

Univer sidade Cat ólica de Br asília

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS GENÔMICAS E BIOTECNOLOGIA

Mestrado

Análise Molecular do Gene *FOXL2* em Mulher com Síndrome da
Blefarofimose Ptose Epicanto Inverso com Falência Ovariana Prematura.

Autor: Frederico José Silva Corrêa
Orientador: Prof. Doutor Adriano Bueno Tavares
Co-orientador: Prof. Doutor Rinaldo Wellerson Pereira

Brasília

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Frederico José Silva Corrêa

Análise Molecular do Gene *FOXL2* em Mulher com Síndrome da Blefarofimose Ptose Epicanto Inverso com Falência Ovariana Prematura.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito para obtenção de Título de Mestre.

Orientador: Adriano Bueno Tavares

Co-orientador: Rinaldo Wellerson Pereira

Brasília
2007

TERMO DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida e aprovada como requisito parcial para obtenção de Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, defendida e aprovada em 14 de abril de 2007, pela banca examinadora constituída por:

Orientador : Prof. Dr. Adriano Bueno Tavares

Examinador interno: Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira

Examinadora externa: Prof.^a Dr.^a Ester Silveira Ramos

Brasília
UCB

DEDICATÓRIA

A minha esposa
Isabella
e aos meus filhos
João Victor e Geovanna,
criaturas maravilhosas que Deus me presenteou
e cujos sorrisos transformam as pedras do meu caminho
em flores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus!

Agradeço ao meu querido Pai, Marcos José Corrêa pelo amor, dedicação e sabedoria dispensados durante toda a vida no comando da nossa família. Com profundos exemplos de união, responsabilidade, honestidade e humildade, nos presenteou com os princípios mais importantes para a formação de uma pessoa íntegra.

Agradeço à minha querida Mãe, Nina Maria Silva Corrêa, exemplo de mulher dedicada aos filhos e à família. Obrigado pelo amor, pelo carinho e pela criação cristã a nós dispensada.

Agradeço aos meus queridos irmãos Bruno, Rafael e Izadora, verdadeiros amigos mandados por Deus, sempre presentes nos momentos mais importantes da minha vida.

Agradeço ao meu querido sogro Dr. Cezar Menezes Calazans e minha querida sogra Neuza Paolilo Calazans. Obrigado pelo carinho, apoio e incentivo sempre presentes.

Ao amigo Dr. Hélio Mityharo Nishi, ex-chefe da unidade de ginecologia e obstetrícia do Hospital Regional de Taguatinga, pelo apoio na liberação frente à instituição.

Agradeço aos amigos Dra. Josenice Araújo, Dr. Hamilton Barbosa Jr., Dr. Tércio Rezende e Dra. Luciana Potiguara pelo incentivo e apoio demonstrados.

Agradeço a todos os Professores e Diretores do programa de pós-graduação em ciências genômicas e biotecnologia da UCB, em especial aos professores Prof. Dr. Adriano Bueno Tavares e Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira pelo apoio nas horas mais difíceis.

Aos meus colegas de mestrado, em especial a Ana Carolina Vilarinho, Camila Barros, André Murad, Lílian do Carmo, Patrícia Brunetta, Túlio César Lins e Érica Monteiro pela amizade e apoio.

A todos os funcionários do programa de pós graduação, sempre atenciosos e prestativos, meu muito obrigado.

Agradeço aos pacientes que participaram voluntariamente deste trabalho. Obrigado.

EPIGRAFE

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein.

*“No mundo das criaturas, nada pode ser
entendido até que diferenças e distinções
sejam invocadas”.*

Gregory Bateson ,
(Mind and Nature: A Necessary Unity.)

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1. O Ovário Humano	8
3.1.1 Anatomia do ovário	8
3.1.2 Desenvolvimento ovariano	11
3.1.3 A Oogênese	17
3.1.4 Apoptose folicular	21
3.2. Falência Ovariana Prematura	25
3.2.1 Definições e Epidemiologia	25
3.2.2 Causas da falência ovariana prematura	27
3.2.3 Mutações em genes com repercussão na função ovariana	37
3.3 Síndrome da Blefarofimose-Ptose-Epicanto inverso	41
3.3.1 Aspectos clínicos	41
3.3.2 Aspectos genéticos	42
3.3.3 O gene <i>FOLX2</i>	43
3.3.4 Diagnóstico da Síndrome da BPES	48
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	50
4.1 Tipo de estudo	50
4.2 Amostra populacional	50
4.3 Cuidados éticos	50
4.4 Coleta de sangue	51
4.5 Extração de DNA	51
4.6 Pesquisa de Mutações no gene <i>FOXL2</i>	51
4.7 Análise dos Resultados	53
5. RESULTADOS	55

5.1	Relato do Caso	55
5.2	Quantificação do DNA	60
5.3	Produtos da PCR	60
5.4	Seqüenciamento dos produtos da PCR	62
6.	DISCUSSÃO	87
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
	ANEXO I	111

LISTA DE ABREVIATURAS

Ahch	<i>Adrenal hypoplasia critical region X</i>	
AHR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>	Formatado: Inglês (EUA)
AIRE	<i>Autoimmune regulator</i>	
APS	Autoimune Poliglandular Syndrome	
Bcl-2	<i>B cell/lymphoma-2 family</i>	
BPES	Síndrome da Blefarofimose Ptose Epicanto Inverso	
BLC2A1	<i>B Cell Lymphoma related protein A1</i>	
CDG	<i>Carbohydrate-Deficient Glycoprotein</i>	Formatado: Inglês (EUA)
c-Myc	<i>Cellular Myelocytomatosis oncogene</i>	Formatado: Inglês (EUA)
CYP19	Cytochrome P450, family 19	
CYP19A1	Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	
FOXL2	<i>Forkhead Transcription Factor L2</i>	Formatado: Inglês (EUA)
DAX-1	<i>Dosage-sensitive sex reversal region X</i>	Formatado: Fonte: Itálico, Inglês (EUA)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico	Formatado: Inglês (EUA)
DST	Doença Sexualmente Transmissível	Formatado: Inglês (EUA)
DMSO	Dimetil Sulfoxido	
ET	Endotelinas	Formatado: Português (Brasil)
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>	
FOP	Falência Ovariana Prematura	
FSH	Hormônio Folículo Estimulante	
GALT	<i>Galactose-1-fosfato uridyl transferase</i>	Formatado: Inglês (EUA)
GANS	<i>guanine nucleotide-binding protein, α-stimulating activity polypeptide 1</i>	
hCG	Hormônio Gonadotrofina Coriônica	
LH	Hormônio Luteinizante	
ISCA	Infertilidade Sem Causa Aparente	
NOBOX	<i>Newborn ovary homeobox-encoding gene</i>	
NTS	<i>Neurotrophins</i>	
OMS	Organização Mundial de Saúde	
ORF	<i>Open Reading Frame</i>	Formatado: Inglês (EUA)

Par-4	<i>Prostate apoptosis response 4</i>	Formatado: Fonte: Itálico, Inglês (EUA)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase	
PMM	Fosfomanomutase	
RNA	Ácido Ribonucléico	
SF-1	Fator Esteroidogênico 1	
SCF	<i>Stem cell factor</i>	
SNC	Sistema Nervoso Central	
SOP	Síndrome dos Ovários Policísticos	
SOX	<i>SRY-like box</i>	Formatado: Fonte: Itálico
SOX9	<i>SRY-like box 9</i>	Formatado: Fonte: Itálico, Inglês (EUA)
StAR	<i>Human Steroidogenic Acute Regulatory</i>	
TNF	<i>Tumor necrosis factor family</i>	
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>	
Wnt4	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 4</i>	
WT1	<i>Wilm's tumor suppressor gene</i>	Formatado: Português (Brasil)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia interna do ovário humano.

Figura 2. Secção de ovário humano em desenvolvimento.

Figura 3. Esquema de diferenciação gonadal.

Figura 4. Modelo proposto para iniciação da determinação sexual.

Figura 5. Foto de microscopia de ovário humano.

Figura 6. Microscopia mostrando membrana granulosa em atresia.

Figura 7. Mecanismos de ação de moléculas envolvidas na dinâmica do desenvolvimento folicular.

Figura 8. Fotos de microscopia de ovário humano com infiltrado inflamatório.

Figura 9. Estrutura terciária do domínio *forkhead* do gene *FOXL2*.

Figura 10. Foto da face da paciente com BPES.

Figura 11. Foto da paciente com BPES, de meio corpo.

Figura 12. Gel para avaliar concentração de DNA das 3 amostras do estudo.

Figura 13. Gel de agarose 1% para visualização dos produtos de PCR.

Figura 14. Gel de agarose 1% para visualização dos produtos de PCR.

Figura 15. Análise da qualidade da seqüência com o software CodonCode Aligner.

Figura 16. Análise da qualidade da seqüência com o software CodonCode Aligner.

Figura 17. Análise da qualidade da seqüência com o software CodonCode Aligner.

Figura 18. Principais Hits do Blastn da seqüência primer A paciente.

Figura 19. Principais Hits do Blastn da seqüência primer A pai.

Figura 20. Principais Hits do Blastn da seqüência primer C2 pai.

Figura 21. Principais Hits do Blastn da seqüência primer A Mãe.

Figura 22. Principais Hits do Blastn da seqüência primer C2 Mãe.

Figura 23. Principais Hits do Blastn da seqüência primer C2 paciente.

Figura 24. Resultado do Clustal W.

Figura 25. Resultado do Clustal W.

Figura 26. Pareamento das três seqüências no CodonCode Aligner, normal.

Figura 27. Pareamento das três seqüências no CodonCode Aligner, mutação.

Figura 28. Pareamento das três seqüências no CodonCode Aligner, mutação.

Figura 29. Blastn da seqüência contig das amostras primer a e C2 do pai e da mãe.

Figura 30. Alinhamento pelo Blastn da seqüência contig obtida no CodonCode Aligner com a seqüência que apresentou maior identidade com a seqüência testada.

Figura 31. Seqüência referência do gene FOXL2 completa.

Figura 32. Resultado do *ORF finder* da seqüência referência.

Figura 33. Resultado do *ORF finder* da seqüência referência com deleção da base timidina 864 do gene ou 627 do éxon.

Figura 34. Resultado do Clustal W entre a proteína do gene referência e a proteína predita a partir da mutação.

Figura 35. Estrutura do gene FOXL2.

Figura 36. Esquema de comparação do gene e da proteína FOXL2 normal e com a mutação g.864delT.

RESUMO

A falência ovariana prematura (FOP) é uma desordem com repercussões importantes para a vida da mulher, tanto no que concerne ao fim da capacidade reprodutiva, quanto ao déficit hormonal estrogênico. As causas de FOP são bastante variadas e incluem alterações infecciosas, imunológicas, iatrogênicas e genéticas. Devido aos avanços nas últimas décadas na área de biologia molecular, muitas alterações genéticas até então desconhecidas têm sido identificadas como possíveis causas de FOP. Dentre estas estão, por exemplo, as alterações ou mutações nos receptores das gonadotrofinas, FSH e LH, essenciais para o funcionamento ovariano. Em alguns casos a FOP de causa genética pode estar relacionada a alguma síndrome como a de Turner e a da Blefarofimose-Ptose-Epicanto Inverso (BPES). A BPES é uma síndrome rara, com padrão de herança autossômica dominante, mas pode se apresentar como casos esporádicos. Tem como principais características certas malformações palpebrais, podendo ou não estar associada à infertilidade e a FOP. Recentemente, identificou-se que o gene *FOXL2* é responsável por esta síndrome. O gene *FOXL2* codifica uma proteína que funciona como fator de transcrição da classe *forkhead/winged helix* e, quando alterado, pode produzir proteínas truncadas (BPES tipo-I) ou proteínas alongadas (BPES tipo-II). O diagnóstico da síndrome da Blefarofimose é eminentemente clínico, entretanto procedimentos diagnósticos realizados através de técnicas de biologia molecular podem contribuir para um diagnóstico mais preciso. A pesquisa de mutações no gene *FOXL2* de indivíduos afetados pela doença pode contribuir para uma avaliação do

prognóstico dos pacientes, bem como permitir aconselhamento genético. O presente estudo teve por objetivo pesquisar o tipo de mutação presente em uma mulher com sinais clínicos da BPES, bem como avaliar se o caso foi uma mutação nova ou transmitida de forma hereditária. Foram estudados a mulher portadora de BPES e seus progenitores. Através da utilização de técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) e seqüenciamento direto foi identificada uma mutação nova (esporádica), tipo deleção, de um único nucleotídeo (timidina - base 792 do gene) no gene *FOXL2* da referida paciente. A mutação descoberta determina a produção de uma proteína truncada, com eliminação da seqüência poli-Alanina e com um códon de terminação prematura, levando a ocorrência do fenótipo em questão.

Palavras chave: Falência ovariana prematura, BPES, *FOXL2*, mutação.

ABSTRACT

Premature ovarian failure (POF) is a disorder with very important repercussions for woman life, either regarding the end of reproductive lifespan or the consequent estrogenic hormonal deficiency. The number of POF causes is quite a lot, including infectious diseases as well as immunologic, iatrogenic and genetic disorders. Since the advances in past decades in the molecular biology field, many genetic disorders unknown, until then, have been identified as possible causes of POF. Among these, the mutations in gonadotropins FSH and LH receptors, essential for the ovarian function. In some cases the genetic cause of POF can be related to some syndrome like Turner's Syndrome and the Blepharophimosis-Ptoxis-Epicanthus inversus Syndrome (BPES). The BPES is a rare syndrome, of hereditary character for dominant autosomal inheritance, but it can be presented as new mutation in the family. It has as main characteristics some eyelid malformations associated or not to infertility and POF. Recently was identified that the gene *FOXL2*, is responsible for the BPES syndrome. The *FOXL2* codifies a protein that functions as transcription factor, the *forkhead/winged helix* class of proteins, and when modified it can produce truncated proteins (BPES type I) or elongated proteins (BPES type II). The diagnosis of the BPES is basically clinic, however diagnostic tests carried through techniques of molecular biology can contribute for a more accurate diagnosis. The research of mutations in gene *FOXL2* of the affected individuals can contribute for an evaluation of the prognosis of the patients, as well as allowing a genetic counseling. The present study it had for objective to search the type of mutation present in a patient with

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Excluído:

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Fonte: Itálico, Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Excluído:

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

clinical signals of the BPES, as well as evaluating if it was a new mutation or was transmitted in a hereditary form. A affected BPES woman and her parents had been studied. Through the use of techniques of Polymerase Chain Reaction (PCR) and direct sequencing, a *de novo* (sporadic) mutation was identified, type deletion, of an only nucleotide (timidina - base 792 of the gene) in gene FOXL2 of the related patient. The discovered mutation determines the production of a truncated protein, with elimination of the poly-Alanyne domain and a premature stop codon, becoming it incapable to realize its function, leading to the phenotype of BPES.

Keywords: Premature ovarian failure, BPES, FOXL2, mutation.

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Excluído:

Formatado: Inglês (EUA)

Excluído:

Formatado: Inglês (EUA)

1. INTRODUÇÃO

A falência ovariana prematura (FOP) ou menopausa precoce é uma condição definida como a “interrupção” da função ovariana em mulheres com idade < 40 anos (JAFFE, 1990). Esta desordem é caracterizada por amenorréia (ausência de menstruação) primária ou secundária, deficiência de hormônios esteróides sexuais, principalmente de estrogênio, e níveis elevados de gonadotrofinas (COULAM, 1982).

Torgerson *et al.*, 1997 reportaram em um estudo entre 1081 mulheres, que 88% delas apresentam menopausa após os 45 anos, 9,7% antes dos 45 anos, e, somente 1,9%, abaixo dos 40 anos de idade (TORGERSON *et al.*, 1997). A prevalência de FOP é estimada em 1%, sendo que seu aparecimento antes dos 30 anos ocorre em 0,1% da população feminina (COULAM *et al.*, 1986). Entre mulheres com amenorréia a prevalência de FOP é mais elevada, variando de 4% a 28% dependendo do tipo de amenorréia (COULAM *et al.*, 1986; ANASTI, 1998).

A perda precoce da função ovariana pode levar a diversas implicações na saúde da mulher. Sequelas psicológicas provocadas pela ausência de menstruação, pelo estigma de menopausa precoce, além da própria infertilidade, podem estar presentes. Outras alterações importantes como disfunções sexuais, alterações teciduais (ressecamento vaginal), aumento no risco de osteoporose e de doenças cardiovasculares também estão relacionadas à falência ovariana precoce (TAYLOR, 2001).

As causas de FOP são bastante variáveis, e uma ampla gama de mecanismos etiopatogênicos podem estar envolvidos no seu desenvolvimento. Estes

Formatado: Fred_texto,
Espaçamento entre linhas:
simples

mecanismos incluem alterações imunológicas (doença de Addison, hipotireoidismo), infecciosas (caxumba, varicela), cromossômicas (Síndrome de Turner), gênicas (mutações nos receptores de FSH e LH), metabólicas (Galactosemia) e iatrogênicas (cirurgias pélvicas, radioterapia e quimioterapia) como as principais causas de FOP (GOSWAMI & CONWAY, 2005). Apesar disto, grande parte dos casos permanece sem diagnóstico etiológico estabelecido (VEGETTI *et al.*, 2000).

O mecanismo fisiopatológico que leva à FOP tem por base dois tipos de alteração, a depleção total dos folículos ovarianos (deficiência inicial de folículos ou atresia folicular acelerada) e a disfunção folicular (número normal de folículos no ovário) (ANASTI, 1998; LAML *et al.*, 2002).

O desenvolvimento e aprimoramento das técnicas de biologia molecular nas últimas décadas têm permitido, cada vez mais, que certos casos de FOP com causa originalmente incerta possam ter o diagnóstico genético esclarecido. Dentre as causas genéticas de FOP destacam-se as alterações no cromossomo X tais como a Síndrome de Turner (45,X), a Síndrome do X Frágil e deleções ou translocações de alguns locos deste cromossomo. Entretanto, anormalidades em cromossomos autossômicos têm sido identificadas em mulheres com FOP (LAML *et al.*, 2002).

Os principais distúrbios autossômicos associados à FOP são decorrentes de mutações nos seguintes genes: do receptor de FSH, do receptor do LH, do regulador autoimune (*autoimmune regulator* – AIRE), da *Galactose-1-fosfato uridyl transferase* (GALT), da proteína ligadora do nucleotídeo guanina com atividade polipeptídeo 1 α -estimuladora (*guanine nucleotide-binding protein, α -stimulating*

activity polypeptide 1 - GANS), da enzima P450c17, da enzima P450 aromatase, da BPES e do gene da fosfomanomutase (PMM) (LAML *et al.*, 2002; NELSON & BAKALOV, 2003; LEUNG & ADASHI, 2003; GOSWAMI & CONWAY, 2005).

Algumas das mutações gênicas relatadas podem estar associadas a quadros sindrômicos como é o caso da mutação no gene da fosfomanomutase que leva à Síndrome de Jaeken (ou glicoproteína carboidrato deficiente tipo 1 – CDG1), e da mutação no gene *FOXL2* responsável pela Síndrome da Blefarofimose-Ptose-Epicanto inverso (BPES) tipo-I e tipo-II (LAML *et al.*, 2002). Nestes casos, a FOP é mais uma alteração clínica que, acrescida às outras, vão caracterizar uma determinada síndrome.

A BPES é uma doença de caráter autossômico dominante, determinada principalmente pela presença de malformações palpebrais do tipo blefarofimose, ptose e epicanto inverso. Dois tipos de BPES são descritos, a BPES tipo-I, onde alterações palpebrais estão associadas à FOP, e a BPES tipo-II, em que a alteração ovariana está ausente. Na BPES tipo-I, as mulheres afetadas são inférteis, portanto incapazes de transmitir a doença, entretanto os homens afetados continuam férteis e capazes de transmitir hereditariamente esta alteração. Na BPES tipo-II, a FOP não está presente, portanto mulheres afetadas não se tornam inférteis (CRISPONI *et al.*, 2001). A BPES ocorre devido à mutação no gene *FOXL2*, localizado no cromossomo 3, responsável pela produção de uma proteína fundamental no desenvolvimento tanto do ovário quanto da pálpebra. Estudos demonstram que a produção de uma proteína truncada leva à BPES tipo-I e a produção de uma proteína alongada origina a BPES tipo-II (CRISPONI *et al.*, 2001; DE BAERE *et al.*, 2001; BEYSEN *et al.*, 2005).

Excluído: ¶

A transmissão hereditária da BPES obedece a um padrão de doença autossômica dominante, e, em mais de 50% dos casos, a alteração decorre de uma mutação nova, portanto ausente nos progenitores do indivíduo afetado. Mais de 125 mutações no gene *FOXL2* já foram descritas em indivíduos com BPES tipo-I ou tipo-II (BEYSEN & DE BAERE, 2006).

Desta forma, a confirmação diagnóstica de uma alteração genética, em indivíduo com quadro clínico da BPES é de suma importância. A caracterização do tipo de mutação, bem como do caráter hereditário ou não da mesma, permite uma melhor avaliação do prognóstico reprodutivo do indivíduo e também um aconselhamento genético mais preciso.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Diagnosticar a presença de mutações no gene *FOXL2* em uma mulher com diagnóstico clínico de Síndrome da Blefarofimose Ptose Epicanto Inverso.

Formatado: Fred_texto,
Recuo: Primeira linha: 0 cm,
Espaçamento entre linhas:
simples, Tabulações: Não em
1.69 cm

Objetivos específicos

Identificar o tipo de mutação presente no gene *FOXL2* em uma mulher com diagnóstico clínico de BPES.

Fazer o diagnóstico genético parental com a finalidade de verificar se a mutação no caso índice constitui uma mutação nova ou herdada.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Infertilidade é definida como a incapacidade que um casal, com atividade sexual regular e sem o uso de métodos contraceptivos, tem de conceber após um período de 12 meses (THONNEAU *et al.*, 1991) ou 24 meses (THE ESHRE CAPRI GROUP, 2001). Atinge aproximadamente 15% dos casais em idade reprodutiva e que desejam ter filhos. As causas da infertilidade podem ser de origem feminina, masculina ou mista, neste caso, quando estão presentes em ambos os parceiros (THONNEAU *et al.*, 1991). Várias são as causas de infertilidade, definidas mais comumente como fatores, sendo os mais frequentes: o fator tubário, a endometriose, o fator uterino, o fator ovulatório, e o fator masculino. Em cerca de 8% a 15% dos casos não se consegue definir a causa da infertilidade, sendo, estes casos classificados como infertilidade sem causa aparente (ISCA) ou inexplicada (THONNEAU *et al.*, 1991; CROSIGNANI *et al.*, 1993).

Dentre as causas de infertilidade de origem feminina o fator ovulatório é o que apresenta maior prevalência, podendo estar presente em 25% a 27% dos casos (WHO, 1992; COLLINS, 1995). Estas desordens ovulatórias levam a um quadro de anovulação ou oligoovulação que se caracterizam por irregularidade menstrual, amenorréia ou oligomenorréia (BARBIERI, 2004). A amenorréia que é definida como ausência de menstruação, podendo ser dividida em amenorréia primária e secundária. Amenorréia primária constitui a ausência de menstruação em meninas com 14 anos ou mais sem sinais de desenvolvimento sexual secundário (mamas, pêlos pubianos e axilares) ou ainda meninas com 16 anos ou mais, mesmo na

presença de características sexuais secundárias. Já a amenorréia secundária é a ausência de menstruação por período que compreende pelo menos três intervalos dos ciclos menstruais prévios ou noventa dias consecutivos (BUSSO *et al.*, 1999; SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 401).

Várias doenças distintas estão relacionadas à infertilidade e à anovulação, podendo ser separadas em grupos dependendo das concentrações séricas de estrogênio e das gonadotrofinas, hormônio do folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). De acordo com a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), os casos de disfunções ovulatórias são divididos em três grupos, sendo: Grupo I – Hipogonadismo Hipogonadotrófico, Grupo II – Anovulação Normogonadotrófica e Grupo III – Hipogonadismo Hipergonadotrófico (WHO, 1976). O hipogonadismo hipogonadotrófico é uma entidade clínica caracterizada por disfunção ovariana com produção mínima de estradiol, em decorrência da ausência ou baixa produção de gonadotrofinas devido à disfunção do sistema nervoso central (SNC), hipotálamo ou hipófise. Em geral é de causa idiopática, mas pode ser provocada por lesões estruturais (traumas, tumores ou lesões infiltrativas), alterações genéticas ou alterações funcionais (anorexia nervosa, bulimia, desnutrição e estresse). Os casos de anovulação normogonadotrófica são em sua grande maioria representados pela anovulação crônica decorrente da Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP). Já as causas das disfunções ovulatórias do tipo hipogonadismo hipergonadotrófico são extremamente variáveis. Mulheres com persistência do quadro clínico e laboratorial são identificadas como portadoras de falência ovariana. A falência ovariana habitualmente ocorre após 40 anos de idade, quando a função ovariana declina juntamente com o período reprodutivo da mulher,

Excluído:

Excluído:

Excluído:

iniciando-se então o período do climatério. O seu aparecimento antes desta idade é definido como uma alteração conhecida como falência ovariana prematura (FOP) (BARBIERI, 2004).

