161 GTGGCGACATATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGAGGACAAGCCACAAGATTAC
2221 AAGAAACGGCTTTTCACTTGCAGCTGACCAGCTCTCTCTTTCAGAACAGAGCCAATGGCTTGG
2281 AATGAGACTGCTGATCTTGGACTTGATATTGGTGCCAGGGAGAACCCTTGGATATCGC
2341 CAGGATGATCCTAGCTATCGTCTTTTTCACTCTGGTGGATATGGCCAGGATGCCTTGGGT
2401 ATGGACCCCATGATGGAACATGAGATGGGTGGCCACCACCCTGGTGTGACTATCCAGTT
2461 GATGGGCTGCCAGATCTGGGCATGCCAGGACCTCATGGATGGGCTGCCTCCAGGTGAC
2521 AGCAATCAGCTGGCCTGGTTTGATACTGACCTGTAAATCATCCTTTAGGTAAAGAAGTTTT
2581 AAAAAGCCAGTTTGGGTAATAACTTTTACTCTGCCTACAGAAGTTCAGAAAAGACTTGGT
2641 TGTAAGGTTGGGAGTGGTTTAGGCTATTTGTAATCTGCCAAAAACAGGTATATACTT
2701 TGAAAGGAGATGTCTTGGAACATTGGAATGTCTCAGATTCTGAGTTGTTATGTGATCAT
2761 GTGTGGAAGTTATTAACTTAATGTTTTTGGCCACAGCTTTTGCACCTTAATACTCAAAT
2821 GAGTAACATTTGCTGTTTTAAACATTAATAGCAGCCTTTCTCTTTTATACAGCTGTATT
2881 GTCTGAACTTGCATTGTGATTTGGCCTGTAGAGTTGCTGAGAGGGCTCGAGGGGTGGGCTG
2941 GTATCTCAGAAAGTGCTGACACACTAACCAAGCTGAGTTTCTATGGGAACAATTGAAG
```


3001 TAAACTTTTTGTTCTGGTCCTTTTTGGTCGAGGAGTAACAATACAAATGGATTTTGGGAG
3061 TGACTCAAGAAGTGAAGAATGCACAAGAATGGATCACAAGATGGAATTTATCAAACCCTA
3121 GCCTTGCTTGTAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGAATATCTGTAATGGTACTGACTT
3181 TGCTTGCTTTGAAGTAGCTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCAGTAACTGTTTTT
3241 TAAGTCTCTCGTAGTGTAAAGTTATAGTGAATACTGCTACAGCAATTTCTAATTTTTAAG
3301 AATTGAGTAATGGTGTAGAACACTAATTCATAATCACTCTAATTAATTGTAATCTGAATA
3361 AAGTGTAAACAATTGTGTAGCCTTTTTGTATAAAAATAGACAAAATAGAAAATGGTCCAATTA
3421 GTTTCCTTTTAAATATGCTTAAAAATAAGCAGGTGGATCTATTTTCATGTTTTTGATCAAAA
3481 ACTATTTGGGATATGTATGGGTAGGGTAAATCAGTAAGAGGTGTTATTTGGAACCTTGTT
3541 TTGGACAGTTTACCAGTTGCCTTTTATCCCAAAGTTGTTGTAACCTGCTGTGATACGATG
3601 CTTCAAGAGAAAATGCGGTTATAAAAAATGGTTCAGAATTAAACTTTTAAATTCATTC

ANEXO J: Sequência de aminoácidos da B-catenina

Em vermelho, segmento codificado pelo exon 3

MATQADLMELDMAMEPDRKAAVSHWQQQSYLDSGIHSGATTTAPSLSGKGNPEEEDVDTSL
QVLYEWEQGFSSQSFTEQEVADIDGQYAMTRAQRVRAAMFPETLDEGMQIPSTQFDAAHPT
NVQRLAEP SQMLKHAVVNLINYQDDAELATRAIPELTKLLNDEDQVVVNKAAVMVHQLSK
KEASRHAIMRSPQMVSIAIVRTMQNTNDVETARCTAGTLHNLSSHREGLLAIFKSGGIPAL
VKMLGSPVDSVLFYAITTLHNLHLLHQEGAKMAVRLAGGLQKMVALLNKTNVKFLAITTDC
LQILAYGNQESKLIILASGGPQALVNMIRTYTYEKLLWTTSRVLKVLVSVCSNKP AIVEA
GGMQALGLHLTDPSQRLVQNCLWTLRNLSDAATKQEGMEGLLGLTLVQLLGSDDINVTCA
AGILSNLTCNNYKNKMMVCQVGGIEALVRTVLRAGDREDITEPAICALRHLSRHQEAEM
AQNARLHYGLPVVVKLLHPPSHWPLIKATVGLIRNLALCPANHAPLREQGAI PRLVQLL
VRAHQDTQRRTSMGGTQQQFVEGVRMEEIVEGCTGALHILARDVHNRIVIRGLNTIPLFV
QLLYSPIENIQRVAAGVLCELAQDKEAAEAEAEAGATAPLTELHLSRNEGVATYAAAVLF
RMSEDKPQDYKRLSVELTSSLFRTPEMAWNETADLGLDIGAQGEPLGYRQDDPSYRSFH
SGGYGQDALGMDPMMEHEMGGHHPGADYPVDGLPDLGHAQDLMDGLPPGDSNQLAWFDTD

L

ANEXO L: Exon 3 do gene *CTNNB1*:

Iniciadores marcados em vermelho (1° par) e azul (2° par)

Exon/intron	tamanho	seqüência
Intron 2-3	444	g t t t g t g t c a t t a a a t c t t t a g t t a c t g a a t t g g g g c t c t g c t t c g t t g c c a t t a a g c c a g t c t g g c t g a g a t c c c c c t g c t t t c c t c t c c c t g c t t a c t t g t c a g g c t a c c t t t t g c t c c a t t t t c t g c t c a c t c c t c t a a t g g c t t g g t g a a a t a g c a a a c a a g c c a c c a g c a g g a a t c t a g t c t g g a t g a c t g c g t a a c t g t t a g g t g g t t o c c t a a g g g a t t a g g t a t t t c a t c a c t g a g c t a a c c c t g g c t a t c a t t t g t c t t t t c t t g g c t g t c t t t c a g a t t t g a c t t t a t t t c t a a a a a t a t t t c a a t g g g t c a t a c a c a g a t t c t t t t t t t t a a a t t a a a g t a a c a t t t c c a a t c t a c t a a t g c t a a t a c t g t t t c g t a t t t a t a g
Exon 3	228	CT GATTTGATGGAGTTGGACATGG CCATGGAACCAGACAGAAAAGCGGCTGTTAGTCACT GGCAGCAACAGTCTTACCTGGACTCTGGAATCCAT TTCTGGTGCCACTACCACAG CTCCTT CTCTGAGTGGTAAAGGCAATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATACCTCCCAAGTCCTGTATG AGTGGGAACAGGGATTTT CTCAGTCCTTCACTCAAGAAC AAGTAGCTG
Intron 3-4	200	g t a a g a g t a t t a t t t t t c a t t g c c t t a c t g a a a g t c a g a a t g c a g t t t t g a g a a c t a a a a a g t t a g t g t a t a a t a g t t t a a a t a a a a t g t t g t g g t g a a g a a a g a g a g t a a t a g c a a t g t c a c t t t t a c c a t t t a g g a t a g c a a a t a c t t a g g t a a a t g c t g a a c t g t g g a t a g t g a g t g t t g a a t t a a c c t t t t c c a g