3.1. O Ovário Humano

3.1.1 Anatomia do ovário

O ovário humano é um órgão intra-abdominal, em número de dois, com formato alongado, que mede entre 25 a 50 mm de comprimento; 7 a 16 mm de largura e 10 a 30 mm de espessura, com volume habitual entre 2,0 e 9,0 cm³ que varia de acordo com seu estado de atividade ou supressão, como com o uso de contraceptivo hormonal oral (PONTE, 1993; DE LANCEY, 1997). Localiza-se posteriormente ao ligamento largo, lateralmente ao útero e inferiormente à trompa de falópio. A extremidade lateral do ovário está fixada à parede pélvica através do ligamento infundíbulo-pélvico, também conhecido como ligamento suspensor do ovário, pelo qual chegam e saem do ovário a artéria e veia ovarianas. Medialmente o ovário se liga ao útero pelo ligamento uterovariano, localizado póstero-inferiormente à inserção da trompa de falópio ao útero (DE LANCEY, 1997). Apresenta-se na sua maior porção como superfície livre, embora apresentando uma fixação ínfero-posterior ao ligamento largo através do mesovário (PONTE, 1993; DE LANCEY, 1997).

O ovário adulto, maduro, consiste de três porções ou zonas maiores: a porção externa ou córtex, a porção central ou medula e o hilo ovariano. O córtex

ovariano é recoberto por uma única camada de células cubóides, especializada, denominada epitélio de superfície ovariano ou mesotélio ovariano. A porção externa do córtex consiste de uma camada de tecido conectivo denominada túnica albugínea. A parte interna do córtex compreende os oócitos organizados em estruturas chamadas folículos ovarianos entremeados por tecido estromal (LEUNG & ADASHI, 2003; SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97). Os folículos ovarianos em repouso situam-se em área pouco vascularizada próximos à túnica albugínea, enquanto os folículos em crescimento, os atresícos e o corpo lúteo em involução ao contrário, localizam-se na porção cortical próxima a medula, região que é altamente vascularizada. O estroma ovariano é composto por tecido conectivo e células intersticiais, que são derivadas das células mesenquimais e têm capacidade de responder ao LH e ao hormônio gonadotrofina coriônica (HCG) com a produção de andrógenos (SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97).

A medula do ovário é derivada em grande parte das células mesonéfricas e contém tecido conectivo de densidade variável que compreende células estromais, vasos sanguíneos, linfáticos e remanescentes embriológicos como a *rete ovarii*, um condensado de túbulos e células de Leydig no hilo ovariano. O hilo é o ponto de ligação do ovário com o mesovário e contém vasos, nervos e células do hilo, que têm potencial de se tornarem ativas na esteroidogênese e de formar tumores (SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97). **(Figura 1 e Figura 2).**

Formatado: Português (Brasil)

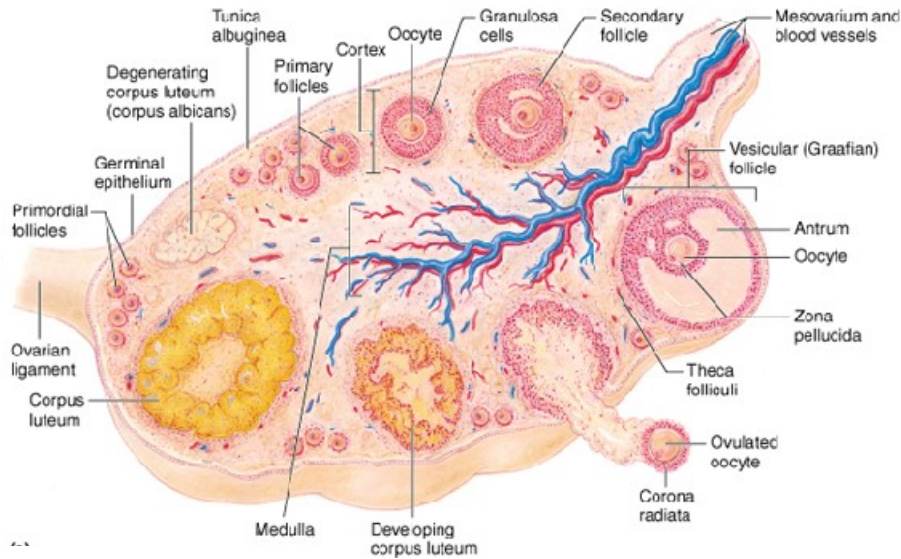


Figura 1. Anatomia interna do ovário humano. Mostra o epitélio germinativo externamente, a região de córtex e medula do ovário com seus componentes. Disponível em <http://www.colorado.edu/kines/iphy4480tsai/ovary.jpg>, acesso em 10/11/2006.

Código de campo alterado

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

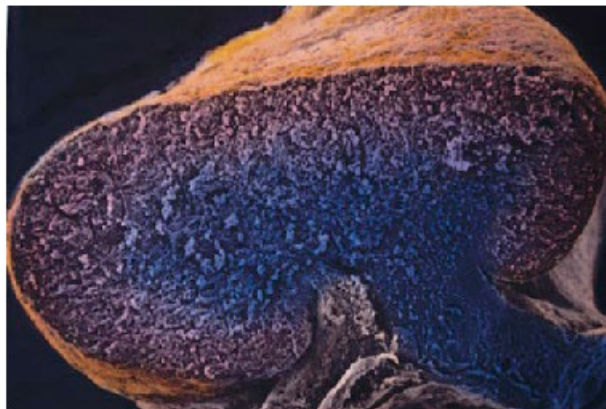


Figura 2. Secção de ovário humano em desenvolvimento. Embrião humano de 9/10 semanas de idade. Área cortical (rosa) e medular (azul) se tornaram aparentes. Em amarelo epitélio de superfície ovariano. Escaneado por microscopia eletrônica, magnificação original x85. (MOTTA *et al.*, 1997).

3.1.2 Desenvolvimento ovariano

O desenvolvimento gonadal em embriões humanos inicia-se durante a quinta semana de gestação, com a formação de protuberâncias sobrejacentes aos ductos mesonéfricos denominadas cristas gonadais. As células germinativas primordiais originam-se do ectoderma primitivo, e a partir da terceira semana de desenvolvimento embrionário são identificadas no endoderma da parede posterior do saco vitelínico, próximo ao alantóide. Entre a quarta e sexta semanas de gestação estas migram para o epitélio celômico das cristas gonadais. Este processo de migração ocorre por deslocamento devido ao crescimento embrionário e também através de movimentos amebóides ativos das próprias células germinativas (MOTTA *et al.*, 1997; LEUNGH & ADASHI, 2003; SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97). Os fatores que orientam este processo de migração ainda são desconhecidos, entretanto sabe-se que há participação direta de peptídeos quimiotáticos e adesivos, bem como da matrix extracelular (MOTTA *et al.*, 1997; SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97).

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

A crista gonadal é o único sítio onde as células germinativas podem sobreviver (MOTTA *et al.*, 1997; LEUNGH & ADASHI, 2003; SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97). Apesar das células germinativas não serem responsáveis pela indução do desenvolvimento gonadal, caso não ocorra a migração e a chegada das mesmas à crista gonadal, as gônadas não se desenvolverão e apenas um traço fibroso característico da agenesia gonadal vai existir (MOTTA *et al.*, 1997; LEUNGH & ADASHI, 2003; SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97). Nesta fase do desenvolvimento, além das células germinativas primitivas, a gônada é composta por células somáticas

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

derivadas de pelo menos três diferentes tecidos: o epitélio celômico, o mesênquima e o tecido mesonéfrico (SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97).

Formatado: Português (Brasil)

Até a sexta semana de gestação a gônada permanece indiferenciada, portanto gônadas 46,XX ou 46,XY são indistinguíveis, mas bi-potenciais, possuindo ambas as áreas cortical e medular, com capacidade de se diferenciar tanto em ovário quanto em testículo. A partir da sexta até a nona semana de gestação, em embriões do sexo masculino 46,XY, a gônada se desenvolve para a formação de testículo. Caso contrário, em embriões do sexo feminino, 46,XX, a gônada se diferencia em ovário em período um pouco mais tardio do desenvolvimento embrionário, a partir de nove semanas de gestação. A presença do cromossomo Y determina a diferenciação da gônada em testículo (MOTTA *et al.*, 1997; LEUNGH & ADASHI, 2003; SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97). (Figura 3)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

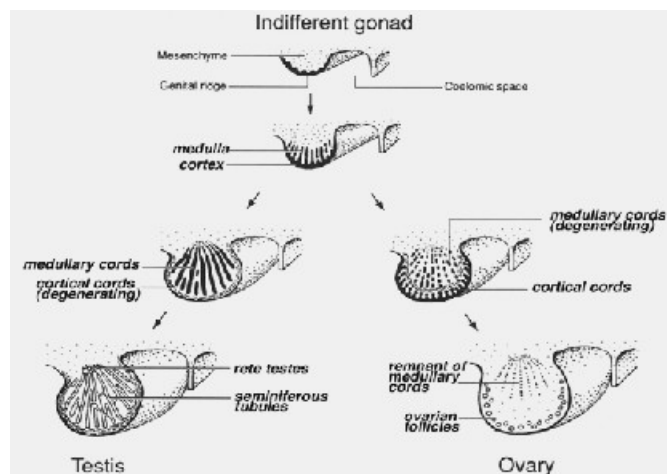


Figura 3. Esquema de diferenciação gonadal. Mostra a bi-potencialidade da gônada indiferenciada. Disponível em <http://www.colorado.edu/kines/jphy4480tsai/ovary.jpg> em 07/11/2006.

Excluído:

Código de campo alterado

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Hyperlink, Fonte: Arial, Português (Brasil)

Estudos realizados nos últimos quinze anos demonstraram a presença de uma região ou de um gene no braço curto do cromossomo Y, chamado *Sex*

Determining Region Y (SRY), como sendo o único gene necessário para a determinação sexual (BERTA *et al.*, 1990; SINCLAIR *et al.*, 1990). Trata-se de um gene de éxon único, localizado no braço curto do cromossomo Y, com capacidade para diferenciação sexual masculina. O gene SRY codifica para uma proteína de 204 aminoácidos que contém um domínio de 79 aminoácidos com um motivo compartilhado por uma família de fatores de transcrição que se ligam ao DNA e regulam transcrição de genes (HARLEY *et al.*, 1992; NASRIN *et al.*, 1991). Este gene controla diretamente o desenvolvimento masculino através da regulação seqüência-específica de determinados genes (JAGER *et al.*, 1990; KOOPMAN *et al.*, 1990; MOORE *et al.*, 1992; MULLER *et al.*, 1992; HAQQ *et al.*, 1993; HARLEY *et al.*, 2003).

Formatado: Português (Brasil)

Os genes SRY-like box (*SOX*) são similares em seqüência ao *SRY*, mas não estão localizados no cromossomo Y. Em homens, a expressão do *SRY* é acompanhada pela ativação do gene *SOX9* que continua durante todo o desenvolvimento testicular. Como consequência do aumento na expressão do gene *SRY* há uma diminuição da atividade ou inativação do gene *dosage-sensitive sex reversal/adrenal hypoplasia critical region X (DAX-1)* que funciona como um inibidor dos genes relacionados ao desenvolvimento testicular. Na ausência do *SRY* há inativação do gene *SOX9* devido à maior expressão do gene *DAX-1*. As células-alvo das proteínas sintetizadas a partir destes genes são indiferenciadas, podendo se transformar tanto em células de Sertoli (presentes no testículo) como em células da granulosa, importantes na formação e funcionamento do ovário (HAQQ *et al.*, 1993; TILMANN & CAPEL, 2002; HARLEY *et al.*, 2003; MEEKS *et al.*, 2003; SCHMAHL & CAPEL, 2003). No homem a expressão do gene *SOX9* desencadeia a

ativação dos fatores de transcrição do hormônio anti-mülleriano (AMH – *anti-müllerian hormone*), responsável pela inibição do desenvolvimento dos ductos de Müller em órgãos genitais femininos (SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97).

Formatado: Português (Brasil)

Quando o cromossomo Y está ausente, a gônada indiferenciada se transforma em ovário. Baseado neste aspecto, por muito tempo se estabeleceu que a determinação sexual ou gonadal feminina fosse uma via padrão (constitutiva) e que se modificaria apenas com a presença do cromossomo Y. Entretanto, estudos posteriores demonstraram uma provável atuação de genes específicos, com participação direta na diferenciação da gônada primitiva em ovário (BARDONI *et al.*, 1994; LEUNGH & ADASHI, 2003; SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97). O gene *DAX-1*, localizado no braço curto do cromossomo X (Xp21), foi um candidato importante para esta tarefa, pois se demonstrou que quando duplicado poderia redirecionar embriões XY para uma diferenciação gonadal feminina (BARDONI *et al.*, 1994). Entretanto, experimentalmente foi demonstrado que ratos XX sem *Ahch* (gene homólogo ao *DAX-1* humano) inesperadamente mostraram diferenciação gonadal ovariana, contrariando a possibilidade de este gene ser o responsável pela diferenciação ovariana primária (YU *et al.*, 1998).

Formatado: Português (Brasil)

Existem outros genes envolvidos no desenvolvimento gonadal como o gene do fator esteroidogênico 1 (*SF-1*, *Steroidogenic factor-1*) e o gene supressor do tumor de Wilms (*WT1* - *Wilms' tumor supressor gene*) (ACHERMANN *et al.*, 2001; GURATES *et al.*, 2003; HARLEY *et al.*, 2003; FLEMING & VILAIN, 2004; SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97;). No período indiferenciado das gônadas, a ausência destes genes leva a um desenvolvimento gonadal anormal. O gene *SF-1* pertence a uma superfamília de receptores nucleares e atua na regulação de

Excluído:

Formatado: Português (Brasil)

transcrição de outros genes juntamente com fatores co-reguladores, como *DAX-1*, *SOX9* e *WT1*, no processo de determinação sexual masculina e formação testicular (HARLEY *et al.*, 2003). O *SF-1* e *DAX-1* são receptores nucleares denominados “receptores órfãos”, visto que não foram identificados efetores específicos para estes receptores. As interações destes genes são complexas e importantes na transcrição de genes envolvidos tanto na determinação sexual como no desenvolvimento gonadal e na esteroidogênese (SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97).

Excluído:

Formatado: Português (Brasil)

O *SF-1* é importante no desenvolvimento da glândula adrenal, do testículo, do ovário, dos gonadotrófos hipofisários e do hipotálamo (PARKER *et al.*, 2002). No ovário, o *SF-1* tem atuação na mediação da ativação de genes nas células da teca e da granulosa estimuladas pelo LH e FSH (GURATES *et al.*, 2003). O *WT1* é um dos genes no cromossomo 11 deletados em pacientes com tumor de Wilms. Este gene codifica para um fator de transcrição tipo dedo de zinco e regula a expressão de vários genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular, constituindo-se em um fator essencial ao desenvolvimento da gônada e do rim. O *WT1* é importante para o desenvolvimento gonadal masculino e interage com o gene *SF-1* na regulação para cima do hormônio anti-mülleriano, que inibe o desenvolvimento dos ductos de Müller em órgãos do aparelho reprodutivo feminino (PELLETIER *et al.*, 1991; ACHERMANN *et al.*, 2001; GURATES *et al.*, 2003; HARLEY *et al.*, 2003).

Excluído:

Excluído:

Excluído:

Excluído:

Outro gene envolvido no desenvolvimento gonadal e urogenital é o *Wingless-type MMTV integration site family, member 4 (Wnt-4)*, um membro da família *Wingless-type (Wnt)* de moléculas de glicoproteínas de sinalização (LEUNG & ADASHI, 2003; DOMINICE *et al.*, 2004; FLEMING & VILAIN, 2004). Durante o desenvolvimento, o *Wnt-4* é expresso nos mesonéfrons e no epitélio celômico da

região onde se formará a gônada. Estudos com cobaias demonstraram que este gene participa de forma direta no desenvolvimento ovariano e dos ductos de Müller (VAINIO *et al.*, 1999; JORDAN *et al.*, 2001; FLEMING & VILAIN, 2004). Além destas funções parece que o gene *Wnt-4* previne ou evita a diferenciação das células de Leydig no ovário e atua de forma semelhante ao *DAX-1* como um gene anti-testículo (DOMINICE *et al.*, 2004). Estudos mais recentes identificaram, em ratos com deleção do gene do receptor estrogênico e do gene da aromatase, que a atividade estrogênica é necessária para produzir um ovário normal, com diferenciação e desenvolvimento de células somáticas características da gônada feminina (BRITT & FINDLAY, 2003).

Excluído:

O modelo proposto na publicação de Harley *et al.*, 2003, da atuação dos genes envolvidos no processo de determinação e diferenciação sexual, deixa bem claro que existe uma interação de diversos genes com produtos que podem atuar como fatores de transcrição, como sinalizadores estimulando ou inibindo o desenvolvimento sexual feminino ou masculino. Mutações destes genes podem levar a anormalidades na formação e desenvolvimento gonadal e sexual (HARLEY *et al.*, 2003). Entretanto, em estudo realizado no Brasil com pacientes 46,XX e 46,XY com sexo fenotípico contrário ao gonadal, onde foram pesquisados a presença de mutações nos genes *SRY*, *DAX-1*, *SF-1* e *Wnt4* concluiu-se que estes genes estão raramente envolvidos na etiologia do desenvolvimento gonadal masculino em indivíduos com reversão de sexo (DOMINICE *et al.*, 2004) (**Figura 4**).

número de células germinativas é determinado unicamente pela intensidade das divisões mitóticas (ADASHI, 1995).

O processo de divisões mitóticas intensas persiste até a oitava semana de gestação quando o número total de oogônias atinge 600.000. Deste ponto em diante o estoque ou a reserva final de oogônias passa a ser dependente de três processos distintos, porém simultâneos e contínuos: as mitoses das oogônias que acontecem até 28 semanas de gestação, as divisões meióticas que convertem oogônias em oócitos primários e a atresia das oogônias que atinge a máxima intensidade por volta de 20 semanas de gestação (ADASHI, 1995; ANASTI, 1998). O efeito final da interação desses três processos é o pico do número total de oogônias de 6 a 7 milhões ao final da vigésima semana de gestação, das quais $\frac{2}{3}$ são oócitos primários intrameióticos e o restante são oogônias (ADASHI, 1995; ANASTI, 1998; SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97). Após a metade da gestação, há um declínio importante da taxa de mitoses e, em contrapartida, uma elevação da taxa de atresia das oogônias. Em decorrência destes eventos, a partir da vigésima semana de gestação, inicia-se uma trajetória progressiva e irreversível de diminuição do estoque de células germinativas da gônada (ADASHI, 1995).

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Entre a oitava e décima terceira semanas de desenvolvimento embrionário algumas oogônias saem do ciclo de divisão mitótica e começam a apresentar alterações nucleares, entrando na prófase da primeira divisão meiótica. A partir deste ponto as oogônias dão origem aos oócitos primários que mais tarde serão transformados em folículos primordiais. Após o início da divisão meiótica existe uma suspensão temporária do processo de atresia das oogônias, permitindo que as células germinativas sejam recobertas por células da granulosa para formar os folículos

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

primordiais (ADASHI, 1995; ANASTI, 1998; SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97). As oogônias continuam então seu processo de atresia até o sétimo mês de gestação, não sendo mais encontradas no ovário ao nascimento. Os folículos primordiais recém-formados passam a sofrer o mesmo processo irreversível e progressivo de atresia folicular, fato que ocorrerá durante toda a vida da mulher até que ocorra a exaustão dos folículos ovarianos, com a chegada da menopausa, por volta dos 50 anos de idade (ADASHI, 1995; ANASTI, 1998; LEUNG & ADASHI, 2003; SPEROFF, 2005). A perda de células germinativas ocorre, portanto, através de todas as fases de sua evolução, durante as mitoses das células germinativas, durante os vários estágios das divisões meióticas e após a formação folicular (MOTA & MAKABE, 1986a; MOTA & MAKABE, 1986b; SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97) (**Figura 5**).

Em decorrência da atresia folicular, o número total de folículos primordiais nos ovários ao nascimento será de 1 a 2 milhões, e, na puberdade, este número cai para 300.000 a 500.000 unidades foliculares. A mulher recebe este estoque finito de folículos durante o desenvolvimento fetal, e, posteriormente, nenhum folículo primordial é formado. Durante os próximos 35 a 40 anos somente 400 a 500 folículos (0,007% dos 7 milhões de folículos originais) serão selecionados para ovular e o restante sofrerá processo de depleção contínua pela atresia folicular (ADASHI, 1995; ANASTI, 1998; LEUNG & ADASHI, 2003; GOSWAMI & CONWAY, 2005; SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97;). Todas estas evidências contribuem para o raciocínio lógico de que a vida útil do ovário na produção de um gameta é dependente do número inicial de folículos formados durante a vida fetal, e da taxa de atresia folicular da gônada. Alterações na multiplicação das células germinativas e na taxa de atresia folicular podem resultar em uma falência ovariana

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

prematura (ADASHI, 1995; ANASTI, 1998; LEUNG & ADASHI, 2003; SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 97) (Figura 6),

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

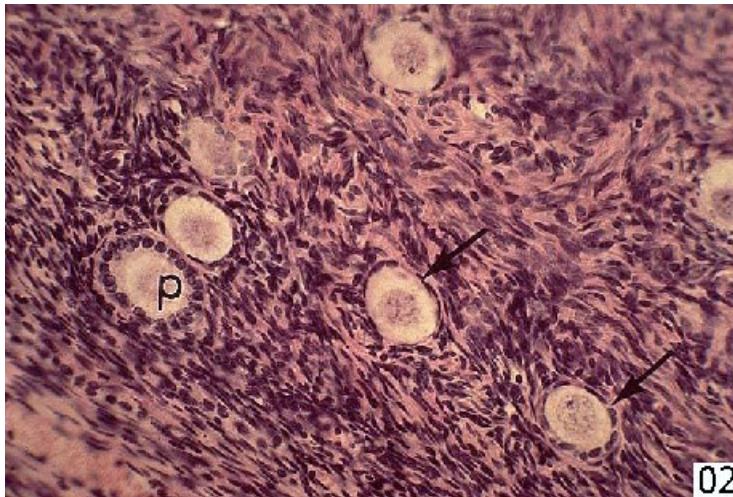


Figura 5. Foto de microscopia de ovário humano. Mostra folículos primordiais (setas) com uma camada única de células aplainadas e folículo primordial (p) com epitélio cubóide de células mais arredondadas (<http://www.histology.wisc.edu/histo/uw/htm/tfmbase.htm>).

Formatado: Português (Brasil)

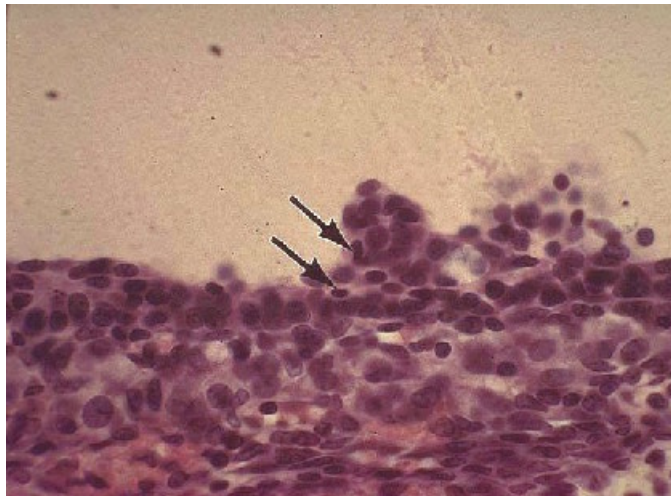


Figura 6. Microscopia mostrando membrana granulosa de folículo em atresia. Em folículos atresícos, as células da granulosa encolhem de tamanho, e o núcleo se torna picnótico – condensado e escurecidos (setas) (<http://www.histology.wisc.edu/histo/uw/htm/tfmbase.htm>).

Excluído:

3.1.4 Apoptose folicular

A atresia folicular ocorre através do processo de morte celular programada conhecida como apoptose. Evidências morfológicas e bioquímicas confirmam que a atresia folicular apresenta características e mecanismos indistinguíveis dos que acontecem na apoptose (HUGUES *et al.*, 1991; TILLY *et al.*, 1991; ADASHI, 1995; AMSTERDAM *et al.*, 1998; ABIR *et al.*, 2003; AMSTERDAM *et al.*, 2003a; AMSTERDAM *et al.*, 2003b; HUSSEIN, 2005). A apoptose é um processo de suicídio celular, geneticamente regulado, que requer uso de energia e pode ser amplamente observado entre os seres vivos. Trata-se de um evento morfológicamente distinto do processo de degeneração da necrose celular e permite um descarte seguro das células após cumprirem sua função biológica. As características ultra-estruturais da apoptose incluem quatro pontos principais: condensação da cromatina nuclear em massas circunscritas, convoluções do delineamento celular e nuclear, fragmentação da célula, produção de corpos apoptóticos no limite da membrana e fagocitose dos corpos apoptóticos por macrófagos (HUSSEIN, 2005).

Segundo Hussein, a apoptose é importante em muitos aspectos do funcionamento ovariano. Várias vias moleculares atuam na apoptose, dentre as quais se destacam as proteínas da família célula B/Linfoma 2 (Bcl-2 - *B cell/lymphoma-2 family*), o fator de necrose tumoral (TNF - *Tumor necrosis factor family*), as caspases e o fator transformador de crescimento β (TGF- β - *Transforming growth factor- β family*). Ainda segundo este autor, as moléculas envolvidas nestas vias podem ser separadas em quatro classes: 1 - moléculas envolvidas na sobrevivência folicular,

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Fonte: Itálico, Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Fonte: Itálico, Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Fonte: Itálico, Português (Brasil)

Formatado: Fonte: Itálico, Português (Brasil)

Formatado: Fonte: Itálico, Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

incluindo Bcl-2, TGF- β , c-Kit, *NOBOX* (*Newborn Ovary Homeobox-encoding gene*), Neurotropinas (NTS – *Neurotrophins*), sobrevivina, proteína inibidora da apoptose ligada ao X (XIAP – *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*), receptor aryl hidrocarbonato (AHR – *Aryl Hydrocarbon Receptor*), proteína morfogenética do osso (BMP – *Bone Morphogenetic Protein family*), *GATA-4*, fator de célula tronco (SCF – *Stem Cell Factor*), integrina e hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH – *Gonadotropin Releasing Factor*); 2 – moléculas envolvidas na atresia folicular, incluindo FAS (TNF - *receptor superfamily, member 6*), caspases, TNF, TVB, Par-4 (*Prostate apoptosis response 4*), p53, proibitina, celular mielocitomatose (c-Myc – *cellular myelocytomatosis oncogene*), interferon e endotelinas (ET – *endothelins*); 3 – moléculas envolvidas na seleção/perda folicular, incluindo Bcl-2, Bax (*BCL2-associated X protein*), FSH, inibina, FAS ligand (TNF *superfamily, member 6*) e caspases e 4 – moléculas envolvidas na luteogênese, incluindo FAS/FAS ligand, caspase 3, Bax, proibitina, BMP ligand e BMP receptor e PGF2 (*prostaglandin F2alpha*). (HUSSEIN, 2005) (**Figura 7**).

Formatado: Fonte: Itálico, Português (Brasil)

Formatado: Fonte: Itálico, Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Fonte: Itálico, Português (Brasil)

Formatado: Fonte: Itálico, Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Fonte: Itálico, Português (Brasil)

Formatado: Fonte: Itálico, Português (Brasil)

Formatado: Fonte: Itálico, Português (Brasil)

Formatado: Fonte: Itálico, Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

No ovário, o processo de apoptose depende de uma estreita inter-relação entre moléculas pró-apoptóticas e pró-sobrevivência. A morte celular programada ocorre nos folículos ovarianos através da vida fetal e adulta da mulher. Na vida fetal, a apoptose ocorre nos oócitos, e, na vida adulta, nas células da granulosa dos folículos secundários e pré-antrais (HUSSEIN, 2005). A apoptose é um mecanismo essencial para o desenvolvimento e funcionamento dos ovários, sendo responsável pelo controle do relógio biológico feminino. A exaustão da reserva folicular ovariana se deve hipoteticamente a um controle de qualidade, levando a eliminação de anomalias meióticas; a um déficit em fatores de sobrevivência

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

produzidas pelas células somáticas vizinhas; a um auto-sacrifício ou morte altruística (MONNIAUX, 2002). O descontrole entre os fatores pró-apoptóticos e pró-sobrevivência podem levar à modificação na velocidade de atresia folicular, e, conseqüentemente, à exaustão precoce dos folículos ovarianos, com conseqüente FOP (HUSSEIN, 2005).

Formatado: Português (Brasil)

Excluído:

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Molecules	Action	Mechanisms of action	References
bcl-2	Pro-survival	Apaf-1/caspases/Bax interactions	Van Nassauw <i>et al.</i> (1999)
Bax	Pro-apoptotic	p53/Bcl-2/Bcl-XL/c-Myc interactions	Van Nassauw <i>et al.</i> (1999)
Bok	Pro-apoptotic	Bok/cytochrome <i>c</i> interaction	Hsu <i>et al.</i> (1997)
Bad	Pro-apoptotic	Bad/upstream survival factors interaction	Kaipia <i>et al.</i> (1997)
bcl-x	Pro-survival	Bcl-2Md-1/Bax/c-Myc interactions	Marone <i>et al.</i> (1998)
Mcl-1	Pro-survival	Bcl-2Md-1/Bax/c-Myc/Mcl-1/cytochrome <i>c</i> interactions	Leo <i>et al.</i> (1999)
Bcl-XL	Prosurvival	Bcl-2Md-1/Bax/c-Myc interactions	Hussein <i>et al.</i> (2003a)
Boo	Pro-survival	Mcl-1/Apaf-1/caspase 9 interaction	Hussein <i>et al.</i> (2003c)
Bak	Pro-apoptotic	Boo-Apaf-1 disruption	Hussein <i>et al.</i> (2003c)
Bik	Pro-apoptotic	Boo-Apaf-1 disruption	Hussein <i>et al.</i> (2003c)
TNF- α	Pro-apoptotic	TNF/TNFR1/intracellular transducers/caspase Ecl-2 interactions	Yoon <i>et al.</i> (1999)
TRAIL	Pro-survival	TRAIL/TRAIL decoy receptors interaction	Inoue <i>et al.</i> (2003)
Fas and FasL	Pro-apoptotic	Cysteine proteases/ICE/caspases/gonadotrophin interactions	Hu <i>et al.</i> (2001)
TYB	Pro-survival	Interactions with death receptors and domains	Bridgham and Johnson, 2002
Caspases	Pro-apoptotic	Apaf-1/intracellular transducers interactions	Fenwick and Hust, 2002
p53	Pro-apoptotic	Bcl-2/bax/cAMP/clestrin interactions	Tilly <i>et al.</i> (1995)
GATA-4	Pro-survival	GATA-4/gonadotrophins interaction	Heikinheimo <i>et al.</i> (1997)
GATA-6	Pro-survival	GATA-4/gonadotrophins interaction	Heikinheimo <i>et al.</i> (1997)
Prohibitin	Pro-apoptotic	Mitochondrial destabilization	Heikinheimo <i>et al.</i> (1997)
C-Kit	Pro-survival	Interaction with SCF	Felici <i>et al.</i> (1999)
SCF	Pro-survival	c-Kit interactions	Thompson <i>et al.</i> (2004)
c-Myc	Pro-apoptotic	c-Myc/Bcl-2 interaction	Driancourt <i>et al.</i> (2000)
IAP	Pro-survival	Interaction with caspases	Felici <i>et al.</i> (1999)
XIAP	Pro-survival	XIAP/FSH/NF κ B interaction	Delidow/Honda
Inegrin	Pro-survival	Interactions with other extracellular matrix proteins	Honda, 1995
Inegrin- $\alpha 6$	Pro-survival	Interactions with other extracellular matrix proteins	Honda <i>et al.</i> (1995)
Inegrin- β	Pro-survival	Interactions with other extracellular matrix proteins	Honda <i>et al.</i> (1995)
Inegrin- $\beta 4$	Pro-survival	Interactions with other extracellular matrix proteins	Honda <i>et al.</i> (1995)
Interferon	Pro-apoptotic	Interaction with Fas	Wang <i>et al.</i> (2003)
Apaf-1	Pro-apoptotic	Cytochrome <i>c</i> /caspase 9/Boo interaction	Giebel <i>et al.</i> (1997)
NF κ B	Pro-survival	Alterations of pro-survival molecules and caspase inhibitors	Fenwick and Hust, 2002
Survivin	Pro-survival	Inhibits the action of caspases	Deveraux <i>et al.</i> (1999)
Gonadotrophins	Pro-survival	BAX/Apaf-1/Fas/p53 interactions	Peter and Dhanasekaran, 2003
Endothelins	Pro-apoptotic	Binding to two G-protein-coupled receptors	Murphy <i>et al.</i> (2002)
Par-4	Pro-apoptotic	Smad/nuclear co-repressors/co-activators/transcription factors	Boghaert <i>et al.</i> (1997)
Granzyme B	Pro-survival	Allows the apoptotic signals to bypass mitochondria	Amsterdam <i>et al.</i> (2003)
PGF	Pro-apoptotic	Unknown	Orlicky <i>et al.</i> (1992)
NAIPS	Pro-survival	Interaction with gonadotrophins	Matsumoto <i>et al.</i> (1999)
Inhibin	Pro-survival	Unknown	Hsueh <i>et al.</i> (1996)
Activin	Pro-survival	Unknown	Young <i>et al.</i> (2004)
TGF- β 1	Pro-survival	Interaction with Smad/transcription factors	Hosokawa <i>et al.</i> (1998)
TGF- β 2, 3	Pro-survival	Interaction with Smad/transcription factors	Hosokawa <i>et al.</i> (1998)
TGF- β RII	Pro-survival	Interaction with Smad/transcription factors	Bristol and Woodruff, 2004
GDF-9	Pro-survival	Interaction with c-Kit/inhibin- α (folliculogenesis)	Eivin <i>et al.</i> (1999)
BMP	Pro-survival	Unknown (folliculogenesis)	Erickson and Shimasaki, 2003
Smad 2, 4	Pro-survival	Interaction with transcriptional regulators	Chan <i>et al.</i> (2001)
IGF	Pro-survival	Interaction with IGF binding protein	A.Li <i>et al.</i> (1999)
NTS	Pro-survival	Interaction with TrkB kinase receptor	Pardes <i>et al.</i> (2004)
NOBOX	Pro-survival	Interaction with GDF-9	Rajkovic <i>et al.</i> (2004)
AHR	Pro-survival	Interaction with polycyclic aromatic hydrocarbon	Robles <i>et al.</i> (2000)

These molecules can promote survival or death of the oocytes, granulosa or theca cells. They include: IFN = interferons; c-Myc = cellular-Myelocytomatosis; PGF2 = prostaglandin I2- α receptor; par-4 = prostate apoptosis response 4; NAIP = neuronal apoptosis inhibitory protein. AHR = aryl hydrocarbon receptor; NT = neurotrophins; Nobox = newborn ovary homeobox-encoding gene; IGF-I = insulin-like growth factor and its receptors; ET = endothelins; SCF = stem cell factor; XIAP = X-linked inhibitor of apoptosis protein; IAP = inhibitors of apoptosis family; BMP = bone morphogenetic protein; GDF-9 = growth differentiation factor-9; TGF- β = transforming growth factor- β ; Apaf-1 = protease-apoptosis activating factor-1; TRAF = TNFR-associated factors; NF κ B = nuclear factor kappa B; TNF = tumour necrosis factors; Ecl-2 = B cell/lymphoma-2 family. BAX = Bcl-2-associated X protein.

Figura 7. Moléculas envolvidas na dinâmica do desenvolvimento folicular e seus mecanismos de ação. Adaptado de HUSSEIN, 2005.

3.2. Falência Ovariana Prematura

3.2.1. Definições e Epidemiologia

A idade média da menopausa nas mulheres ocidentais é de aproximadamente 51 anos. Falência Ovariana Prematura é a denominação mais utilizada para uma condição na qual estão presentes amenorréia primária ou secundária, hipoestrogenismo e elevação das gonadotrofinas em mulheres, antes dos 40 anos de idade (NELSON *et al.*, 1995; ANASTI, 1998; GOSWAMI & CONWAY, 2005; NELSON *et al.*, 2005). Menopausa precoce, hipogonadismo hipergonadotrófico, amenorréia hipergonadotrófica e insuficiência ovariana são outras denominações também encontradas para designar esta entidade nosológica (NELSON *et al.*, 2005). No início dos anos 30, foi observado níveis anormalmente elevados de gonadotrofinas em mulheres com menopausa precoce. Em 1950, algumas características clínicas da doença foram descritas: amenorréia antes dos 40 anos, sinais e sintomas de hipoestrogenismo, associação com doença viral e efetividade da estrogênio-terapia (ATRIA, 1950).

A FOP não é um problema raro. Coulam *et al.*, 1986, estudando retrospectivamente 1.858 mulheres em Rochester, EUA, estimaram a incidência de 1 caso de FOP em 100 mulheres aos 40 anos, 1 em 250 aos 35 anos e 1 em 1.000 aos 30 anos de idade (COULAM *et al.*, 1986, NELSON & BAKALOV, 2003). Em mulheres com amenorréia primária, a prevalência da FOP varia de 10% a 28%, e, naquelas com amenorréia secundária, ocorre em 4% a 18% dos casos (ANASTI, 1998).

Excluído:

Excluído:

No passado, acreditava-se que todas as mulheres com amenorréia, e níveis repetidamente elevados de gonadotrofinas apresentavam falência ovariana ou menopausa. Em função do diagnóstico firmado, considerava-se que os ovários destas mulheres apresentavam esgotamento funcional, tornando-se irreversivelmente inativos, considerando-se então o fim da capacidade reprodutiva das mesmas. Um estudo sugeriu que níveis elevados de FSH maiores que 40 UI/L se correlacionavam com ausência de folículos primordiais nos ovários (GOLDENBERG *et al.*, 1973). Outro estudo sugeriu que mulheres com dosagem sérica de FSH > 40 UI/L e ausência de sangramento por deprivação após o teste da progesterona (teste pelo qual a paciente faz uso oral de 5 a 10mg de progesterona, por período de 5 a 10 dias, aguardando período de até 1 semana), poderiam ser consideradas permanentemente inférteis (NELSON *et al.*, 1995).

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Estudos posteriores demonstraram a presença de numerosos folículos em biópsias ovarianas e atividade folicular em mulheres com diagnóstico clínico-laboratorial de FOP (JONES & MORAES-RUEHSEN, 1969; SCHREIBER *et al.*, 1978; REBAR & CEDARS, 1992; ANASTI, 1998). Outras publicações ajudaram a retificar o caráter irreversível da FOP. Rebar *et al.*, em 1982, relataram 26 mulheres com FOP diagnosticadas com uma única dosagem de FSH > 40UI/L. Dos 18 casos em que se conseguiu realizar a avaliação do perfil hormonal 9 tiveram evidência de função folicular. Cinco mulheres ovularam e uma ficou grávida (REBAR *et al.*, 1982). Em outro estudo Rebar & Connelly, 1990, relataram que numa série de 115 mulheres com FOP, a ovulação foi encontrada em 24% e gravidez ocorreu em 8% daquelas com amenorréia secundária. Entretanto, nenhuma mulher com amenorréia primária apresentou ovulação (REBAR & CONNELLY, 1990). Conway *et al.*, 1996,

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

estudaram 135 indivíduos e encontraram evidências de função ovariana definidas por níveis elevados de estradiol e/ou por estruturas foliculares à ultra-sonografia, em 60% dos casos (CONWAY *et al.*, 1996). Outros autores também identificaram estruturas foliculares através da ultra-sonografia em 40% das mulheres afetadas (MEHTA *et al.*, 1992). Em estudo prospectivo, com 65 mulheres com FOP e cariótipo normal, Nelson *et al.*, 1994, relataram aproximadamente 50% dos casos com função folicular ovariana, definida por nível de estradiol > 50 pg/mL, e, em 20% ovulação confirmada por concentração de progesterona > 3ng/mL (NELSON *et al.*, 1994). Existem na literatura vários casos de gravidez em mulheres com diagnóstico prévio de FOP, até mesmo em uso de terapia de reposição estroprogestativa (MELO *et al.*, 1999; VITAL-REYES *et al.*, 2004). A gravidez espontânea pode ocorrer eventualmente em até 5% a 10% destas mulheres, e, em alguns casos, muitos anos após o diagnóstico de FOP (VAN KASTEREN & SCHOEMAKER, 1999).

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Excluído:

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

3.2.2. Causas da falência ovariana prematura

A FOP é uma desordem heterogênea que tem um amplo espectro de mecanismos patogênicos responsáveis pelo seu desenvolvimento (HOEK *et al.*, 1997; GOSWANI & CONWAY, 2005). As principais causas de FOP são alterações cromossômicas, genéticas, auto-imunes, metabólicas, infecciosas e iatrogênicas (ANASTI, 1997; VEGETTI *et al.*, 1998; VEGETTI *et al.*, 2000; GOSWAMI & CONWAY, 2005; NELSON *et al.*, 2005). Entretanto em uma grande proporção de casos nenhuma etiologia para FOP será identificada, e estes serão classificados como falência ovariana espontânea idiopática ou cariotipicamente normal (LAML *et al.*,

2000; GOSWAMI & CONWAY, 2005; NELSON *et al.*, 2005). Anasti e outros investigadores preferem separar as causas de FOP em duas categorias distintas. A primeira categoria seria composta de mulheres com FOP por depleção folicular devido à deficiência inicial no número de folículos ou à acelerada atresia folicular. Da segunda categoria, fariam parte os casos de FOP por disfunção folicular (ANASTI, 1995).

Excluído:

Excluído:

A FOP tanto de origem iatrogênica quanto infecciosa tem uma incidência muito baixa quando comparadas com as outras causas. Os ciclos de radioterapia e de quimioterapia, principalmente com agentes alquilantes como a ciclofosfamida podem induzir à FOP. Além destes, procedimentos cirúrgicos com exérese dos ovários também são considerados causas iatrogênicas comuns de FOP (NELSON *et al.*, 2005; SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 401). Os agentes quimioterápicos tem como mecanismo de ação a destruição de tecidos nos quais as células se dividem ou estão se dividindo rapidamente. Portanto, no ovário, a fase inicial de destruição ocorre nas da granulosa e da teca em proliferação, que são os componentes primários do folículo em desenvolvimento. Outros agentes quimioterápicos, como os alquilantes, tem como mecanismo de ação, para a destruição das células, a alteração no DNA celular. A alteração celular produzida por estes agentes contribui para a segunda fase de destruição oocitária, que inclui os folículos primordiais que não estão em fase de proliferação. O efeito gonadotóxico dos quimioterápicos depende da dose, do tipo de droga utilizada e da idade da mulher (ANASTI, 1998; HOWELL & SHALET, 1998; GOSWAMI & CONWAY, 2005).

Excluído:

Formatado: Português (Brasil)

A falência ovariana induzida pela radiação depende da idade da paciente e da dose recebida. O ovário pré-puberal é relativamente resistente a este

tipo de gonadotoxicidade. A transposição cirúrgica dos ovários para fora do campo de exposição da radiação ajuda na preservação da função ovariana (THIBAUD *et al.*, 1992; BEERENDONK & BRAAT, 2005).

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

A ooforite por caxumba é uma das causas infecciosas que podem levar a FOP (MORRISON *et al.*, 1975). Estima-se que apenas 5% das mulheres com caxumba desenvolvem este tipo de infecção gonadal. Entretanto, a grande maioria das mulheres com ooforite por caxumba volta a apresentar função ovariana normal após a recuperação (NELSON *et al.*, 1995). Em estudo retrospectivo em pacientes com FOP, Rebar & Connolly, 1990, notaram que 3,5% destas tinham história prévia de infecções como varicela, shigelose e malária (REBAR & CONNOLLY, 1990). A verdadeira incidência de FOP provocada por infecção viral é desconhecida (ANASTI, 1998).

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Em 1968, Irvine *et al.*, utilizando imunofluorescência indireta, reportaram a associação entre alterações autoimunes e FOP. Inicialmente, a FOP foi descrita em associação com a doença de Addison ou insuficiência da glândula adrenal (IRVINE *et al.*, 1968). Desde então, foram descritas uma gama de evidências que sugerem a existência de várias formas de alterações autoimunes nos ovários que podem levar à FOP (FORGES *et al.*, 2004; LUBORSKY, 2004). Segundo Anasti, 1998, existem muitos fatores que suportam a presença de uma causa imunológica para a FOP, sendo alguns com fortes evidências e outros sem evidências convincentes. Dentre estes fatores destacam-se: associação de FOP com doenças imunes, presença de anticorpos anti-ovarianos, anticorpos contra receptores de gonadotrofinas, contra células esteróides, contra zona pelúcida, evidência histológica de ooforite e o retorno da função ovariana após terapia imunossupressora (ANASTI,

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

1998). Estas evidências surgiram a partir da associação clínica entre FOP e algumas doenças autoimunes, da demonstração de anticorpos anti-ovarianos e de estudos com modelos animais ou estudos com avaliação histológica do tecido ovariano de pacientes afetadas (GOSWAMI & CONWAY, 2005).

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

A associação entre a FOP e doenças autoimunes tem sido descritas há mais de 70 anos. A prevalência da ligação clínica entre doenças autoimunes e FOP pode variar de 10% a 55% dos casos. As associações mais comuns ocorrem com as doenças da tireóide, a síndrome poliglandular autoimune (SPA) e a doença de Addison (FORGES *et al.*, 2004). Entre todas as doenças autoimunes associadas à FOP, as disfunções da tireóide são as mais frequentes, podendo ser detectadas em 12% a 33% dos casos. Em 18% das vezes há relato de doença tireoidiana autoimune (ALPER & GARNER, 1985; ANASTI, 1998; FORGES *et al.*, 2004; GOSWAMI & CONWAY, 2005).

O surgimento da doença de Addison, após período variável de tempo (8 a 14 anos), em mulheres com diagnóstico de FOP, foi um dos primeiros sinais de que a autoimunidade poderia ser responsável pela insuficiência ovariana. A doença de Addison é uma doença incomum, com prevalência de 10 a 20 casos para cada 1 milhão de indivíduos. Ocorre mais frequentemente no sexo feminino em uma proporção de 2,5 mulheres para cada homem afetado. Seu aparecimento decorre da deficiência na produção dos hormônios da supra-renal. A causa é variável, entretanto, em países desenvolvidos, as alterações autoimunes são consideradas as causas mais comuns. Já nos países subdesenvolvidos a tuberculose tem papel importante na determinação desta doença (BETTERLE *et al.*, 2002).

A doença de Addison autoimune em geral está associada ao acometimento de outras glândulas ou órgãos levando à síndrome poliglandular autoimune. Existem três formas clinicamente distintas de SPA, definidas como SPA-I e SPA-II e SPA-III (BETTERLE *et al.*, 2002). A síndrome poliglandular tipo-I caracteriza-se por acometer preferencialmente crianças e pela associação de candidíase mucocutânea, hipoparatiroidismo e doença de Addison. Na SPA tipo-II a doença de Addison está associada ao hipotireoidismo e tem preponderância em mulheres na quarta década de vida. A SPA tipo-III apresenta-se com falência tireoideana e outras síndromes imunológicas exceto a doença de Addison (FORGES *et al.*, 2004; GOSWAMI & CONWAY, 2005). Todos os tipos de SPA podem cursar com FOP, com prevalência de até 60% na SPA tipo-I e tipo-III, e de 10%, na SPA tipo-II (TURKINGTON & LEOVITZ, 1967; HOEK *et al.*, 1997; PERHEENTUPA, 2002; SCHATZ & WINTER, 2002). A prevalência de FOP associada à doença de Addison ou outra alteração adrenal autoimune varia de 2% a 10% (BETTERLE *et al.*, 1993; BAKALOV *et al.*, 2002; BETTERLE *et al.*, 2004).

Outras doenças autoimunes, tanto de origem endócrina (tireóide, paratireóide, diabetes mellitus, hipofisite), quanto de origem não-endócrina (candidíase crônica, púrpura trombocitopênica idiopática, vitiligo, alopecia, anemia hemolítica autoimune, anemia perniciosa, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, doença de Crohn, síndrome de Sjogren), podem estar associadas à FOP (HOEK *et al.*, 1997; BETTERLE *et al.*, 2002).

A presença de autoanticorpos ovarianos e não-ovarianos também está associada à FOP. Vários estudos demonstram um aumento na concentração de autoanticorpos antiperoxidase tireoidiana e contra células parietais. Os autoanticorpos

mais frequentemente associados a FOP são os anticorpos antitireoidianos (FORGES *et al.*, 2004; GOSWAMI & CONWAY, 2005).

Os autoanticorpos antiovarianos foram reportados em mulheres com FOP em vários estudos. A prevalência de anticorpos antiovarianos nestas mulheres é muito variável podendo estar presente em 0% a 69% dos casos (ANASTI, 1998). Dentre os métodos disponíveis para a pesquisa de anticorpos antiovarianos, o ensaio imunoenzimático ELISA (ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*) e a imunofluorescência (IFL) são os mais utilizados (GOSWAMI & CONWAY, 2005). Luborsky *et al.*, em dois estudos distintos demonstraram a presença de anticorpos antiovarianos em 69% e 53% das pacientes com FOP (LUBORSKY *et al.*, 1990; LUBORSKY *et al.*, 1999). Fénichel *et al.*, em 1997, utilizando o método de ELISA, encontraram incidência de 59% de anticorpos antiovarianos em mulheres com FOP (FÉNICHEL *et al.*, 1997). Wheatcroft *et al.*, 1997, encontraram os anticorpos em apenas 27% das mulheres com FOP idiopática utilizando o ELISA e em somente 7% quando utilizaram a IFL (WHEATCROFT *et al.*, 1997). As discrepâncias entre as publicações, no que concerne à prevalência de anticorpos antiovarianos em mulheres com FOP, devem-se a diferenças metodológicas utilizadas, diferentes estágios da doença na época da avaliação e à multiplicidade de potenciais marcadores imunológicos, como enzimas esteroidogênicas, gonadotrofinas e seus receptores, o corpo lúteo, a zona pelúcida e o oócito (GOSWAMI & CONWAY, 2005).

Anticorpos anti-ovarianos específicos como: anticorpos contra receptores de gonadotrofinas, anticorpos contra células produtoras de esteróides e anticorpos contra zona pelúcida, têm sido estudados há algumas décadas devido ao seu aumento ou sua presença em mulheres com FOP (IRVINE *et al.*, 1968;

BETTERLE *et al.*, 1993; ANASTI, 1998; GOSWAMI & CONWAY, 2005). Os anticorpos contra células produtoras de esteróides (SCA - *Steroid Cell Antibodies*) foram detectados inicialmente na década de 60, e, alguns estudos demonstraram que estes anticorpos são capazes de reconhecer vários tipos de células produtoras de esteróides da córtex adrenal, do testículo, do ovário e da placenta (IRVINE *et al.*, 1968; SOTSIU *et al.*, 1980). A prevalência de SCA depende das características clínicas apresentadas pela mulher. Podem ser encontrados em 60% dos pacientes com SPA tipo-I, e 25% a 40% com SPA tipo-II (HOEK *et al.*, 1997). Entretanto, sua maior prevalência se dá nas mulheres com doença de Addison e FOP, variando de 78% a 100% (SOTSIU *et al.*, 1980; BETTERLE *et al.*, 1993). Falorni *et al.*, 2002, encontraram prevalência de SCA de 87% em mulheres com estas duas doenças e concluíram que o encontro destes anticorpos é raro em mulheres com FOP e associação com alteração autoimune não adrenal ou em mulheres com FOP isolada (FALORNI *et al.*, 2002). Ainda segundo Falorni *et al.*, 2002, os SCA são os melhores marcadores imunes isolados para o diagnóstico de disfunções ovarianas e doença de Addison (FALORNI *et al.*, 2002). Outro estudo demonstrou que 33% a 43% de mulheres com SPA e SCA, com ciclos menstruais normais, podem desenvolver falência ovariana dentro de 8 a 15 anos, o que torna a presença destes anticorpos um fator de risco para FOP (AHONEN *et al.*, 1987).

A associação clínica entre os achados laboratoriais de autoanticorpos antiovarianos e as características da doença são muito pobres. A simples presença destes auto-anticorpos no soro das mulheres não é uma evidência de significado patogênico. Os auto-anticorpos podem estar presentes após cirurgias (LUBORSKY *et al.*, 1990), após captação de oócitos na fertilização *in vitro* (GOBERT *et al.*, 1990;

GOBERT *et al.*, 1992), em mulheres com síndrome de Turner (WHEATCROFT *et al.*, 1994) e em casos de destruição celular como no infarto do miocárdio (HOEK *et al.*, 1997; ANASTI, 1998). Apesar de serem considerados anticorpos específicos, ainda há necessidade de se determinar quando eles estão relacionados, são associados ou são consequência de um processo patológico que leva a FOP (FÉNICHEL *et al.*, 1997).

Em trabalhos avaliando o uso de terapia imunossupressora com corticóides em mulheres com associação de FOP com alterações autoimunes, foram demonstrados casos de retorno da menstruação após período de amenorréia, e também, casos de gravidez após diagnóstico de FOP. Estes dados corroboram a hipótese da presença de fator imunológico na etiologia da insuficiência ovariana prematura (COULAM *et al.*, 1981; RABINOWE *et al.*, 1986; LUBORSKY *et al.*, 1990; KALANTARIDOU *et al.*, 1999; FORGES *et al.*, 2004).

O exame histológico de ovários de mulheres com FOP pode mostrar tanto uma completa perda dos componentes foliculares como a persistência de um número variável de folículos ovarianos. Esta presença de folículos é denominada forma folicular de FOP que representa 40% dos casos (FORGES *et al.*, 2004). Os achados histológicos nos ovários de mulheres com FOP e alterações autoimunes são característicos de ooforite linfocítica. Em uma revisão da literatura realizada por Hoek *et al.*, 1997, em que foram avaliados 215 casos de FOP não associada a autoimunidade adrenal, em 18 estudos entre 1965 e 1991, demonstrou-se que apenas 6 casos apresentaram este tipo de ooforite (HOEK *et al.*, 1997). As alterações típicas da ooforite autoimune linfocítica são: presença de infiltrado folicular por células inflamatórias que incluem macrófagos, células *Natural Killer*, linfócitos T, células B

e células plasmáticas (NELSON & BAKALOV, 2003). Uma característica marcante e bem estabelecida nestes casos é a preservação dos folículos primordiais que parecem não ser afetados pelo processo inflamatório vigente. Os folículos em desenvolvimento são os que predominantemente apresentam infiltrado inflamatório ao seu redor. A intensidade do processo inflamatório guarda relação direta com a maturidade folicular. Quanto mais maduros os folículos, maior o acúmulo de células inflamatórias na sua periferia (**Figura 8**) (NELSON & BAKALOV, 2003).

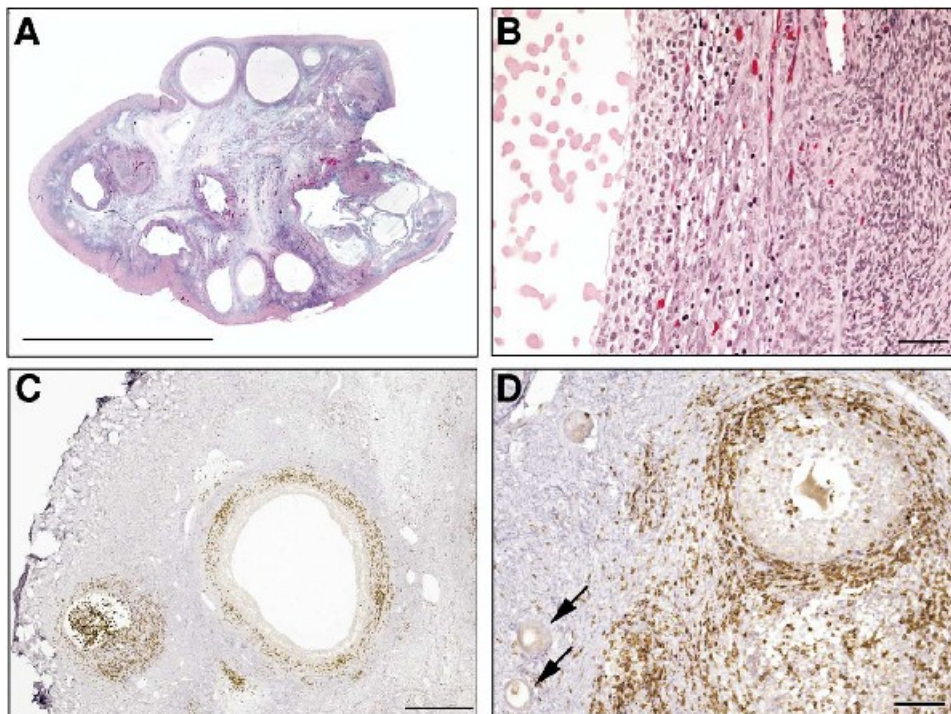


Figura 8. Fotos de microscopia de ovário humano. **A** – Ovário corado com hematoxilina e eosina mostra múltiplos folículos antrais (barra = 1 cm). **B** – Maior magnificação mostra infiltração linfocítica da teca de folículo antral e de células da granulosa luteinizada (Barra = 50 μ m). **C** – Ovário corado com imunoperoxidase para CD3 demonstra infiltração de linfócitos na teca (barra = 500 μ m). **D** – corado com imunoperoxidase para CD3 demonstra infiltrado de linfócitos na teca de folículo pré antral e presença de folículos em estágio inicial livres de infiltração linfocitária (setas) (barra = 100 μ m). Adaptado (BAKALOV *et al.*, 2005).

Geralmente o infiltrado inflamatório se localiza nas células da teca interna e externa. As células da granulosa são comumente poupadas deste processo inflamatório até que ocorra a luteinização do folículo em degeneração (HOEK *et al.*, 1997; NELSON & BAKALOV, 2003; BAKALOV *et al.*, 2005). Os folículos atresícos, o corpo lúteo e o corpo albicans também apresentam o mesmo padrão inflamatório. Todos estes aspectos confirmam a seleção das células produtoras de esteróides como o principal alvo do processo inflamatório autoimune (HOEK *et al.*, 1997). Linfocinas produzidas localmente como parte deste processo podem interferir prejudicialmente na esteroidogênese, levando a formação de cistos devido ao aumento das gonadotrofinas provocado pelo baixo nível de feedback negativo na hipófise (NELSON & BAKALOV, 2003). Em decorrência disto, a aparência macroscópica de ovários em casos de ooforite linfocítica, demonstra a presença de ovários aumentados às custas de cistos de tamanhos variados em cerca de 50% dos casos (HOEK *et al.*, 1997). Este dado está de acordo com os achados ultrassonográficos que revelam a presença de folículos ovarianos em 41% a 60% dos casos de mulheres com FOP (CONWAY *et al.*, 1996; MEHTA *et al.*, 1992).

Atualmente as causas genéticas de FOP são reconhecidas como importantes mecanismos de disfunção e/ou de depleção folicular. Muitas alterações que no passado eram consideradas idiopáticas têm hoje uma base genética bem estabelecida como seu evento inicial. Dentre os distúrbios genéticos responsáveis pela FOP existem aqueles relacionados aos cromossomos sexuais, neste caso representados pelo cromossomo X, e outros resultantes de fatores mendelianos nos cromossomos autossômicos (SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 401). As alterações

relacionadas ao cromossomo X advêm de anormalidades numéricas ou estruturais do mesmo, tais como deleções de parte relevante ou de todo o cromossomo. A monossomia do cromossomo X, 45,X da qual a síndrome de Turner aparece como principal representante, as formas de mosaicismo 45,X/46,XX, os casos 47,XXY, a síndrome do X frágil e as deleções do braço curto ou longo do cromossomo X, podem levar a disgenesia gonadal e conseqüentemente a FOP. Cerca de 50% dos casos de hipogonadismo hipergonadotrófico podem ser explicados pela monossomia do cromossomo X (SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 401).

A despeito das desordens que ocorrem no cromossomo X, em muitos casos, mulheres 46,XX sem alterações nos cromossomos sexuais podem desenvolver FOP e disgenesia gonadal de forma semelhante àquelas com disgenesia gonadal 45,X. Nestes casos a disgenesia gonadal 46,XX pode ser provocada por alterações genéticas autossômicas, algumas já bem estabelecidas e outras ainda em estudo. Mutações em genes específicos podem levar a distúrbios na função ovariana e a falência do ovário (NELSON & BAKALOV, 2003).

3.2.3 Mutações em genes com repercussão na função ovariana

Mutações no gene do receptor do Hormônio Folículo Estimulante (*FSHR*, do inglês *follicle stimulating hormone receptor*)

O loco que codifica para o FSHR está mapeado no braço curto do cromossomo 2. Mutações no *FSHR* raramente são identificadas como causas de disfunção folicular ovariana. Quando identificadas, estas mutações levam a uma

redução na capacidade de ligação e transdução de sinal no receptor (NELSON & BAKALOV, 2003; LEUNG & ADASHI, 2003).

Mutações no gene do receptor do Hormônio Luteinizante (*LHR*, do inglês, *Luteinizing Hormone Receptor*)

Mutações no gene do receptor do hormônio luteinizante (LHR) podem levar a uma inativação do mesmo, impedindo a ação do LH nas células de teca e interferindo com a produção de androgênios que posteriormente sofreriam aromatização nas células da granulosa ovariana (NELSON & BAKALOV, 2003; LEUNG & ADASHI, 2003).

Mutações no gene da Galactose-1-Fosfato Uridil Transferase (*GALT*, do inglês, *Galactose-1-Phosphato Uridyl Transferase*)

A Galactose-1-fosfato uridyl transferase (*GALT*), catalisa a conversão de galactose-1-fosfato a glicose-1-fosfato pela transferência de uridina monofosfato. A mutação neste gene leva a galactosemia e está associada a hepatomegalia, catarata e retardo mental. A FOP é comum em mulheres com esta doença (NELSON & BAKALOV, 2003; LEUNG & ADASHI, 2003).

Mutações no gene da proteína ligadora do nucleotídeo guanina, com atividade polipeptídeo 1 α -estimuladora (*GNAS*, do inglês, *Guanine Nucleotide-Binding Protein, α -Stimulating Activity Polypeptide 1*)

A proteína ligadora do nucleotídeo guanina, com atividade polipeptídeo 1 α -estimuladora (guanine nucleotide-binding protein, α -stimulating activity polypeptide 1) é codificada pelo gene *GNAS* e atua na região pós-receptor do FSH favorecendo a continuidade da mensagem desencadeada pela ação do FSH no seu receptor. Mutações neste gene levam a resistência ovariana às gonadotrofinas e falência ovariana (NELSON & BAKALOV, 2003; LEUNG & ADASHI, 2003).

Mutações no gene da enzima P450c17

As atividades 17- α -hidroxilase e 17-20-desmolase, importantes na esteroidogênese ovariana, são realizadas por enzimas do grupo P450c17 que por sua vez são codificadas pelo gene *CYP17*. Mutações neste gene interferem então diretamente na produção de esteróides sexuais pelo ovário (LEUNG & ADASHI, 2003).

Mutações no gene da enzima P450 aromatase

Mutações no gene *CYP19*, responsável pela produção da enzima P450 aromatase, levam à perda da capacidade de conversão de andrógenos (19 carbonos) a

estrógenos (18 carbonos) nas células da granulosa. Esta síndrome está associada ao hiperandrogenismo que pode induzir virilização, apresentando um fenótipo diferente dos outros casos de falência ovariana (LEUNG & ADASHI, 2003).

Mutações no gene *forkhead transcription factor L2 (FOXL2)*

O gene *FOXL2* codifica um fator de transcrição (forkhead transcription factor gene) e é expresso no mesênquima do ovário e das pálpebras. Mutações neste gene podem levar a Síndrome da Blefarofimose-Ptose-Epicanto Inverso (BPES) que pode estar associada a falência ovariana (SPEROFF & FRITZ, 2005, p. 401; LEUNG & ADASHI, 2003).

Mutações no gene da Glicoproteína Carboidrato-Deficiente (*CDG*, do inglês, *Carbohydrate-Deficient Glycoprotein*)

Mutações no gene da Glicoproteína Carboidrato-Deficiente (CDG) confere deficiência na fosfomanomutase que é responsável pela conversão da manose-6-fosfato a manose-1-fosfato. Estas alterações levam à diminuição das glicoproteínas e estão associadas a falência ovariana por atividade folicular deficiente (LEUNG & ADASHI, 2003).

Outras doenças mendelianas podem estar associadas à FOP, tais como: Síndrome de Perrault, Ataxia cerebellar, Síndrome de Denys-Drash, Síndrome de Frasier, e a Síndrome do X Frágil já citada.

3.3 Síndrome da Blefarofimose-Ptose-Epicanto inverso

3.3.1 Aspectos clínicos

A BPES é uma doença genética complexa e rara que ocorre tanto de forma esporádica, através de mutação nova, como por transmissão autossômica dominante e apresenta como principais características alguns tipos de malformações palpebrais. Os quatro achados clínicos mais relevantes são: blefarofimose – diminuição da abertura horizontal das pálpebras, ptose – queda da pálpebra superior causando estreitamento da fissura palpebral vertical, epicanto inverso – dobra de pele que origina na pálpebra inferior e corre em direção interna e superior do olho, e telecanto – aumento da distância intercantal interna (OLEY & BARAITSER, 1988). Outros achados que ocorrem de forma ocasional são: microftalmia, anoftalmia, microcórnea, hipermetropia, estrabismo, nistagmo, alargamento da ponte nasal, palato arqueado, anomalias menores de orelha, defeitos cardíacos, deficiência mental leve e infertilidade em mulheres (OLEY & BARATSIER, 1988). Em 1983, Zlotogora *et al.* propuseram e descreveram dois tipos da Síndrome da Blefarofimose. No tipo I a BPES está sempre acompanhada de infertilidade e FOP, portanto as mulheres afetadas não são capazes de transmitir a doença. Em geral estas mulheres apresentam desenvolvimento sexual normal com menarca apropriada, seguida de oligomenorréia

e amenorréia secundária. Já na BPES tipo II, não há comprometimento da fertilidade feminina e a doença pode ser transmitida por ambos, homens e mulheres, afetando sua prole (ZLOTOGORA *et al.*, 1983).

3.3.2 Aspectos genéticos

As pesquisas na tentativa de se descobrir uma base genética para a BPES datam do início da última década, onde estudos citogenéticos nos pacientes afetados pela doença demonstraram a presença de deleções, translocações e rearranjos no braço longo do cromossomo 3, mais precisamente nas regiões 3q22 e 3q23 (FUKUSHIMA *et al.*, 1991; JEWETT *et al.*, 1993; BOCCONE *et al.*, 1994; LAWSON *et al.*, 1995; PRAPHANPHOJ *et al.*, 2000; ENGELEN *et al.*, 2002). Posteriormente, estudos utilizando análise de ligação em famílias com BPES tipo II corroboraram a hipótese acima em que o gene da BPES estaria localizado entre as regiões 22 e 23 do braço longo do cromossomo 3. Estudos em famílias com a BPES tipo I, também identificaram o loco entre estas regiões, sugerindo uma mesma localização e, possivelmente, que o mesmo gene poderia estar afetado nos dois tipos desta desordem genética (AMATI *et al.*, 1995; SMALL *et al.*, 1995; AMATI *et al.*, 1996). Entretanto, um único estudo de análise de ligação, forneceu evidência para um segundo loco para a BPES, no cromossomo 7p21-p31, sugerindo que a BPES seria uma desordem geneticamente heterogênea (MAW *et al.*, 1996).

Trabalhos utilizando clonagem posicional possibilitaram um mapeamento refinado do loco da BPES (LAWSON *et al.*, 1995; TOOMES & DIXON, 1998, DE BEARE *et al.*, 1999), bem como a identificação de dois genes

candidatos para a BPES. Os genes *BPES1* e *C3orf5*, localizados no cromossomo 3q23, estariam desestruturados devido a translocações t(3;4) e t(3;7) respectivamente, em duas diferentes mulheres com BPES (DE BEARE *et al.*, 2000; CRISPONI *et al.*, 2001). Entretanto, estes genes não se mostraram mutados em mulheres com BPES e estudos citogenéticos normais, sugerindo efeito posicional como mecanismo que levou desordem a estas mulheres. Crispini *et al.*, em 2001, publicaram estudo onde foi identificado um novo gene para a BPES, o *FOXL2*, que é expresso predominantemente no ovário e nas pálpebras em desenvolvimento, e está mutado em indivíduos afetados com qualquer um dos dois tipos de BPES (CRISPONI *et al.*, 2001).

3.3.3 O gene *FOXL2*

O gene *FOXL2* pertence à família dos fatores de transcrição *forkhead/winged helix* que estão envolvidos numa variedade de processos de desenvolvimento e têm como característica um domínio de ligação ao DNA com 100 aminoácidos. Este domínio já foi identificado em mais de 100 genes em uma grande variedade de organismos (COCQUET *et al.*, 2002). Proteínas da classe *forkhead/winged helix* são essenciais em muitas vias de transdução de sinal, na embriogênese, na tumorigênese e na manutenção de estados celulares diferenciados. Estão presentes em todos os eucariotos, participando no estabelecimento do eixo corporal e no desenvolvimento das três camadas de tecidos. *FOXL2* é o terceiro gene da classe *forkhead* a ser identificado, com envolvimento na patogênese de desordem do desenvolvimento humano de origem hereditária. Os outros dois são o *FOXE1* que está mutado em casos de agenesia de tireóide, e, o *FOXC1A*, mutado em defeitos oculares associados a glaucoma congênito (BEYSEN & DE BAERE, 2006).

O gene *FOXL2* possui 2745 pb e tem um único exon, com 1131 pb extremamente conservado em muitas espécies de vertebrados (CRISPONI *et al.*, 2001; COCQUET *et al.*, 2002; COCQUET *et al.*, 2003; UDAR *et al.*, 2003). A tradução deste gene origina uma proteína com 376 aminoácidos que tem como característica o já citado domínio de ligação ao DNA denominado “*forkhead / winged helix*”, e, fora deste domínio, a proteína *FOXL2* também contém uma sequência de polialanina (poliAla) com 14 resíduos cuja função ainda não está bem estabelecida (**Figura 9**). O aumento de 14 para 24 resíduos de alanina nesta região representa cerca de 30% de todas as mutações intragênicas do gene *FOXL2* e leva principalmente à BPES tipo II (DE BAERE *et al.*, 2003). Além disso, a proteína *FOXL2*, contém, em sua terminação carboxila, uma região rica em resíduos alanina e prolina, importantes para atuação desta proteína como fator de transcrição (PISARSKA *et al.*, 2004).



Figura 9. Estrutura terciária do domínio forkhead do gene *FOXL2*. Contém 100 resíduos de aminoácidos, 3 alfa hélices e 2 folhas beta. A estrutura contém 2 loops flexíveis ou “wings” na região C-terminal, por isso o nome winged helix. (Cn3D, 4.1; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A correlação dos dados fenotípicos e genotípicos sugere que um mecanismo de haploinsuficiência causado pela perda de função (mutação) em um dos alelos do *FOXL2* está associado com o fenótipo completo (BPES tipo I), enquanto uma proteína anormalmente longa está associada com fenótipo hipomórfico (BPES tipo II) (CRISPONI *et al.*, 2001). Um padrão de expressão gênica foi demonstrado em várias espécies (homem, rato, peixe) e alguns estudos demonstram a expressão do gene *FOXL2* em pálpebras em desenvolvimento e em células da granulosa de ovários fetais e de adultos (CRISPONI *et al.*, 2001; COCQUET *et al.*, 2002; COCQUET *et al.*, 2003).

A Falência Ovariana Prematura na BPES é uma desordem variável e complexa, porém existem duas possibilidades que podem explicar seu aparecimento. Na primeira, as células germinativas podem ser depletadas, nos ovários, de forma rápida após o nascimento ou alguma outra função dos folículos maduros pode estar alterada, resultando em atresia folicular ou degeneração ovariana. Na segunda hipótese, um erro primário pode ocorrer no desenvolvimento fetal ovariano, tanto nas linhagens de células germinativas quanto somáticas de forma que a morfogênese ovariana é bloqueada num estágio inicial (LOFFLER *et al.*, 2003). Em artigo publicado em 2003, Loffler *et al.* realizaram uma série de experimentos para investigar a expressão do gene *FOXL2*. Avaliaram gônadas de vertebrados em desenvolvimento, na tentativa de distinguir entre estas duas possibilidades. Eles concluíram que os dados sugerem que o gene *FOXL2* afeta os estágios iniciais do desenvolvimento ovariano, mais do que puramente afeta a manutenção do estoque de folículos. Além disso, sugerem que o gene *FOXL2* é um fator de diferenciação ovariana bastante conservado entre vertebrados (LOFFER *et al.*, 2003). Estes dados

corroboram a hipótese de que o gene *FOXL2* tenha importância relevante no desenvolvimento e na função ovariana, e que sua disfunção pode levar à FOP.

A proteína FOXL2, pertence a um grupo de fatores de transcrição capazes de interagir com seqüências específicas de DNA em regiões promotoras de diversos genes. Em um grande número de famílias da proteína *forkhead*, a capacidade de repressão transcripcional tem sido atribuída à presença de regiões ricas em resíduos de Alanina e Prolina, particularmente em genes que afetam a diferenciação sexual (PISARSKA *et al.*, 2004).

Pisarska *et al.*, 2004, estudaram a atuação da proteína FOXL2 na transcrição do gene regulador da esteroidogênese humana (*StAR*, Human Steroidogenic Acute Regulatory), um marcador da diferenciação das células da granulosa. No citado estudo, demonstrou-se que a proteína FOXL2 interage diretamente com os primeiros 95 pares de base a 5' do sítio de iniciação do promotor do gene *StAR* e que esta interação determina uma atividade repressora da proteína FOXL2 sobre o gene *StAR* em camundongos. Estes autores demonstraram ainda que, após transfecção com gene *FOXL2* com mutação, houve uma diminuição da atividade repressora sobre o gene *StAR* em células de camundongos. Conclui-se então que mutações no gene *FOXL2* levam a uma perda da atividade repressora do gene *FOXL2* sobre esse gene (PISARSKA *et al.*, 2004).

A proteína *StAR* é expressa em tecidos com capacidade esteroidogênica, sendo responsável por uma etapa limitante da esteroidogênese. Sua função é facilitar o transporte do colesterol de fora para dentro da membrana mitocondrial antes da conversão em pregnenolona. Esta proteína é considerada um

marcador de diferenciação das células da granulosa e é expressa em células da teca e células da granulosa de folículos pré-ovulatórios e folículos luteinizados, enquanto está ausente em folículos primordiais e primários (POLLACK *et al.*, 1997; THOMPSON *et al.*, 1999). Portanto, mutações no gene *FOXL2*, que determinam a perda da capacidade de repressão do gene *StAR*, podem levar à diferenciação acelerada das células da granulosa, ocasionando um aumento do recrutamento dos folículos em repouso, levando à exaustão prematura do estoque de folículos primordiais, o que explicaria a ocorrência de FOP em BPES (PISARSKA *et al.*, 2004).

Dois estudos recentes, demonstraram que a proteína FOXL2 regula também a expressão do gene da aromatase *CYP19* (PANNETIER *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007). Wang *et al.* 2007, observaram que a proteína FOXL2 sozinha, pode ativar a transcrição do gene da aromatase, através de ligação direta ao promotor do gene. Foi observado ainda, que o domínio *forkhead* é indispensável para a proteína FOXL2 se ligar ao sítio de reconhecimento no gene *CYP19a1*. Entretanto, apesar de ser necessário para esta interação, o domínio *forkhead* sozinho é incapaz de ativar a transcrição do gene *CYP19a1*. O domínio com capacidade de ativar a transcrição localiza-se na porção carboxila terminal da proteína FOXL2. Portanto, mutações que envolvam esta região do gene *FOXL2*, podem levar à deficiência de ativação da aromatase com conseqüente interferência no esteroideogênese e no desenvolvimento ovariano (WANG, *et al.*, 2007).

Recentemente, Batista *et al.*, 2007, identificaram vários potenciais marcadores da transcrição do gene *FOXL2*. Para a detecção destes marcadores de transcrição foram utilizados as técnicas de DNA *chips* e PCR quantitativo em células

granulosa-símile com ou sem super-expressão do gene *FOXL2*. Estes autores identificaram possíveis interações da proteína FOXL2 com vários genes, levando à supressão ou estimulação destes. Cinco grupos funcionais de genes cuja transcrição sofre influência do FOXL2, foram identificados. O primeiro grupo, mais representativo, inclui seis proteínas ligadoras de quimoquinas, envolvidas nos processos imunorregulatórios e inflamatórios, normalmente estimuladas pelo FOXL2. O segundo grupo, também estimulado pelo FOXL2, contém genes envolvidos na regulação da apoptose como o *BLC2A1* (*B Cell Lymphoma related protein A1*), supressor da apoptose. O terceiro grupo compreende 3 proteases suprimidas e 1 ativada pelo FOXL2. A diminuição da expressão da protease MMP23A, em resposta ao FSH em células da granulosa de camundongos, ocorre de forma semelhante à ativação da enzima aromatase quando estimulada pelo FSH. O quarto grupo contém genes que codificam diferentes receptores, a maioria dos quais, suprimidas pelo FOXL2. O quinto grupo compreende genes que codificam fatores de transcrição, a maioria estimulados pelo FOXL2. A maior parte dos genes suprimidos ou ativados pela proteína FOXL2 está relacionado de alguma maneira a processos que ocorrem nos ovários, como esteroidogênese, ovulação e atresia folicular (BATISTA *et al.*, 2007).

3.3.4 Diagnóstico da Síndrome da BPES

O diagnóstico da BPES é baseado principalmente no quadro clínico, especialmente nos quatro achados clínicos relevantes já citados, a blefarofimose, a ptose, o epicanto inverso e o telecanto. Na BPES tipo I, além destas alterações, a infertilidade e a FOP também se fazem presentes. Nestas mulheres alguns exames

complementares como a dosagem de gonadotrofinas (FSH e LH), a dosagem sérica de estradiol (E2) e progesterona (P), e a ultra-sonografia (USG) pélvica podem ajudar no diagnóstico. Habitualmente, as gonadotrofinas estão com concentração elevada, os esteróides E2 e P, estão em baixa concentração e a USG pode mostrar útero hipoplásico e ovários em fita.

Além do diagnóstico clínico existem testes de avaliação genética, através do uso de técnicas de biologia molecular, que permitem um diagnóstico mais preciso sobre a causa da doença. O *FOXL2* é o único gene atualmente conhecido por estar associado com a BPES e portanto fonte de investigação na pesquisa de alterações estruturais em indivíduos afetados pela doença. Os testes moleculares tem uso clínico na confirmação diagnóstica, bem como no diagnóstico pré-natal e tem papel relevante no aconselhamento genético dos indivíduos afetados. Os principais testes utilizados na pesquisa de alterações no gene da *FOXL2* são a análise de seqüência gênica após amplificação por reação de cadeia de polimerase (PCR), a detecção de deleções através da amplificação com sondas de ligação dependente em sistema multiplex e o uso da técnica de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH, fluorescent in situ hybridization). A taxa de detecção de mutações neste gene pode chegar a 80% com os testes disponíveis. Estudos têm sido realizados com a utilização de marcadores microsatélites e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), o que pode aumentar ainda mais a eficácia dos testes diagnósticos para a BPES (DE BAERE *et al.*, 2003).

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Foi realizado estudo diagnóstico descritivo do caso de uma mulher apresentando clinicamente BPES tipo I.

4.2 Amostra populacional

Foram avaliados o caso-índice de BPES, bem como seus progenitores.

4.3 Cuidados éticos

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS), da Secretaria Estadual de Saúde do Distrito Federal, sob o parecer N^o 189/2006 (Anexo I) e está de acordo com a resolução 196/96 CNS/MS. Todos os indivíduos participantes do presente estudo foram esclarecidos verbalmente e através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que contém informações sobre o estudo, como justificativa, vantagens e desvantagens, riscos, forma de participação e garantia de inutilização do material biológico após a pesquisa. Após leitura do termo de consentimento e esclarecimento de todos os pontos os participantes que aceitaram voluntariamente participar do presente estudo assinaram o Termo de Consentimento.

4.4 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada uma única ocasião, no domicílio dos participantes, por uma técnica de enfermagem devidamente treinada e paramentada. Foram coletados de cada participante, cerca de 15 ml de sangue venoso periférico, por punção da veia mediana do cotovelo, com seringa e agulhas descartáveis. As amostras de sangue foram colhidas em EDTA e aliquotadas em dois tubos de 10ml e posteriormente armazenadas à temperatura de 4° C.

4.5 Extração de DNA

Para a extração de DNA das amostras de sangue foi utilizado o protocolo de extração baseado em *salting out* modificado de Miller *et al.*, 1988. O DNA foi quantificado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio 1 mg/ml (SAMBROOK *et al.*, 1989).

4.6 Pesquisa de Mutações no gene *FOXL2*

A pesquisa de mutações foi realizada por amplificação, por técnica de PCR, da região codificadora do gene *FOXL2* no DNA genômico extraído. O produto de PCR foi então seqüenciado. A PCR foi realizada conforme descrito por Crisponi *et al.*, 2001 e modificado por De Beare *et al.*, 2001, utilizando os quatro pares de primers seguintes, de A a H, destacando-se entre parênteses os locais do gene *FOXL2* onde os primers se paream: A – 5'-CCG TAA GCG GAC TCG TGC-3'(146-163) e B – 5'-AGT AGT TGC CCT TGC GCT C-3'(601-619); C2 – 5'-CAG CCT CAA CGA

GTG CTT CA-3'(555-574) e D – 5'-CGT GCA GAT GGT GTG CGT G-3'(1120-1138); E – 5'-ACT CGT ACA ATG GCC TGG GA-3'(1052-1071) e F – 5'-GAG GAG GAC AGG AGC TTA GG-3'(1526-1547); G – 5'-CGC ACT TCC AGC CCG GCA A-3'(710-728) e H – 5'-TGT GTA CGG CCC GTA CGA-3'(997-1014). O protocolo de PCR foi realizado conforme descrito por Crispini *et al.*, 2001, com algumas modificações (DE BEARE *et al.*, 2001; CRISPONI *et al.*, 2001).

Reagente	Concentração estoque	Volume na reação
Tampão	10x	2,5 µl
DMSO		2,5µl
MgCl ₂	50 mM	0,375µl
DNTp	2,5 mM	1,0µl
Primers	5 µM	2,5µl
Taq. Platinum	5 U/µl	0,2µl
DNA	10ng/ µl	6µl
H ₂ O miliq	qsp 25 µl	9,925µl
Total	----	25 µl

[RWP1] Comentário: ver concentração

O protocolo de temperatura da reação de PCR utilizada foi : 95°C (5 min), 40 ciclos de 92 °C – 1 min / 57 °C – 45 seg / 72 °C – 45 seg e depois 72 °C – 10 min para extensão final. A reação foi realizada na máquina geneAmp® PCR System 9700 da Applied Biosystems do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília - UCB. Após a amplificação os produtos da PCR foram avaliados (quantificados) em gel de agarose a 1% para confirmação das bandas esperadas para cada par de primers (A-B, C-D, E-F, G-H).

Após a reação de amplificação foi realizada a purificação dos produtos previamente ao processo de seqüenciamento dos mesmos. A purificação foi feita com o uso das enzimas exonuclease I (EXO I) e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) sobre

os produtos de PCR. A EXO I foi utilizada para degradar as fitas únicas de primers residuais e de resíduos de DNA estranhos produzidos pela PCR. O uso da SAP teve por objetivo hidrolisar os resíduos de dNTPs remanescentes da mistura do PCR que podem interferir na reação de seqüenciamento.

Excluído: primers

Foram utilizados 0,05µl de EXOI e 0,5µl de SAP em cada produto de PCR. Foi realizada incubação a 37°C por 30 min e 80°C por 20 min para inativação das enzimas.

Os produtos da PCR foram seqüenciados pelo método de terminação da cadeia com a utilização do kit *ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) no equipamento *ABI Prism 377* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Excluído: dideoxi

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

4.7 Análise dos Resultados

Foram analisadas a qualidade das seqüências obtidas através da utilização dos softwares *CodonCode Aligner* e *SeqScape*. As seqüências obtidas foram então comparadas com seqüências conhecidas através do Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A seqüência usada como referência para análise de similaridade foi a NM_023067.2, GI: 42716284. Foi realizado também um alinhamento entre as seqüências obtidas e delas com a seqüência referência através do programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Além disto foram realizadas comparações entre as seqüências dos fragmentos de cada indivíduo com a seqüência do gene não-mutado e comparação entre as próprias seqüências dos indivíduos

Excluído:

Excluído: seqüências

estudados através dos softwares *CodonCode Aligner* e *SeqScape*, com o intuito de avaliar a presença de mutações.

A seqüência de nucleotídeo das amostras com mutação foi submetida à tradução e a verificação das seqüências de início de leitura desta através da ferramenta *ORF finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Posteriormente a seqüência com mutação foi comparada à seqüência referência pela ferramenta ClustalW para avaliação da repercussão da mutação na seqüência de aminoácidos. A nomenclatura utilizada para as variações de seqüência de nucleotídeos ou de proteínas foi a preconizada pela sociedade de variação do genoma humano (HGVS, *Human Genome Variation Society*) (<http://www.hgvs.org/>).

5. RESULTADOS

5.1 Relato do Caso

O caso índice de que trata a pesquisa foi identificado através do atendimento no ambulatório de Reprodução Humana do Hospital Regional de Taguatinga – SES / Distrito Federal. A paciente procurou o serviço do ambulatório devido ao desejo de conseguir uma gravidez. A história clínica, bem como os exames complementares realizados foram anotados no prontuário de acordo com a história clínica que se segue.

Dados da paciente – Prontuário

Ambulatório de Reprodução Humana – HRT

Data da 1^a consulta – 18/03/2002

Identificação:

Nome: M L N S

Data Nascimento: 01/01/1974

Naturalidade: Brasília

Procedência: Brasília – DF

Raça: branca

Estado civil: casada

Profissão: do lar

Queixa Principal: “Quero engravidar”

História da Doença Atual: Paciente casada há 1 ano, sem contracepção neste período e não consegue engravidar. Refere que só menstrua com uso de medicação (anticoncepcional combinado oral). Nega outras queixas.

Antecedentes gineco-obstétricos : Menarca – 16 anos (com medicação – não sabe qual), última menstruação há 1 ano, ciclos menstruais – amenorréia – só menstrua com medicação, refere desenvolvimento sexual de mamas e pêlos normais, cólicas leves, coitarca – 20 anos, número de parceiros – 01, vida sexual ativa – 4 vezes por semana, nega dispareunia ou sinusiorragia, nega DST, G0P0A0, última colpocitologia oncótica há 8 meses – sem alteração.

Esposo , 25 anos, pedreiro, saudável, sem filhos em casamento anterior.

Antecedentes Patológicos: duas cirurgias nos olhos para correção de “pálpebras caídas” em 2001. Há relato no prontuário de exame oftalmológico em 12/1999 onde foi descrito a presença de telecanto, epicanto inverso, blefarofimose e entropio medial. Nega outras doenças.

Antecedentes Familiares: Nega doenças na família. 3 irmãs e 3 irmãos normais e com prole normal.

Hábitos de vida : Nega tabagismo, etilismo, uso de drogas ou medicações freqüentes.

Ao exame físico:

Bom estado geral, corada, hidratada, acianótica, anictérica e afebril.

Estatuta: 1,41 cm, Peso: 45.900g, envergadura: 1,48cm IMC : 23,08

Excluído:

Ocular: fendas palpebrais diminuídas, cicatrizes cirúrgicas nas pálpebras (**Figura 10**).

Tireóide: normal. Pilificação normal

Mamas: Normais (estádio V de Tanner), simétricas, sem abaulamentos ou retrações, sem nódulos palpáveis, sem galactorréia (**Figura 11**).

Abdome: plano, normotenso, sem visceromegalias.

Genitália externa: vulva trófica , sem lesões, pilificação normal (Tanner).

Especular: vagina elástica, tamanho normal, sem secreção patológica, colo uterino epitelizado, tamanho normal, OE puntiforme, sem lesões aparentes

Toque bimanual: colo fibroelástico, útero pequeno, forma e consistência normais, móvel, indolor. Anexos normais, impalpáveis.

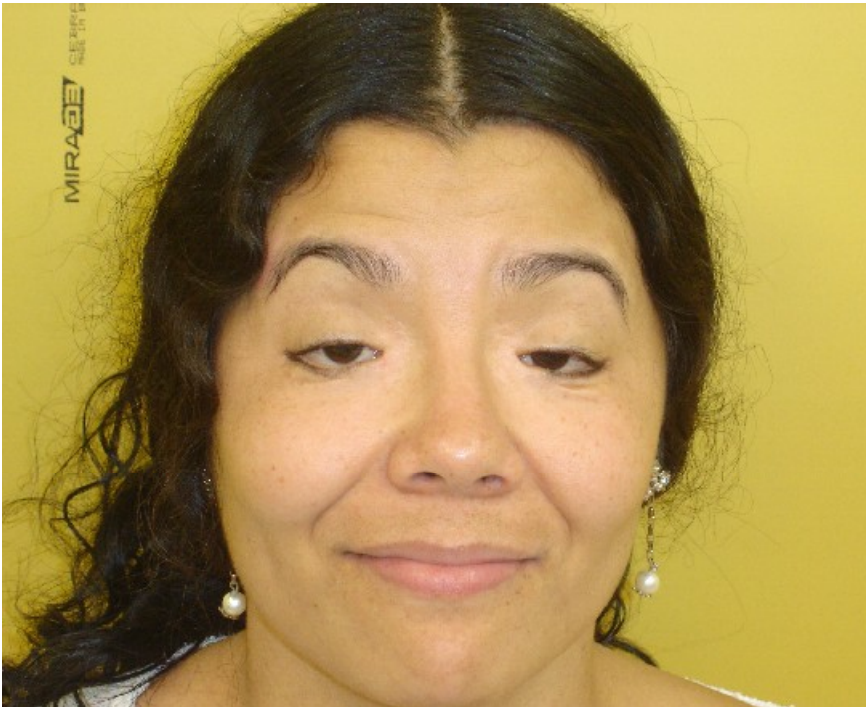


Figura 10. Foto da face da paciente com BPES. Observa-se, mesmo após duas cirurgias para correção dos defeitos oculares, a presença de ptose, blefarofimose e epicanto inverso.



Figura 11. Foto da paciente com BPES de meio corpo. Observa-se presença de mamas normais para uma mulher adulta (estadio V de Tanner), demonstrando desenvolvimento de caracteres sexuais secundários normais.

Hipótese Diagnóstica (HD): Amenorréia primária –

Conduta (CD): Teste da progesterona

FSH, LH, TSH, PRL, Estradiol

Retorno em 25/02/02:

Teste da progesterona: negativo.

Exames laboratoriais:

USG transvaginal (25/02/02): útero $6,2 \times 2,4 \times 3,9 = 26,1 \text{ cm}^3$, endométrio
4 mm, ovários D – $1,1 \text{ cm}^3$ e E – $1,7 \text{ cm}^3$

Retorno em Abril / 2002:

Exames laboratoriais:

FSH – 31 mUI/ml

LH – 24,5 mUI/ml

Prolactina – 13,9 ng/ml

TSH – 2,5 mUI/ml

T4 – normal

Estradiol – 28,3 pg/ml

HD: Hipogonadismo hipergonadotrófico – Disgenesia gonadal ?

CD: Solicitado exame de Cariótipo.

Retorno em 25/07/05

Paciente foi ao ambulatório de Genética Clínica do Hospital Universitário de Brasília (UNB), onde realizou cariótipo e retornou com relatório:

Cariótipo - 46XX

Diagnóstico clínico de Síndrome da Blefarofimose tipo I

HD: Hipogonadismo hipergonadotrófico – Síndrome da Blefarofimose tipo I.

CD: Densitometria óssea e Terapia Hormonal (estrogênio e progesterona)

Retorno em 19/05/03

Densitometria óssea : Quadril Z score = - 1,31 e femur Z score = - 1,70

HD: Hipogonadismo hipergonadotrófico – Síndrome da Blefarofimose tipo I e Osteopenia.

CD: Terapia Hormonal (estrogênio e progesterona), Cálcio e atividade física.

5.2 Quantificação do DNA.

Após a extração do DNA, o mesmo foi quantificado em gel de agarose a 1%. Foi estimado através da eletroforese uma concentração de DNA de cerca de 200ng/ μ l para a amostra da paciente e de seu pai e de 800ng/ μ l para a amostra da mãe. (Figura 12).

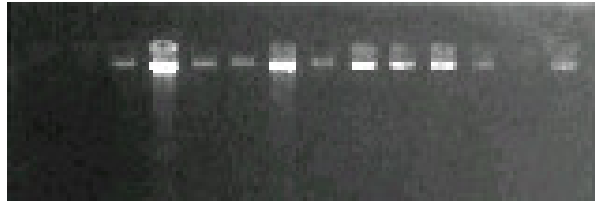


Figura 12. Gel para avaliar concentração de DNA das 3 amostras do estudo. Da direita para esquerda estão os poços de 1 a 12. 1- diluição de 1/10 DNA pai, 2- diluição de 1/10 DNA mãe, 3- diluição de 1/10 DNA filha, 4- diluição de 1/5 DNA pai, 5- diluição de 1/5 DNA mãe, 6- diluição de 1/5 DNA filha, 7- Ladder 200ng, 8- Ladder 100ng, 9- Ladder 80ng, 10- Ladder 40ng, 11- Vazio, 12- Ladder 20ng.

5.3 Produtos da PCR.

A maior parte dos produtos da PCR obtidos das amostras da paciente, da mãe e do pai, observados no gel de agarose a 1% foram compatíveis com o tamanho dos fragmentos esperados para cada par de primers. Os produtos dos primers E-F apareceram no gel compatíveis com produtos de cerca de 600pb, ou seja aproximadamente 100pb acima do esperado. Para fragmentos amplificados utilizando os iniciadores A-B, não obteve-se sucesso na amplificação a partir do DNA materno.

Assim como não se obteve sucesso na amplificação com os iniciadores C-D a partir do DNA da paciente.(**Figura 13**).

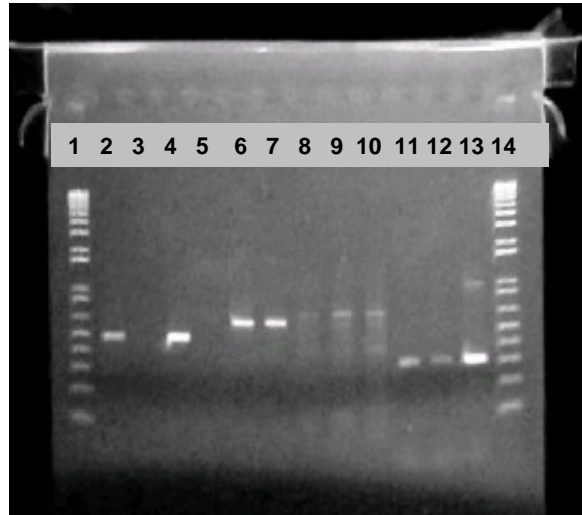


Figura 13. Gel de agarose 1% para visualização dos produtos de PCR. Foram colocados produtos da PCR e os marcadores em 14 poços da direita para esquerda, como se segue: 1- Marcador 1Kb plus, 2- prim A-B paciente, 3- prim A-B mãe, 4- prim A-B pai, 5- prim C-D paciente, 6- prim C-D mãe, 7- prim C-D pai, 8- prim E-F paciente, 9- prim E-F mãe, 10- prim E-F pai, 11- prim G-H paciente, 12- prim G-H mãe, 13- prim G-H pai, 14- Marcador 1Kb plus. Nota-se que as bandas dos produtos dos primers A-B correspondem a $\pm 500\text{pb}$, dos primers C-D e E-F correspondem a $\pm 600\text{pb}$ e dos primers G-H correspondem a $\pm 300\text{pb}$.

[RWP2] Comentário: não esquecer de substituir.

Foi preparada então, uma nova reação de PCR, baseada no mesmo protocolo, para os produtos cujas bandas não apareceram no gel e para os produtos dos primers E-F, que apresentaram bandas fracas. O resultado destas reações foi corrido novamente em gel de agarose a 1%. Os produtos cujas bandas não apareceram na reação anterior (prim A-B mãe e prim C-D paciente) foram observados nesta reação com fragmentos compatíveis com o tamanho esperado em número de pares de base (**Figura 14**).

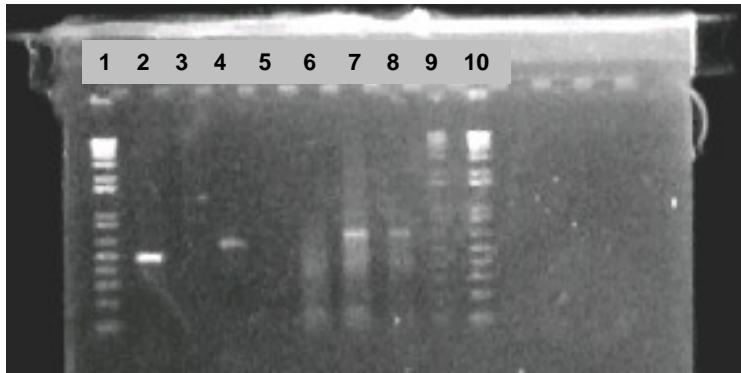


Figura 14. Gel de agarose 1% para visualização dos produtos de PCR. Foram colocados produtos da PCR e os marcadores em 7 poços da direita para esquerda, como se segue: 1- Marcador 1Kb plus, 2- prim A-B mãe, 3- vazio, 4- prim C-D paciente, 5- vazio, 6- prim E-F paciente, 7- prim E-F mãe, 8- prim E-F pai, 9- vazio, 10- Marcador 1Kb plus. Nota-se que a banda do produto do par de primers A-B mãe corresponde a ± 500 pb, e do par de primers C-D paciente corresponde a ± 600 pb. As bandas dos produtos do par de primers E-F aparecem fracas e compatíveis com produtos de ± 600 pb.

5.4 Seqüenciamento dos produtos da PCR.

Após as reações de PCR as amostras foram purificadas com as enzimas EXO I e SAP, e enviadas para seqüenciamento. Na análise das seqüências no *CodonCode Aligner*, que usa na avaliação de qualidade de seqüência o programa Phred, encontramos seqüências com qualidade satisfatória ($\text{Phred} \geq 20$) somente nos produtos onde foram utilizados os iniciadores diretos A e C2 (**Figura 15 e 16**). As seqüências onde foram utilizados os iniciadores diretos E e G apresentaram baixa qualidade de seqüência pela análise do software (**Figura 17**).

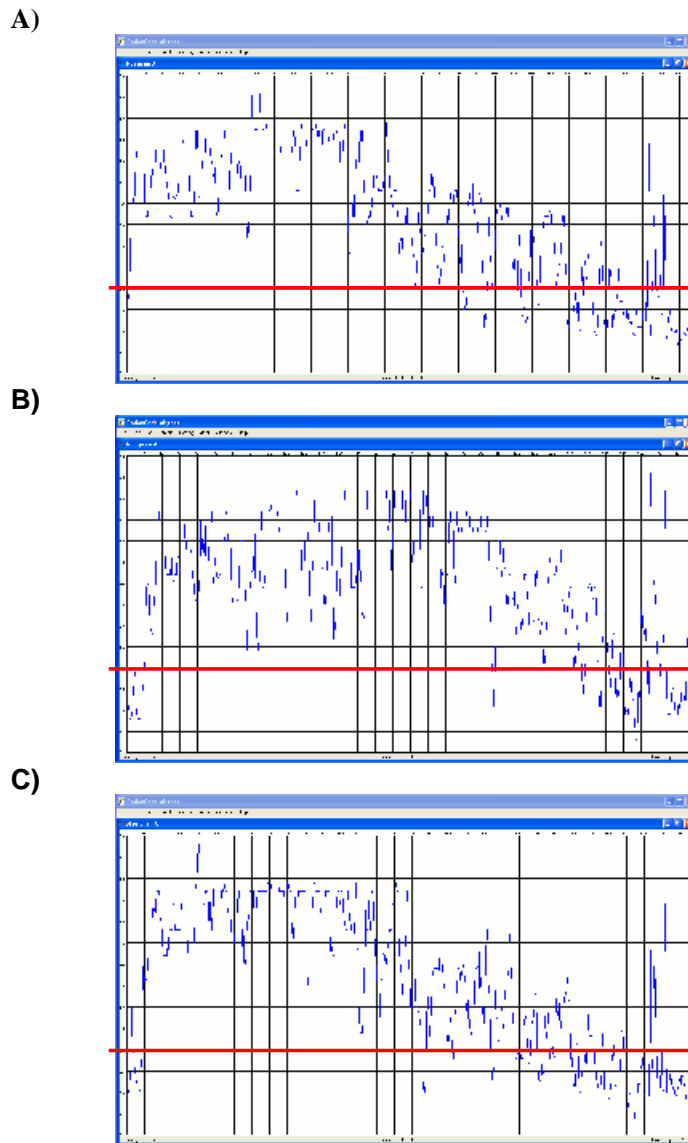


Figura 15. Análise da qualidade da seqüência com o software CodonCode Aligner. Linha vermelha horizontal marca qualidade = 20. A) Primer A pai. B) Primer A paciente. C) Primer A mãe. Observamos boa qualidade nestas seqüências em aproximadamente 500pb.

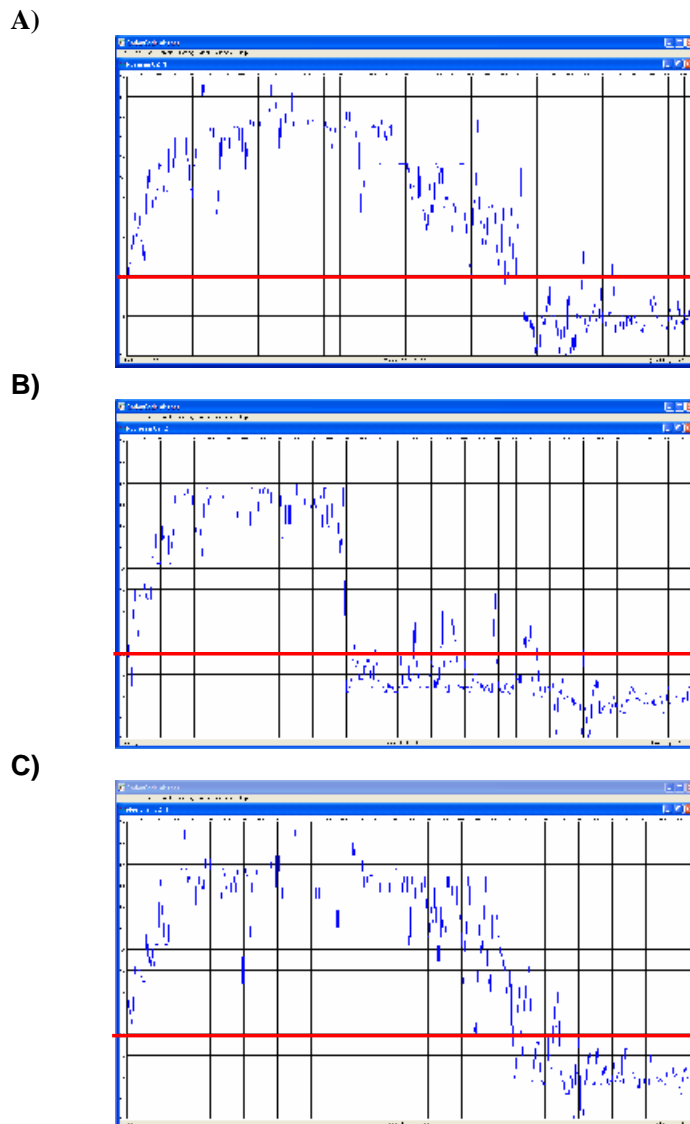
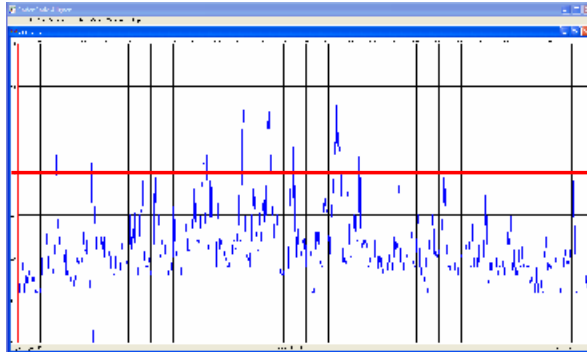


Figura 16. Análise da qualidade da seqüência com o software CodonCode Aligner. Linha vermelha horizontal marca qualidade = 20. A) Primer C2 pai. B) Primer C2 paciente. Observamos diminuição abrupta da qualidade na seqüência da paciente. C) Primer C2 mãe.

A)



B)

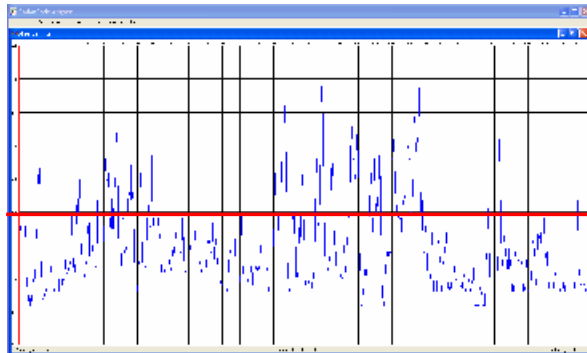


Figura 17. Análise da qualidade da seqüência com o software CodonCode Aligner. Linha vermelha horizontal marca qualidade = 20. A) Primer E pai. B) Primer G mãe. Observa-se que grande parte das bases esta com qualidade inferior a 20 pela análise do Phred.

As seqüências obtidas foram então submetidas à ferramenta Blastn do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para avaliação da similaridade das mesmas com a seqüência referência do gene *FOXL2*. As seqüências avaliadas mostraram grande semelhança com o gene estudado apresentando um *E-value* de 0.0 e grau de similaridade de 96% a 99% (**Figuras 18 – 22**). Exceção se faz à seqüência obtida com

uso do primer C2 e DNA da paciente que mostrou *E value* 1e-138, identidade de 99%, escore 500 e cobertura de 38% (**Figura 23**).

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Transcripts						
XM_001131060.1	PREDICTED: Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	1283	1283	98%	0.0	99%
NM_023067.2	Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	1283	1283	98%	0.0	99%
NM_035250.1	Homo sapiens forkhead box L1 (FOXL1), mRNA	95.6	139	26%	6e-17	100%
NM_031453.1	Homo sapiens forkhead box C1 (FOXC1), mRNA	35.7	143	18%	6e-14	91%
NM_012186.1	Homo sapiens forkhead box E3 (FOX E3), mRNA	33.8	129	28%	2e-13	89%
XM_001132770.1	PREDICTED: Homo sapiens forkhead box E3 (FOX E3), mRNA	33.8	125	26%	2e-13	93%
NM_035251.1	Homo sapiens forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)	79.8	121	20%	4e-12	83%
NM_034473.3	Homo sapiens forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	79.8	79.3	15%	4e-12	84%
NM_034472.2	Homo sapiens forkhead box D1 (FOXD1), mRNA	77.8	77.3	16%	1e-11	84%
NM_034118.3	Homo sapiens forkhead-like 13 (Drosophila) (FKHL18), mRNA	73.8	73.3	23%	2e-10	82%
NM_034474.2	Homo sapiens forkhead box D2 (FOXD2), mRNA	59.9	59.9	16%	4e-09	83%
NM_033260.2	Homo sapiens forkhead box Q1 (FOXQ1), mRNA	51.9	51.9	7%	9e-07	91%
NM_012183.1	Homo sapiens forkhead box D3 (FOXD3), mRNA	50.0	50.0	18%	3e-06	80%
XM_928867.2	PREDICTED: Homo sapiens FOXD4-like 6, transcript: variant 1	58.0	98.1	11%	1e-05	92%
NM_139135.1	Homo sapiens FOXD4-like 2 (FOXD4L2), mRNA	58.0	98.1	11%	1e-05	92%
NM_035249.3	Homo sapiens forkhead box G1B (FOXG1E), mRNA	56.0	56.0	30%	5e-05	73%
NM_207305.2	Homo sapiens forkhead box D4 (FOXD4), mRNA	52.0	52.0	18%	8e-04	80%
XR_016691.1	PREDICTED: Homo sapiens similar to forkhead box D4 like 3	50.1	90.2	11%	0.003	92%
NM_139244.2	Homo sapiens forkhead box D4-like 4 (FOXD4L4), mRNA	50.1	90.2	11%	0.003	92%
NM_031451.1	Homo sapiens forkhead box F1 (FOXF1), mRNA	48.1	48.1	5%	0.013	91%
NM_031452.1	Homo sapiens forkhead box F2 (FOXF2), mRNA	44.1	44.1	3%	0.20	95%
NM_012184.3	Homo sapiens forkhead box D4-like 1 (FOXD4L1), mRNA	42.1	32.3	11%	0.80	92%
NM_001013735.1	Homo sapiens forkhead box B2 (FOXB2), mRNA	42.1	42.1	7%	0.80	84%
NM_012182.1	Homo sapiens forkhead box B1 (FOXB1), mRNA	40.1	40.1	5%	3.2	83%
XM_031130378.1	PREDICTED: Homo sapiens similar to Forkhead box protein L1	40.1	40.1	7%	3.2	85%
XM_941284.2	PREDICTED: Homo sapiens similar to Forkhead box protein L1	40.1	40.1	7%	3.2	85%
NM_034496.2	Homo sapiens forkhead box A1 (FOXA1), mRNA	40.1	40.1	7%	3.2	84%

Figura 18. Principais Hits do Blastn da sequência primer A paciente. Observamos maior similaridade com o gene *forkhead box L2 (FOXL2)*, mRNA.

RID: 1171058785-14665-212308846844.BLASTQ3.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Transcripts						
XM_001131060.1	PREDICTED: Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	103.1	1031	57%	0.0	99%
NM_023067.2	Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	103.1	1031	57%	0.0	99%
NM_001453.1	Homo sapiens forkhead box C1 (FOXC1), mRNA	85.7	143	22%	5e-14	91%
NM_005250.1	Homo sapiens forkhead box L1 (FOXL1), mRNA	81.8	125	31%	8e-13	100%
NM_012186.1	Homo sapiens forkhead box E3 (FOXE3), mRNA	81.8	127	26%	8e-13	89%
XM_001132770.1	PREDICTED: Homo sapiens forkhead box E3 (FOXE3), mRNA	81.8	123	24%	8e-13	93%
NM_004473.3	Homo sapiens forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	81.8	31.3	19%	8e-13	84%
NM_005251.1	Homo sapiens forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)	79.8	79.3	14%	3e-12	88%
NM_004472.2	Homo sapiens forkhead box D1 (FOXD1), mRNA	79.8	79.3	19%	3e-12	84%
NM_004474.2	Homo sapiens forkhead box D2 (FOXD2), mRNA	71.9	71.9	19%	7e-10	83%
NM_004118.3	Homo sapiens forkhead-like 1E (Drosophila) (FKHL13), mRNA	65.9	55.9	19%	4e-03	84%
NM_012183.1	Homo sapiens forkhead box D3 (FOXD3), mRNA	61.9	51.9	19%	7e-07	82%
NM_033260.2	Homo sapiens forkhead box Q1 (FOXQ1), mRNA	61.9	51.9	3%	7e-07	91%
NM_005249.3	Homo sapiens forkhead box G1E (FOXG1E), mRNA	56.0	58.0	37%	1e-05	78%
NM_001451.1	Homo sapiens forkhead box F1 (FOXF1), mRNA	46.1	48.1	5%	0.011	91%
NM_207305.2	Homo sapiens forkhead box D4 (FOXD4), mRNA	46.1	46.1	20%	0.042	80%
NM_001452.1	Homo sapiens forkhead box F2 (FOXF2), mRNA	44.1	44.1	4%	0.16	96%
XR_016691.1	PREDICTED: Homo sapiens similar to forkhead box D4 like 3	42.1	32.3	11%	0.65	92%
XM_928867.2	PREDICTED: Homo sapiens FOXD4-like 6, transcript variant 1	42.1	32.3	11%	0.65	92%
NM_199135.1	Homo sapiens FOXD4-like 2 (FOXD4L2), mRNA	42.1	32.3	11%	0.65	92%
NM_001013735.1	Homo sapiens forkhead box B2 (FOXB2), mRNA	42.1	42.1	3%	0.65	84%
NM_199244.2	Homo sapiens forkhead box D4-like 4 (FOXD4L4), mRNA	42.1	32.3	11%	0.65	92%
NM_012182.1	Homo sapiens forkhead box B1 (FOXB1), mRNA	40.1	40.1	5%	2.6	88%
XM_001130978.1	PREDICTED: Homo sapiens similar to Forkhead box protein L1	40.1	40.1	3%	2.6	85%
XM_941284.2	PREDICTED: Homo sapiens similar to Forkhead box protein L1	40.1	40.1	3%	2.6	85%
NM_004496.2	Homo sapiens forkhead box A1 (FOXA1), mRNA	40.1	40.1	3%	2.6	86%
NM_012184.3	Homo sapiens forkhead box D4-like 1 (FOXD4L1), mRNA	40.1	40.1	5%	2.6	92%

Figura 19. Principais Hits do Blastn da sequência primer A pai. Observamos maior similaridade com o gene *forkhead box L2 (FOXL2)*, mRNA.

RID: 1171058827-12912-62380090578.BLASTQ3.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Transcripts						
NM_023067.2	Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	940	938	70%	0.0	99%
XM_031131060.1	PREDICTED: Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	749	737	55%	0.0	99%
NM_005250.1	Homo sapiens forkhead box L1 (FOXL1), mRNA	50.1	50.1	9%	0.003	85%
NM_012186.1	Homo sapiens forkhead box E3 (FOX E3), mRNA	44.1	44.1	3%	0.21	100%
XM_031132770.1	PREDICTED: Homo sapiens forkhead box E3 (FOX E3), mRNA	44.1	44.1	3%	0.21	100%
NM_034474.2	Homo sapiens forkhead box D2 (FOXD2), mRNA	44.1	44.1	3%	0.21	100%
NM_018263.3	Homo sapiens additional sex combs like 2 (Drosophila) (ASXL2),	44.1	44.1	3%	0.21	95%
NM_034472.2	Homo sapiens forkhead box D1 (FOXD1), mRNA	44.1	44.1	3%	0.21	100%
NM_053043.1	Homo sapiens proline rich 8 (PRR8), mRNA	42.1	42.1	3%	0.83	95%
XM_939705.2	PREDICTED: Homo sapiens similar to Homeobox even-skipped	40.1	40.1	2%	3.3	100%
XM_232968.6	PREDICTED: Homo sapiens similar to Homeobox even-skipped	40.1	40.1	2%	3.3	100%
NM_000522.3	Homo sapiens homeobox A13 (HOXA13), mRNA	40.1	40.1	5%	3.3	83%

Figura 20. Principais Hits do Blastn da seqüência primer C2 pai. Observamos maior similaridade com o gene *forkhead box L2 (FOXL2)*, mRNA.

RID: 1171058849-18804-181703137370.BLASTQ1

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Transcripts						
XM_001131060.1	PREDICTED: Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	1112	1112	98%	0.0	96%
NM_023057.2	Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	1112	1112	98%	0.0	96%
NM_005250.1	Homo sapiens forkhead box L1 (FOXL1), mRNA	95.5	139	25%	6e-17	100%
NM_001453.1	Homo sapiens forkhead box C1 (FOXC1), mRNA	85.7	143	18%	6e-14	91%
NM_012136.1	Homo sapiens forkhead box E3 (FOXE3), mRNA	83.3	129	28%	2e-13	89%
XM_001132770.1	PREDICTED: Homo sapiens forkhead box E3 (FOXE3), mRNA	83.3	125	26%	2e-13	93%
NM_005251.1	Homo sapiens forkhead box C2 (MZF-1, mesenchyme forkhead 1)	79.3	121	19%	4e-12	86%
NM_004473.3	Homo sapiens forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	79.3	79.8	15%	4e-12	84%
NM_004472.2	Homo sapiens forkhead box D1 (FOXD1), mRNA	77.3	77.8	15%	1e-11	84%
NM_004118.3	Homo sapiens forkhead-like 18 (Drosophila) (FKHL18), mRNA	73.3	73.8	23%	2e-10	82%
NM_004474.2	Homo sapiens forkhead box D2 (FOXD2), mRNA	69.3	69.9	15%	4e-09	83%
NM_033250.2	Homo sapiens forkhead box Q1 (FOXQ1), mRNA	61.3	61.9	7%	9e-07	91%
NM_012133.1	Homo sapiens forkhead box D3 (FOXD3), mRNA	60.0	60.0	18%	3e-06	80%
XM_928857.2	PREDICTED: Homo sapiens FOXD4-like 6, transcript variant 1	58.0	98.1	11%	1e-05	92%
NM_199135.1	Homo sapiens FOXD4-like 2 (FOXD4L2), mRNA	58.0	98.1	11%	1e-05	92%
NM_005249.3	Homo sapiens forkhead box G1B (FOXG1B), mRNA	56.0	56.0	30%	5e-05	76%
NM_207305.2	Homo sapiens forkhead box D4 (FOXD4), mRNA	52.0	52.0	18%	6e-04	80%
XR_016591.1	PREDICTED: Homo sapiens similar to forkhead box D4 like 3	50.1	90.2	11%	0.003	92%
NM_199244.2	Homo sapiens forkhead box D4-like 4 (FOXD4L4), mRNA	50.1	90.2	11%	0.003	92%
NM_001451.1	Homo sapiens forkhead box F1 (FOXF1), mRNA	48.1	48.1	5%	0.013	91%
NM_001452.1	Homo sapiens forkhead box F2 (FOXF2), mRNA	44.1	44.1	3%	0.20	96%
NM_012134.3	Homo sapiens forkhead box D4-like 1 (FOXD4L1), mRNA	42.1	82.3	11%	0.81	92%
NM_001013735.1	Homo sapiens forkhead box B2 (FOXB2), mRNA	42.1	42.1	7%	0.81	84%
NM_012132.1	Homo sapiens forkhead box B1 (FOXB1), mRNA	40.1	40.1	5%	3.2	86%
XM_001130976.1	PREDICTED: Homo sapiens similar to Forkhead box protein L1	40.1	40.1	7%	3.2	85%
XM_941234.2	PREDICTED: Homo sapiens similar to Forkhead box protein L1	40.1	40.1	7%	3.2	85%
NM_004496.2	Homo sapiens forkhead box A1 (FOXA1), mRNA	40.1	40.1	7%	3.2	84%

Figura 21. Principais Hits do Blastn da seqüência primer A Mãe. Observamos maior similaridade com o gene *forkhead box L2 (FOXL2)*, mRNA.

RID: 1171051094-2984-173705330810.BLASTQ3.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Transcripts						
NM_023057.2	Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	540	938	99%	0.0	99%
XM_001131060.1	PREDICTED: Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	749	797	78%	0.0	99%
NM_005250.1	Homo sapiens forkhead box L1 (FOXL1), mRNA	50.1	50.1	13%	0.002	86%
NM_012136.1	Homo sapiens forkhead box E3 (FOXE3), mRNA	44.1	44.1	4%	0.15	100%
XM_001132770.1	PREDICTED: Homo sapiens forkhead box E3 (FOXE3), mRNA	44.1	44.1	4%	0.15	100%
NM_004474.2	Homo sapiens forkhead box D2 (FOXD2), mRNA	44.1	44.1	4%	0.15	100%
NM_018253.3	Homo sapiens additional sex combs like 2 (Drosophila) (ASXL2),	44.1	44.1	5%	0.15	96%
NM_004472.2	Homo sapiens forkhead box D1 (FOXD1), mRNA	44.1	44.1	4%	0.15	100%
NM_053043.1	Homo sapiens proline rich 8 (PRR8), mRNA	42.1	42.1	5%	0.58	96%
XM_039705.2	PREDICTED: Homo sapiens similar to Homeobox even-skipped	40.1	40.1	4%	2.3	100%
XM_0292958.6	PREDICTED: Homo sapiens similar to Homeobox even-skipped	40.1	40.1	4%	2.3	100%
NM_000522.3	Homo sapiens homeobox A13 (HOXA13), mRNA	40.1	40.1	7%	2.3	88%
XM_001130978.1	PREDICTED: Homo sapiens similar to Forkhead box protein L1	38.2	38.2	4%	9.1	95%
XM_041234.2	PREDICTED: Homo sapiens similar to Forkhead box protein L1	38.2	38.2	4%	9.1	95%
NM_005134.2	Homo sapiens CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	38.2	38.2	3%	9.1	100%
NM_015079.2	Homo sapiens TBC1 domain family, member 2B (TBC1D2B), mRNA	38.2	38.2	3%	9.1	100%
XM_041436.1	PREDICTED: Homo sapiens similar to coiled-coil domain containing 42	38.2	38.2	3%	9.1	100%
XM_0373547.3	PREDICTED: Homo sapiens similar to coiled-coil domain containing 42	38.2	38.2	3%	9.1	100%
NM_021228.1	Homo sapiens serine arginine-rich pre-mRNA splicing factor SR-A1	38.2	38.2	4%	9.1	95%
NM_005078.1	Homo sapiens transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog,	38.2	38.2	4%	9.1	95%

Figura 22. Principais Hits do Blastn da sequência primer C2 Mãe. Observamos maior similaridade com o gene *forkhead box L2 (FOXL2)*, mRNA.

RID: 1171058769-10026-106656017453.BLASTQ3.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Transcripts						
XM_001131060.1	PREDICTED: Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	500	500	38%	1e-138	99%
NM_023057.2	Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	500	500	38%	1e-138	99%
NM_005250.1	Homo sapiens forkhead box L1 (FOXL1), mRNA	60.0	60.0	10%	3e-06	87%
NM_012136.1	Homo sapiens forkhead box E3 (FOX E3), mRNA	54.0	54.0	4%	2e-04	100%
XM_001132770.1	PREDICTED: Homo sapiens forkhead box E3 (FOX E3), mRNA	54.0	54.0	4%	2e-04	100%
NM_004474.2	Homo sapiens forkhead box D2 (FOXD2), mRNA	54.0	54.0	4%	2e-04	100%
NM_004472.2	Homo sapiens forkhead box D1 (FOXD1), mRNA	54.0	54.0	4%	2e-04	100%
NM_005249.3	Homo sapiens forkhead box G1B (FOXG1B), mRNA	46.1	46.1	4%	0.051	96%
NM_001453.1	Homo sapiens forkhead box C1 (FOXC1), mRNA	46.1	46.1	4%	0.051	96%
NM_012133.1	Homo sapiens forkhead box D3 (FOXD3), mRNA	46.1	46.1	4%	0.051	96%
NM_004118.3	Homo sapiens forkhead-like 18 (Drosophila) (FKHL18), mRNA	46.1	46.1	4%	0.051	96%
XM_328857.2	PREDICTED: Homo sapiens FOXD4-like 5, transcript variant 1	42.1	42.1	7%	0.80	87%
NM_199135.1	Homo sapiens FOXD4-like 2 (FOXD4L2), mRNA	42.1	42.1	7%	0.80	87%

Figura 23. Principais Hits do Blastn da sequência primer C2 paciente. Observamos maior similaridade com o gene *forkhead box L2 (FOXL2)*, mRNA. RID: 1171058811-12144-13329616666.BLASTQ3.

A análise dos resultados do Blastn nos mostra a identificação de dois principais hits com similaridade de seqüência às amostras avaliadas muito superior aos outros hits apresentados no Blastn (**Figuras 18 - 23**). Estes hits são o *Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2)*, mRNA, NM_023067.2, GI:42716284 e o PREDICTED: *Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2)*, mRNA, XM_001131060.1, GI:113415274. O primeiro (GI:42716284) representa a seqüência completa do gene *FOXL2* com 2744pb e o segundo (GI: 113415274) representa a predição de uma seqüência através do uso de análise computacional automatizada, do gene *FOXL2* com 1269pb.

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

As seqüências foram então submetidas à ferramenta Clustal W para pareamento entre si e com a seqüência referência (GI:42716284) (Clustal W). O resultado do Clustal W mostrou ótimo alinhamento entre as seqüências primer A das três amostras analisadas. Entretanto, o Clustal W das seqüências primer C2 das três amostras mostrou um perfeito alinhamento destas até a altura da base 863 da seqüência referência, e após a qual ocorre uma perda do pareamento. Notamos que a perda do pareamento se deve a alteração em bases na amostra da paciente (**Figura 24**). Foram submetidos novamente, ao Clustal W, a seqüência referência e as seqüências primer C2 das amostras do pai e a mãe. Observamos então um ótimo alinhamento entre estas três seqüências, sugerindo uma provável alteração na seqüência da paciente (**Figura 25**).

Formatado: Português (Brasil)

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

Pai-prim-C2      -----GGCAACTACTGGACGCTGGACCCCGCCTGCGAAGACATGTTTCGAGAAGGGC  51
Mae-prim-C2      -----GGCAACTACTGGACGCTGGACCCCGCCTGCGAAGACATGTTTCGAGAAGGGC  51
FOXL2-REF.       GAGCGCAAGGGCAACTACTGGACGCTGGACCCCGCCTGCGAAGACATGTTTCGAGAAGGGC  660
Paciente-prim-C2 --ACGCAAGGGCAACTACTGGACGCTGGACCCCGCCTGCGAAGACATGTTTCGAGAAGGGC  58
                  *****

Pai-prim-C2      AACTACCGGCGCCGCGCCGCATGAAGAGGCCCTTCCGGCCGCGCCCGCCTTCCAG  111
Mae-prim-C2      AACTACCGGCGCCGCGCCGCATGAAGAGGCCCTTCCGGCCGCGCCCGCCTTCCAG  111
FOXL2-REF.       AACTACCGGCGCCGCGCCGCATGAAGAGGCCCTTCCGGCCGCGCCCGCCTTCCAG  720
Paciente-prim-C2 AACTACCGGCGCCGCGCCGCATGAAGAGGCCCTTCCGGCCGCGCCCGCCTTCCAG  118
                  *****

Pai-prim-C2      CCCGGCAAGGGGCTCTTCGGGGCCGGAGGCGCCGAGGCGGGTGCGGCGTGGCGGGCGCC  171
Mae-prim-C2      CCCGGCAAGGGGCTCTTCGGGGCCGGAGGCGCCGAGGCGGGTGCGGCGTGGCGGGCGCC  171
FOXL2-REF.       CCCGGCAAGGGGCTCTTCGGGGCCGGAGGCGCCGAGGCGGGTGCGGCGTGGCGGGCGCC  780
Paciente-prim-C2 CCCGGCAAGGGGCTCTTCGGGGCCGGAGGCGCCGAGGCGGGTGCGGCGTGGCGGGCGCC  178
                  *****

Pai-prim-C2      GGGGCCGACGGCTACGGCTACCTGGCGCCCCAAGTACCTGCAGTCTGGCTTCTCTCAAC  231
Mae-prim-C2      GGGGCCGACGGCTACGGCTACCTGGCGCCCCAAGTACCTGCAGTCTGGCTTCTCTCAAC  231
FOXL2-REF.       GGGGCCGACGGCTACGGCTACCTGGCGCCCCAAGTACCTGCAGTCTGGCTTCTCTCAAC  840
Paciente-prim-C2 GGGGCCGACGGCTACGGCTACCTGGCGCCCCAAGTACCTGCAGTCTGGCTTCTCTCAAC  238
                  *****

Pai-prim-C2      AACTCGTGGCCGCTACCGCAGCCTCCCTCACCCATGCCCTATGCCTCCTGCCAGATGGCG  291
Mae-prim-C2      AACTCGTGGCCGCTACCGCAGCCTCCCTCACCCATGCCCTATGCCTCCTGCCAGATGGCG  291
FOXL2-REF.       AACTCGTGGCCGCTACCGCAGCCTCCCTCACCCATGCCCTATGCCTCCTGCCAGATGGCG  900
Paciente-prim-C2 AACTCGTGGCCGCTACCGCAGCCTCCCTCACCCATGCCCTATGCCTCCTGCCAGATGGCG  298
                  *****

Pai-prim-C2      GCAGCCGACGGCTGCAGCAGCTGCGGCTGCAGCCGCGGGCCCGGTAGCCCTGGCGCG  351
Mae-prim-C2      GCAGCCGACGGCTGCAGCAGCTGCGGCTGCAGCCGCGGGCCCGGTAGCCCTGGCGCG  351
FOXL2-REF.       GCAGCCGACGGCTGCAGCAGCTGCGGCTGCAGCCGCGGGCCCGGTAGCCCTGGCGCG  960
Paciente-prim-C2 GAANCCNANNNGTNGNACAACCTTNGGGTNGNANCCNNGGCCCGNAANCCCTNGGNNNG  358
                  * * * * *

Pai-prim-C2      GCCGCTGTGGTCAAGGGGCTGGCGGGCCCGCCGCTCGTACGGGCGGTACACACGCGTG  411
Mae-prim-C2      GCCGCTGTGGTCAAGGGGCTGGCGGGCCCGCCGCTCGTACGGGCGGTACACACGCGTG  411
FOXL2-REF.       GCCGCTGTGGTCAAGGGGCTGGCGGGCCCGCCGCTCGTACGGGCGGTACACACGCGTG  1020
Paciente-prim-C2 NCCNTTNNGNNAAGGGGTTNGGGGGCCCGCCCTTCTAANGGNCNNAANNCCNNGG  418
                  * * * * *

Pai-prim-C2      CAGAGCATGGCGCTGCCCCCGGCGTAGTGAATCGTACAATGGCCTGGGAGGCCCGCG  470
Mae-prim-C2      CAGAGCATGGCGCTGCCCCCGGCGTAGTGAATCGTACAATGGCCTGGGAGGCCCGCG  470
FOXL2-REF.       CAGAGCATGGCGCTGCCCCCGGCGTAGTGAATCGTACAATGGCCTGGGAGGCCCGCG  1080
Paciente-prim-C2 AAAANANGGNNTTNCCTCCCGGNAATGNAANNCNAANAAGGGCNGGGAGGCGCGCG  478
                  * * * * *

Pai-prim-C2      GCCGCACCCCGCCTCCCGNGGAAAAACAANNGNATTNNGNAAGCACANCAATTTGNN  530
Mae-prim-C2      GCCGCACCCCGCCTCCCGNGGAAAAACAANNGNATTNNGNAAGCACANCAATTTGNN  528
FOXL2-REF.       GCCGCACCCCGCCTCCCGNGGAAAAACAANNGNATTNNGNAAGCACACCAATTTGCACG  1138
Paciente-prim-C2 GCNGAACCCNGCTTCGGCAAAANNA-NNAANNGGATTTGGNANNGAAAAACAATTTGNAG  537
                  * * * * *

```

Figura 24. Resultado do Clustal W. Sequências primer C2 das três amostras (pai, mãe e paciente) e do gene referência (GI:42716284). Mostrando perda da similaridade ao nível da base 864 do gene referência por alteração na sequência da paciente (quadrado vermelho).

Formatado: Português (Brasil)

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

Pai      -----GGCAACTACTGGACGCTGGACCCGGCCTGCGAAGACATGTTTCGAGAAGGGC  51
Mae      -----GGCAACTACTGGACGCTGGACCCGGCCTGCGAAGACATGTTTCGAGAAGGGC  51
FOXL2-REF. GAGCGCAAGGGCAACTACTGGACGCTGGACCCGGCCTGCGAAGACATGTTTCGAGAAGGGC  660
          *****

Pai      AACTACCGGCGCCGCGCGCATGAAGAGGCCCTTCCGGCCGCGCCCGCGCACTTCCAG  111
Mae      AACTACCGGCGCCGCGCGCATGAAGAGGCCCTTCCGGCCGCGCCCGCGCACTTCCAG  111
FOXL2-REF. AACTACCGGCGCCGCGCGCATGAAGAGGCCCTTCCGGCCGCGCCCGCGCACTTCCAG  720
          *****

Pai      CCCGGCAAGGGGCTCTTCGGGGCCGAGGCGCCGAGCGGGTGCGGCGTGGCGGGCGCC  171
Mae      CCCGGCAAGGGGCTCTTCGGGGCCGAGGCGCCGAGCGGGTGCGGCGTGGCGGGCGCC  171
FOXL2-REF. CCCGGCAAGGGGCTCTTCGGGGCCGAGGCGCCGAGCGGGTGCGGCGTGGCGGGCGCC  780
          *****

Pai      GGGGCGACGGCTACGGCTACCTGGCGCCCCCAAGTACCTGCAGTCTGGCTTCTCAAC  231
Mae      GGGGCGACGGCTACGGCTACCTGGCGCCCCCAAGTACCTGCAGTCTGGCTTCTCAAC  231
FOXL2-REF. GGGGCGACGGCTACGGCTACCTGGCGCCCCCAAGTACCTGCAGTCTGGCTTCTCAAC  840
          *****

Pai      AACTCGTGGCCGCTACCGCAGCTTCCCTCACCATGCCTATGCCTCCTGCCAGATGGCG  291
Mae      AACTCGTGGCCGCTACCGCAGCTTCCCTCACCATGCCTATGCCTCCTGCCAGATGGCG  291
FOXL2-REF. AACTCGTGGCCGCTACCGCAGCTTCCCTCACCATGCCTATGCCTCCTGCCAGATGGCG  900
          *****

Pai      GCAGCCGACGGCTGCAGCAGCTGCGGCTGCAGCCGCGGGCCCCGGTAGCCCTGGCGCG  351
Mae      GCAGCCGACGGCTGCAGCAGCTGCGGCTGCAGCCGCGGGCCCCGGTAGCCCTGGCGCG  351
FOXL2-REF. GCAGCCGACGGCTGCAGCAGCTGCGGCTGCAGCCGCGGGCCCCGGTAGCCCTGGCGCG  960
          *****

Pai      GCCGCTGTGGTCAAGGGGCTGGCGGGCCCGCGCCCTCGTACGGGCGGTACACACGCGTG  411
Mae      GCCGCTGTGGTCAAGGGGCTGGCGGGCCCGCGCCCTCGTACGGGCGGTACACACGCGTG  411
FOXL2-REF. GCCGCTGTGGTCAAGGGGCTGGCGGGCCCGCGCCCTCGTACGGGCGGTACACACGCGTG  1020
          *****

Pai      CAGAGCATGGCGCTGCCCCCGGCGTAGTGAAGTCTGTAACAATGGCCTGGGAGGCCGCGC  471
Mae      CAGAGCATGGCGCTGCCCCCGGCGTAGTGAAGTCTGTAACAATGGCCTGGGAGGCCGCGC  471
FOXL2-REF. CAGAGCATGGCGCTGCCCCCGGCGTAGTGAAGTCTGTAACAATGGCCTGGGAGGCCGCGC  1080
          *****

Pai      GCCGCACCCCGCCTCCGC-----  490
Mae      GCCGCACCCCGCCTCCGC-----  491
FOXL2-REF. GCCGCACCCCGCCTCCGCACCCCGC-----  1140
          *****

```

Formatado: Inglês (EUA)

Figura 25. Resultado do Clustal W. Seqüências primer C2 das duas amostras (pai e mãe) e do gene referência (GI:42716284). Mostrando alta similaridade entre estas seqüências, não estando presente a seqüência da paciente. Retângulo vermelho mostra bases 864 em azul.

Formatado: Português (Brasil)

Na análise das seqüências obtidas através do uso do programa *CodonCode Aligner*, bem como do eletroferograma, observamos também um pareamento das seqüências obtidas com o primer A das três amostras e uma perda deste pareamento nas seqüências obtidas com o primer C2 (**Figura 26 e 27**).

Analisando atentamente a região do início da perda do pareamento, foi detectada uma provável mutação, do tipo deleção, de uma base de timidina na seqüência da paciente **(Figuras 27 e 28)**. Observamos também que a seqüência da paciente após a base mutada apresenta baixa qualidade, com interposição de bases e muitos erros de leitura **(Figura 27)**.



Figura 26. Pareamento das três seqüências no CodonCode Aligner. Observa-se pareamento perfeito entre as seqüências primer A das amostras Pai, Mãe e Paciente.

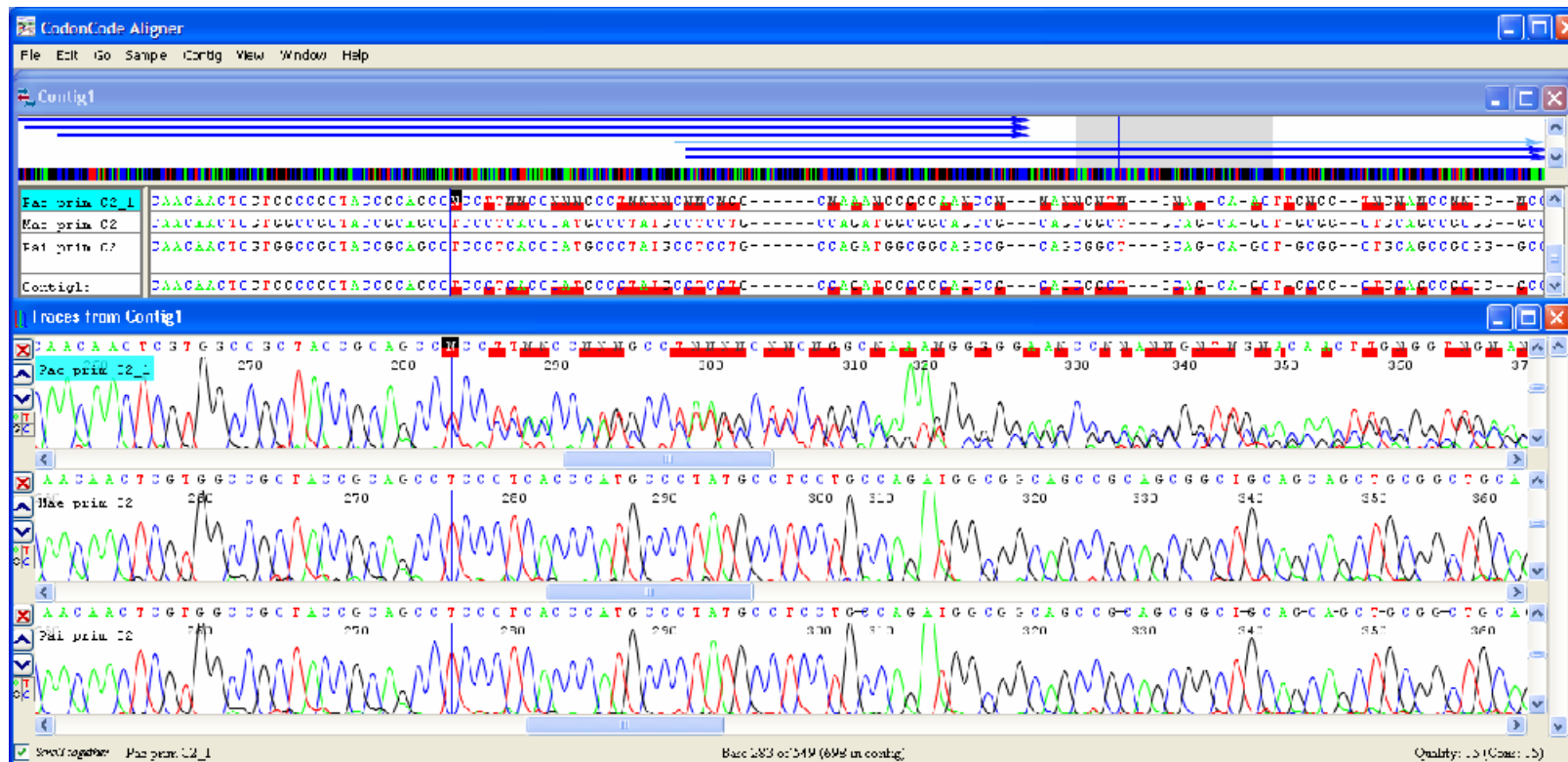


Figura 27. Pareamento das três seqüências no CodonCode Aligner. Observa-se pareamento perfeito entre as seqüências primer C2 das amostras Pai, Mãe e Paciente até a base timidina marcada com traço longitudinal azul na figura. Nota-se um erro de leitura desta base no eletroferograma da paciente (Primeiro traçado de cima para baixo) seguido de vários erros de leitura no restante desta seqüência.

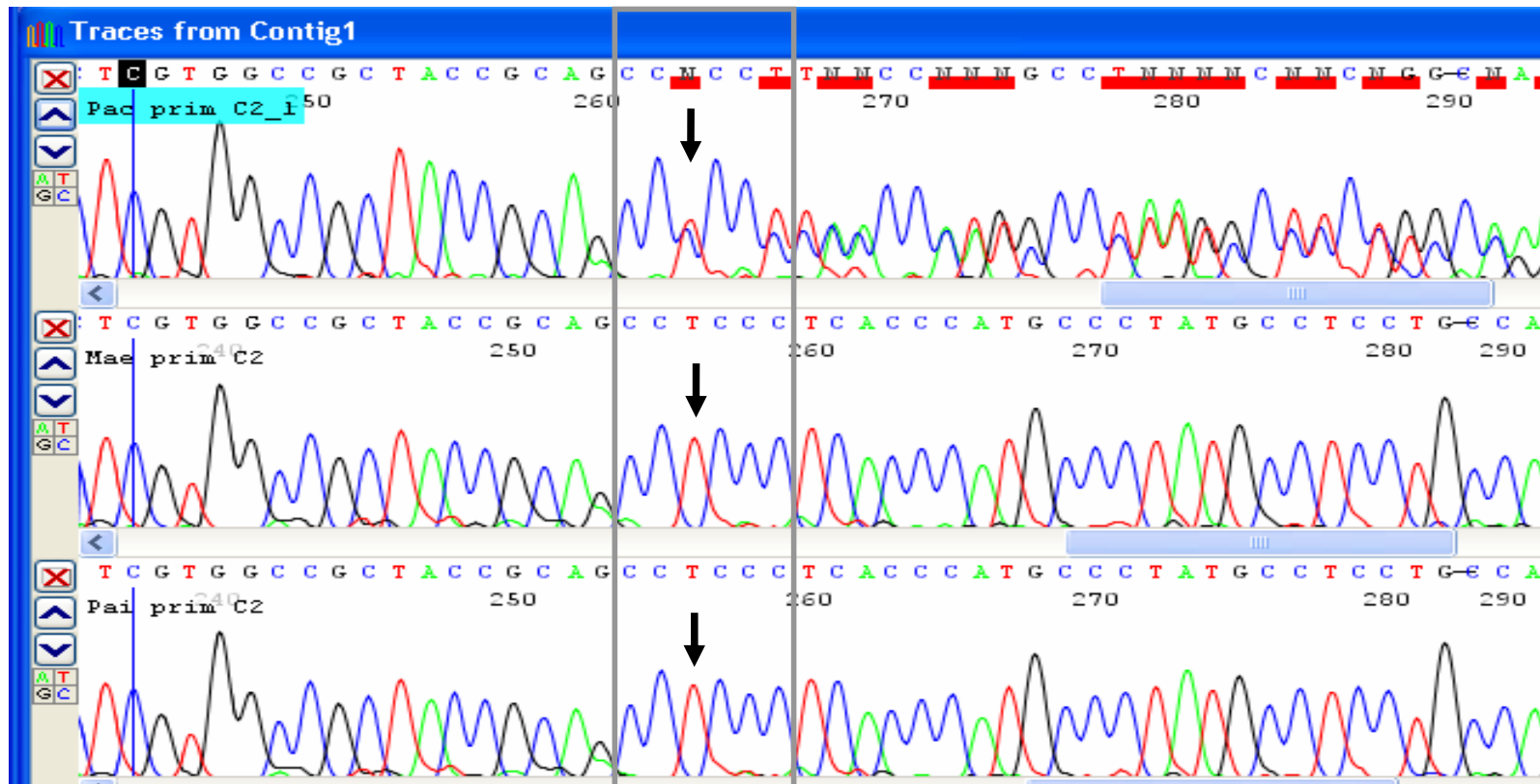


Figura 28. Pareamento das três seqüências no CodonCode Aligner. Detalhe da provável mutação, uma deleção da base timidina na seqüência obtida da amostra da paciente (Setas). Nota-se um erro de leitura desta base no eletroferograma da paciente (Primeiro traçado de cima para baixo) seguido de vários erros de leitura no restante desta seqüência.

Para avaliar a cobertura da região codante do gene *FOXL2* pelas seqüências obtidas de boa qualidade, foi submetida ao Blastn a seqüência contig produzida pelo software CodonCode Aligner a partir das seqüências primer A e primer C2 do pai e da mãe. As seqüências da paciente foram excluídas desta etapa devido à provável mutação encontrada e que atrapalharia o resultado do Blastn. O resultado deste Blastn mostrou um alinhamento com os principais hits encontrados anteriormente. O melhor alinhamento ocorreu com a seqüência escolhida como referência NM_023067.2, GI:42716284 (**Figura 29**).

Sequences producing significant alignments:		Score	E Value
ref NM_023067.2 	Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	1798	0.0
ref NT_005612.15 Hs3_5769	Homo sapiens chromosome 3 genomic cont	1798	0.0
ref NW_921807.1 HsCraAADB02_141	Homo sapiens chromosome 3 gen...	1606	0.0
ref XM_001131060.1 	PREDICTED: Homo sapiens forkhead box L2 (FOX	1592	0.0
ref NM_005250.1 	Homo sapiens forkhead box L1 (FOXL1), mRNA	95.6	9e-17
ref NT_010498.15 Hs16_10655	Homo sapiens chromosome 16 genomic c	95.6	9e-17
ref NW_926528.1 HsCraAADB02_566	Homo sapiens chromosome 16 ge...	95.6	9e-17
ref NM_001453.1 	Homo sapiens forkhead box C1 (FOXC1), mRNA	85.7	8e-14
ref NT_034880.3 Hs6_35042	Homo sapiens chromosome 6 genomic cont	85.7	8e-14
ref NW_922984.1 HsCraAADB02_247	Homo sapiens chromosome 6 gen...	85.7	8e-14
ref NM_012186.1 	Homo sapiens forkhead box E3 (FOXE3), mRNA	83.8	3e-13
ref XM_001132770.1 	PREDICTED: Homo sapiens forkhead box E3 (FOX	83.8	3e-13
ref NT_032977.8 Hs1_33153	Homo sapiens chromosome 1 genomic cont	83.8	3e-13
ref NW_921351.1 HsCraAADB02_10	Homo sapiens chromosome 1 geno...	83.8	3e-13
ref NM_005251.1 	Homo sapiens forkhead box C2 (MPH-1, mesench...	79.8	5e-12
ref NM_004473.3 	Homo sapiens forkhead box E1 (thyroid transc...	79.8	5e-12
ref NT_008470.18 Hs9_8627	Homo sapiens chromosome 9 genomic cont	79.8	5e-12
ref NW_924539.1 HsCraAADB02_387	Homo sapiens chromosome 9 gen...	79.8	5e-12
ref NM_004472.2 	Homo sapiens forkhead box D1 (FOXD1), mRNA	77.8	2e-11
ref NT_006713.14 Hs5_6870	Homo sapiens chromosome 5 genomic cont	77.8	2e-11
ref NW_922729.1 HsCraAADB02_224	Homo sapiens chromosome 5 gen...	77.8	2e-11
ref NM_004118.3 	Homo sapiens forkhead-like 18 (Drosophila) (FKH	73.8	3e-10
ref NT_028392.5 Hs20_28551	Homo sapiens chromosome 20 genomic co	73.8	3e-10

Figura 29. Blastn da seqüência contig das amostras primer A e C2 do pai e da mãe.

O contig submetido ao Blastn apresentou 100% de identidade em 907 bases, que correspondem ao fragmento da base 193 até 1099 do gene referência cujo éxon compreende fragmento de 1131pb (base 238 – 1368) (**Figura 30**). Comparando a seqüência obtida no *contig* com a região codante do gene referência, foi observado

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Código de campo alterado

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Código de campo alterado

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Código de campo alterado

Código de campo alterado

Formatado: Inglês (EUA)

Código de campo alterado

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Código de campo alterado

que as seqüências obtidas com boa qualidade cobriram as primeiras 842pb do éxon do gene *FOXL2*.

```

>ref|NM_023067.2| Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), mRNA Length=2744
Score = 1798 bits (907), Expect = 0.0
Identities = 907/907 (100%), Gaps = 0/907 (0%) Strand=Plus/Plus

Query 6      GAGCGGAGAGCAGAGGCGGCCCGCGCGCGCGGCTTTGTTCATGATGGCCAGCTAC 65
Sbjct 193    GAGCGGAGAGCAGAGGCGGCCCGCGCGCGCGGCTTTGTTCATGATGGCCAGCTAC 252
Query 66     CCCGAGCCCCGAGGACGCGGGCGGGGGCCCTGCTGGCCCCAGAGACCGGTTCGCACAGTCAAG 125
Sbjct 253    CCCGAGCCCCGAGGACGCGGGCGGGGGCCCTGCTGGCCCCAGAGACCGGTTCGCACAGTCAAG 312
Query 126    GAGCCAGAAGGGCCGCGCCGAGCCCAGGCAAGGGCGGTGGGGGTGGCGGGGACAGCC 185
Sbjct 313    GAGCCAGAAGGGCCGCGCCGAGCCCAGGCAAGGGCGGTGGGGGTGGCGGGGACAGCC 372
Query 186    CCGGAGAAGCCGGACCCGCGCGCAGAAGCCCCCTACTCGTACGTGGCGCTCATCGCCATG 245
Sbjct 373    CCGGAGAAGCCGGACCCGCGCGCAGAAGCCCCCTACTCGTACGTGGCGCTCATCGCCATG 432
Query 246    GCGATCCCGGAGAGCGCGGAGAAGAGGCTCACGCTGTCCGGCATCTACCAGTACATCATC 305
Sbjct 433    GCGATCCCGGAGAGCGCGGAGAAGAGGCTCACGCTGTCCGGCATCTACCAGTACATCATC 492
Query 306    GCGAAGTTCCCGTTCTACGAGAAGAATAAGAAGGGCTGGCAAAATAGCATCCGCCACAAC 365
Sbjct 493    GCGAAGTTCCCGTTCTACGAGAAGAATAAGAAGGGCTGGCAAAATAGCATCCGCCACAAC 552
Query 366    CTCAGCCTCAACGAGTGCTTCATCAAGGTGCCGCGAGGGCGCGCGGCGAGCGCAAGGGC 425
Sbjct 553    CTCAGCCTCAACGAGTGCTTCATCAAGGTGCCGCGAGGGCGCGCGGCGAGCGCAAGGGC 612
Query 426    AACTACTGGACGCTGGACCCGGCCTGCGAAGACATGTTTCGAGAAGGGCAACTACCGGCGC 485
Sbjct 613    AACTACTGGACGCTGGACCCGGCCTGCGAAGACATGTTTCGAGAAGGGCAACTACCGGCGC 672
Query 486    CGCCGCGCATGAAGAGGCCCTTCCGGCCCGCCCGCGCACTTCCAGCCCGGCAAGGGG 545
Sbjct 673    CGCCGCGCATGAAGAGGCCCTTCCGGCCCGCCCGCGCACTTCCAGCCCGGCAAGGGG 732
Query 546    CTCTTCGGGGCCGGAGGCGCGCAGGCGGGTGCGGCGTGGCGGGCGCGGGGGCCGACGGC 605
Sbjct 733    CTCTTCGGGGCCGGAGGCGCGCAGGCGGGTGCGGCGTGGCGGGCGCGGGGGCCGACGGC 792
Query 606    TACGGCTACCTGGGCGCCCCCAAGTACCTGCAGTCTGGCTTCCCAACAACCTCGTGGCCG 665
Sbjct 793    TACGGCTACCTGGGCGCCCCCAAGTACCTGCAGTCTGGCTTCCCAACAACCTCGTGGCCG 852
Query 666    CTACCGCAGCCTCCCTCACCCATGCCCTATGCCCTCCTGCCAGATGGCGGGCAGCCGAGCG 725
Sbjct 853    CTACCGCAGCCTCCCTCACCCATGCCCTATGCCCTCCTGCCAGATGGCGGGCAGCCGAGCG 912
Query 726    GCTGCAGCAGCTGCGGCTGCAGCCGCGGGCCCCGGTAGCCCTGGCGGGCGCGCTGTGGTC 785
Sbjct 913    GCTGCAGCAGCTGCGGCTGCAGCCGCGGGCCCCGGTAGCCCTGGCGGGCGCGCTGTGGTC 972
Query 786    AAGGGGCTGGCGGGCCCGGCGCCTCGTACGGGCGGTACACACGCGTGCAGAGCATGGCG 845
Sbjct 973    AAGGGGCTGGCGGGCCCGGCGCCTCGTACGGGCGGTACACACGCGTGCAGAGCATGGCG 1032
Query 846    CTGCCCCCGGCGTAGTGAACCTCGTACAATGGCCTGGGAGGCCCGCGGGCGCACCCCGG 905
Sbjct 1033   CTGCCCCCGGCGTAGTGAACCTCGTACAATGGCCTGGGAGGCCCGCGGGCGCACCCCGG 1092
Query 906    CCTCCGC 912
Sbjct 1093   CCTCCGC 1099

```

Figura 30. Alinhamento pelo Blastn da seqüência contig obtida no CodonCode Aligner com a seqüência que apresentou maior identidade com a seqüência testada. Esta seqüência corresponde à seqüência referência utilizada para comparações.

A análise da repercussão da mutação, identificada na amostra da paciente, na seqüência de aminoácidos da proteína, foi realizada através da identificação dos códons com o uso da ferramenta *ORF finder* (NCBI). A seqüência referência foi submetida ao *ORF finder* para a identificação das matrizes abertas de leitura, dos códons e da seqüência protéica (**Figura 31 e 32**). Posteriormente foi realizada a deleção da timidina, base 864 da seqüência referência do gene *FOXL2*. Esta seqüência então, com a deleção identificada na amostra da paciente foi também submetida ao *ORF finder* para identificação das matrizes abertas de leitura, dos códons e da seqüência de aminoácidos (**Figura 33**). As duas seqüências de proteínas foram então submetidas ao alinhamento pela ferramenta Clustal W.

Foi observado através do *ORF finder* que a deleção da base timidina determina uma modificação importante na seqüência de aminoácidos a partir do segundo códon após a mutação (**Figura 34**). O códon da deleção e o códon subsequente, apesar da mutação, determinaram a síntese do mesmo aminoácido (**Figura 32 e 33**). Além disso, ocorre o aparecimento de um códon de terminação após o aminoácido 269 da seqüência mutada, ou seja, cerca de 107 aa. antes do esperado para uma proteína *FOXL2* normal (**Figura 33 e 34**).

```

1 tgggcgact ccccatggcc agaggtgag ctccactccc gccggccgct ccttagggga
61 aggggaagga gaggggagag cagcgacagg cctccagcaa gcaagcgcgg gcggcatccg
121 cagtctccag aagtttgaga cttggccgta agcggactcg tgcgccccaa ctctttgccg
181 cgccagcgcc tggagcggag agcagaggcg gcccgccgpc ggccgcccgg ctttgcatg
241 atggccagct accccgagcc cgaggacgcy gcgggggccc tgctggcccc agagaccggt
301 cgcacagtca aggagccaga agggcccgcc cggagcccag gcaaggggcg tgggggtggc
361 ggccggacag ccccgagaaa gccggaccgg gcgcagaagc ccccgctact gtacgtggcg
421 ctcatcgcca tggcgatccg cgagagcgcy gagaagaggg tcaagctgtc cggcatctac
481 cagtacatca tcgcaagtt cccgttctac gagaagaata agaagggtg gcaaaatagc
541 atccgcacac acctcagcct caacgagtgc ttcataaagg tgccgcgcga gggcgccggc
601 gagcgcaagg gcaactactg gacgtggac ccggcctcgg aagacatgtt cgagaaggc
661 aactaccggc gcccgccgcy catgaagagg ccttccggc cggcccccgc gcaactccag
721 cccggcaagg ggctcttcgg ggccggaggc gccgcaggcg ggtgcggcgt ggcggcgcc
781 gggggcgagc gctacggcta cctggcgccc cccaagtacc tgagctctgg ctctctcaac
841 aactcgtggc cgctaccgca gccctccca cccatgccc atgctcctg ccagatggcg
901 gcagcccgag cggctgcagc agctgggct gcagcccgcy gccccggtag cctggcgcy
961 gccgctgtgg tcaaggggct ggccggccc gccgcctcgt acgggcccga cacacgcgtg
1021 cagagcattg cgctgcccc cggcgtagtg aactcgtaca atggcctggg aggcccgccg
1081 gccgcacccc gcaactccgg gcaccccac ccgcatccg acgcaaccca tctgcacgcy
1141 gccgcccagc cgccgctgc cccaccgac cacggggcgg ccgcgcccgc gccgggccc
1201 ctccagcctg ccagcccagc caccgcccgg ccccgccgcy ccgcgcccac cagtgcgccc
1261 ggcttgcagt tcgcttctgc ccggcagccc gagctcgcca tgatgattg ctcttactgg
1321 gaccacgcca ccaagaccgg ccgctcgcat tccgctcctg atctctgga gccacccga
1381 tgccggtgca gacggatgcy aggatgcagg gacgcgcgac gccggccccg gtcgcagccg
1441 acgacgcgcy cgccagcctg acctcacacc ctctggggcc gcctctggag ccagcgcaca
1501 gggctccctc gtgcttttcc gcttccctaa gctcctgctg ctctctttg tccctcagt
1561 ttatgtcctc ctgtgctcac ctccctgacc tctgtgacct tgactcccc tggcctgaag
1621 ctgctctctc ggcgctcttc taactgggctc gctctcttcc ggagcccag cgtctctctc
1681 ccaaattcac cgcgaaaagg gcccgggcgg gaggtgcgac cggcgctcgg cagcgcagac
1741 ctcttgccct tctctcacag gtcgggtgcy tcgctctccg cgttccccgc ccgactgccc
1801 tgcaagccat ggctagacgc gccggacagg actgatggcg ggaccgcyct gcccgagaaa
1861 gggacggacc aatacgtgtg tttgctccgc gaacctctt gaagctgttc agaagccgct
1921 tgccgccccg cccactaggc gggcgggggg ttgggaccca gccggagccg gggcagcctg
1981 gctccacggc ctgtactcgg tttacaccgc gggcgggcgc ggagggagc tgcgttctc
2041 ccgctatcag tcccgctcgt tcgggcacct ccgggccccg gccgctggct aatgtttgt
2101 ttgaaagatc ggtggaactt ttaagagag tatttaaaaa aaaaaaagg aaaaaaatt
2161 caccgggcaa ccggggaagt attgtggcct tggagttgc taaatccaaa tatgaaatc
2221 aaaagcttta gtattcctca tctctcttcc tggaaagatt gcgttagagt tttgttggg
2281 ccttcaaaaa gctgtgttca gatttaggag aatataatca ataaaagatg gtttctgcta
2341 ccaattgggg aagtttcacc ctctccctat ctgaagaaaa aaatcaaaaa caaatgtccc
2401 cggatcttcc gatgcaagtc ctggaggcag ggagatcact gctgctcgg cccacgctgc
2461 tgggacggct cgtctccct gctttttgt tttcaaacct cctgcttctc ccacctggg
2521 aaggagaaat gtgaaacccg gcagcggcgg acctaggcgg tcttgtggcc cggagccggc
2581 ccggcccgaa aaccatagac ctggtttgac tgtagctgtg tgtttggggg accaaaattt
2641 ctagagagaa ctagagcact tttgttgtg ttttttgtt tgttttgtt tttgccttg
2701 tcgattcccc aataaatttt gtgttcttc ttttaaaaa aaaa

```

Excluído: ¶

Figura 31. Sequência referência do gene *FOXL2* completa. NM_023067.2, GI:42716284. Em azul a sequência CDS da base 238 à base 1368 do gene.

Formatado: Português (Brasil)

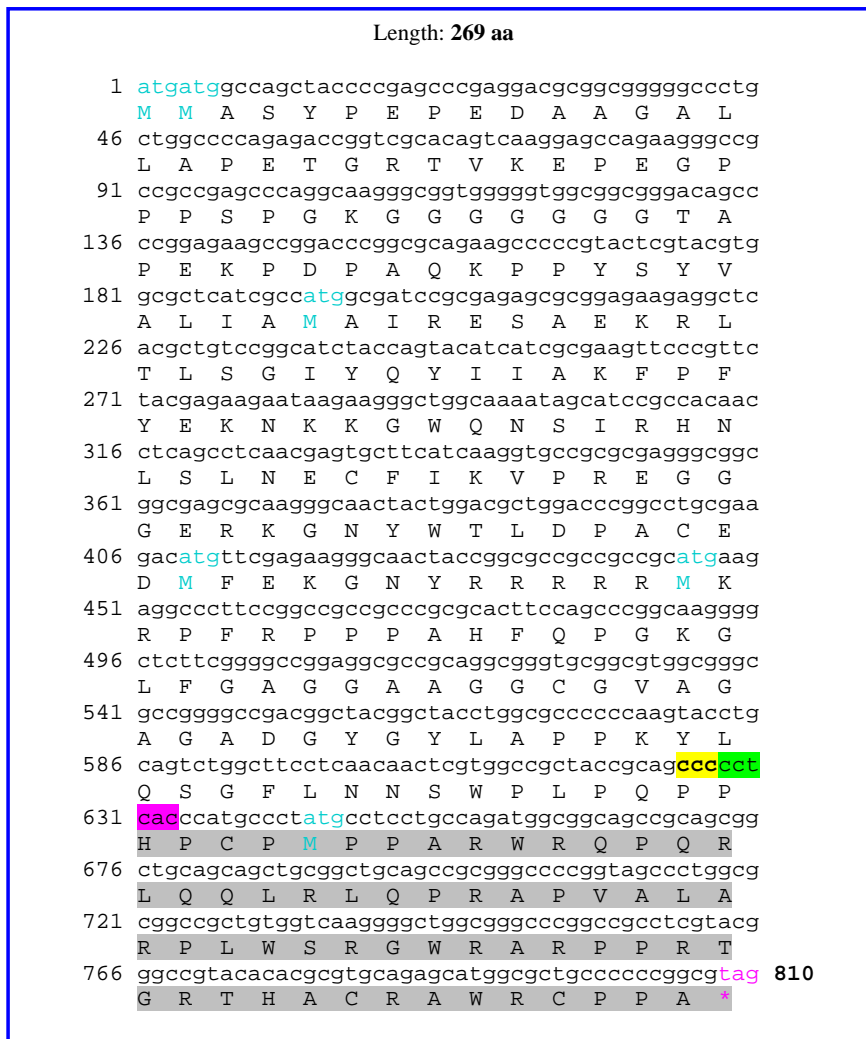


Figura 33. Resultado do *ORF finder* da sequência referência com deleção da base timidina 864 do gene ou 627 do éxon. Apresenta 269 aminoácidos. Em amarelo códon com a deleção da timidina na sequência. Em verde e em rosa o segundo e terceiro códon após o códon da mutação. Em cinza a sequência de aminoácidos após o códon mutado. Observa-se que o códon mutado em amarelo e o códon subsequente em verde apresentam alteração mas mantém mesmo sentido (mesmo aminoácido). No segundo códon após a mutação ocorre uma troca do aa. Serina pela Histidina, ou seja, não mantém mesmo sentido. Nota-se a ausência do domínio poliAlanina.

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

SEQ. REFERENCIA  MMASYPEPEDAAGALLAPETGRTVKEPEGPPSPGKGGGGGGTAEKPPDPAQKPPYSYV 60
SEQ. MUTADA      MMASYPEPEDAAGALLAPETGRTVKEPEGPPSPGKGGGGGGTAEKPPDPAQKPPYSYV 60
*****

SEQ. REFERENCIA  ALIAMAIRESAEKRLTLSGIYQYIIAKFPFYEKNNKKGWQNSIRHNLSLNECFIKVPREGG 120
SEQ. MUTADA      ALIAMAIRESAEKRLTLSGIYQYIIAKFPFYEKNNKKGWQNSIRHNLSLNECFIKVPREGG 120
*****

SEQ. REFERENCIA  GERKGNYWTLDPACEDMFEKGNRYRRRRMKRPFRRPPAHFQPGKGLFGAGGAAGGCGVAG 180
SEQ. MUTADA      GERKGNYWTLDPACEDMFEKGNRYRRRRMKRPFRRPPAHFQPGKGLFGAGGAAGGCGVAG 180
*****

SEQ. REFERENCIA  AGADGYGYLAPPKYLQSGFLNNSWPLPQPPSPMPYASCQMAAAAAAAAAAAAAAGPGSPG 240
SEQ. MUTADA      AGADGYGYLAPPKYLQSGFLNNSWPLPQPPHPCMPPARWRQPRLQLRLQPRAPVALA 240
***** * * . . . : . . . * : .

SEQ. REFERENCIA  AAAVVGLAGPAASYGPYTRVQSMALPPGVVNSYNGLGPPAAPPPPHPHPHAHHLH 300
SEQ. MUTADA      RPLWSRGWRARPPRTGRTHACRAWRCPPA----- 269
. : * . . . * : : ** .

SEQ. REFERENCIA  AAAAPPAPPHHGAAPPQGLSPASPATAAPPAPAPTSAPGLQFACARQPELAMMHCSY 360
SEQ. MUTADA      -----

SEQ. REFERENCIA  WDHSKTGALHSRLDL 376
SEQ. MUTADA      -----

```

Figura 34. Resultado do Clustal W entre a proteína do gene referência e a proteína predita a partir da mutação. Proteína predita obtida através do *ORF finder*. Destacado em amarelo está o domínio *forkhead/Winged helix*. Em vermelho está o domínio poliAlanina ausente na sequência com mutação.

6. DISCUSSÃO

A Síndrome da Blefarofimose-Ptose-Epicanto Inverso é uma doença genética rara cuja causa decorre de mutações no gene *FOXL2*. Este gene pertence à família de fatores de transcrição *forkhead/winged helix*, altamente conservada entre várias espécies. É um gene de éxon único, de 2,7 kb localizado no braço longo do cromossomo 3. A proteína predita a partir deste gene contém 376 aminoácidos e tem como características principais um domínio de 100pb com atividade de ligação ao DNA e uma seqüência de poliAlanina de 14 resíduos em região 3' ao domínio *forkhead* (Figura 34).

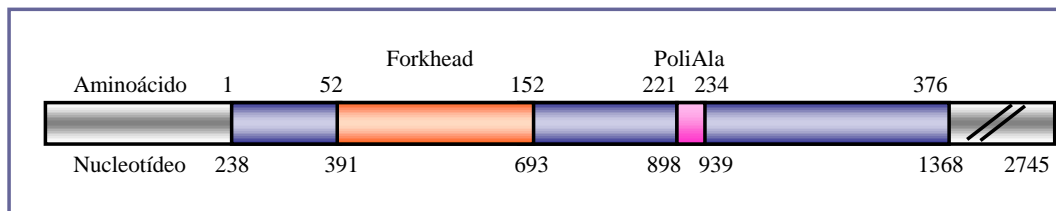


Figura 35. Estrutura do gene *FOXL2*. A caixa azul representa a seqüência codante do gene *FOXL2*; a caixa laranja representa o domínio *forkhead/winged helix* e a caixa rosa representa a seqüência poliAlanina. Adaptado (De BAERE *et al.*, 2001).

No presente estudo, o resultado do seqüenciamento foi satisfatório, pois apesar de terem sido obtidas algumas seqüências de baixa qualidade foi possível identificar a presença de uma mutação esperada para o probando. Com as seqüências alcançadas com os pares de primers A-B e C2-D, foi coberta grande parte da região codante do gene *FOXL2*. Os fragmentos esperados com o uso dos pares de primers G-H foram dispensáveis, pois se sobrepõem aos obtidos pelos primers C2-D que

apresentaram boa qualidade na análise pelo Phred. Entretanto, os fragmentos obtidos com os primers E-F, importantes na cobertura da porção final do éxon, se mostraram de má qualidade mesmo após 4 tentativas de seqüenciamento. É possível que a dificuldade no seqüenciamento deste fragmento seja em decorrência da utilização do primer F. Alguns autores têm preconizado o uso de um primer F modificado com o objetivo de obter uma ligação perfeita com a seqüência complementar (DE BAERE *et al.*, 2001; CHA *et al.*, 2003; TANG *et al.*, 2006).

Mutações em várias regiões distintas do gene *FOXL2* têm sido relatadas e relacionadas ao desenvolvimento da BPES. No presente estudo identificamos uma mutação no gene *FOXL2* em um indivíduo do sexo feminino, com cariótipo 46,XX, e com fenótipo da BPES associado à FOP (BPES tipo I). Tanto a avaliação clínica (ausência de sinais da BPES) quanto o seqüenciamento do gene de interesse nos parentais do probando nos comprovam que a mutação encontrada é uma mutação *de novo* ou esporádica. Por se tratar, a BPES, de uma doença de caráter autossômico dominante e como os pais não apresentavam sinais clínicos da síndrome, não seria de esperar casos semelhantes na família. As mutações esporádicas no gene *FOXL2* correspondem a cerca de 45% do total de mutações registradas no Banco de Dados de Mutações Humanas (HMDB, *Human Mutation Database*) para este gene.

A mutação identificada neste estudo encontra-se em heterozigose, ou seja, está presente em apenas um dos alelos para o gene *FOXL2*. Dois pontos importantes descritos nos resultados do trabalho corroboram esta afirmação. A queda abrupta e contínua da qualidade das bases na seqüência da paciente, coincidente com o local da mutação (**Figura 15B**), e, a sobreposição de bases no eletroferograma,

identificadas imediatamente após a base mutada, indicam que a paciente é heterozigota para a BPES (**Figura 27**). Este dado vem de encontro às informações da literatura e ratifica mais uma vez a teoria da haplo-insuficiência da proteína do *FOXL2* (CRISPONI *et al.*, 2001; De BAERE *et al.*, 2001, PRUEITT & ZINN, 2001; De BAERE *et al.*, 2002,). Mutações como a encontrada neste caso, levam à produção de uma proteína truncada, em apenas um dos alelos (alelo nulo), sendo que a proteína produzida pelo outro alelo é incapaz de desenvolver sua função de forma adequada.

De acordo com os resultados foi identificada uma mutação do tipo deleção de um único nucleotídeo, a timidina na base 864 do gene (g.864delT) ou 627 do éxon (c.627delT) (Figuras 23, 27 e 32). Esta mutação está localizada em região 3' ao domínio *forkhead* e 5' ao domínio poliAlanina. Portanto, neste caso o domínio principal da proteína *FOXL2*, o *forkhead/winged helix*, permanece intacto o que de certa forma foge ao padrão esperado de mutação nos casos de BPES tipo-I. Entretanto, a mudança da matriz de leitura dos códons, que normalmente ocorre com as mutações tipo deleção de um único par de base, levou ao desaparecimento do domínio poliAlanina desta proteína (Figuras 31, 32 e 33). Além disso, a proteína predita com a deleção g.864delT, pela ferramenta *ORF finder* produziu um códon de terminação prematura, após o códon 269, determinando uma proteína com 107 resíduos de aminoácidos a menos que a proteína normal, p.Pro209fsX61 (**Figuras 32 e 35**).

Excluído: (downstream)

Excluído: (upstream)

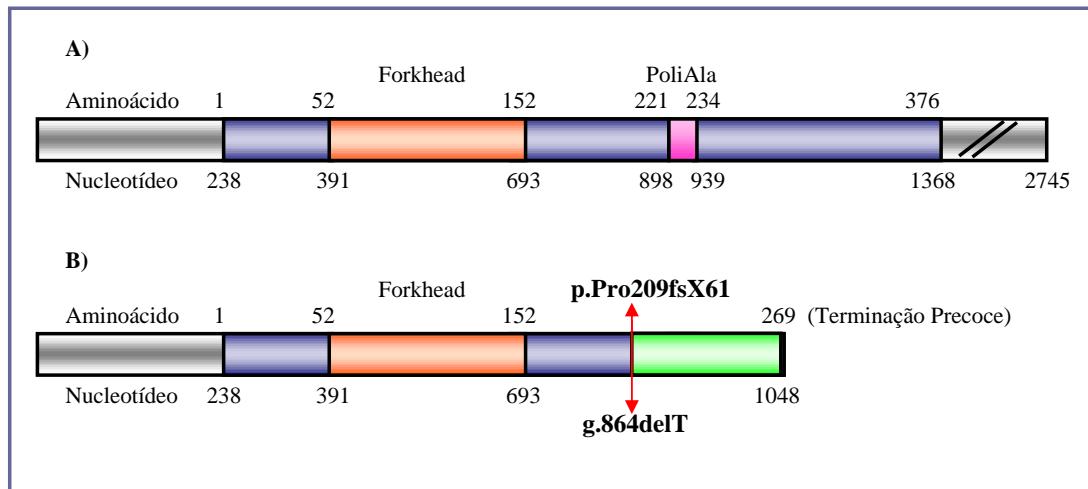


Figura 36. Esquema de comparação do gene e da proteína FOXL2 normal e com a mutação g.864delT. A – Gene *FOXL2* sem mutação, destacando a região codante (azul), e os domínios *forkhead* (laranja) e poliAla (rosa). B- Gene *FOXL2* (azul), com a localização da mutação (seta vermelha), destacando o domínio *forkhead* inalterado (laranja) e o desaparecimento do domínio poliAlanina. Em verde observa-se a região de *frameshift* (modificação da matriz de leitura) e ainda um códon de terminação prematura após o aminoácido 269.

Até esta data não há, dentre as 143 mutações descritas no Banco de Dados de Mutações em Humanos, registro de mutação semelhante à identificada no presente estudo. Portanto, trata-se de uma mutação nova, nunca descrita na literatura. Existem apenas 18 mutações localizadas entre o domínio *forkhead* e o domínio poliAlanina do gene *FOXL2*, nos registros do banco de dados de mutação do gene *FOXL2* (FOKKEMA *et al.*, 2005; *FOXL2 mutation database*). Dentre estas somente três são mutações do tipo deleção a g.737delT, a g.813delC e a g.819_821del3, das quais apenas 2 são deleção de um único par de base. É de se esperar que as mutações semelhantes a encontrada neste caso, com deleção de apenas um par de base, mesmo que em outra base, tenham também terminação prematura como a descrita acima, pois

a mudança da matriz de leitura seria muito parecida. Tang *et al.*, 2006, publicaram um estudo recente onde relataram uma mutação do tipo deleção de um único par de base, g.952delC, 3' ao domínio *forkhead* e poliAla que permaneceram normais. Esta mutação leva ao desenvolvimento de uma proteína truncada, porém com os dois domínios completos, e com terminação prematura após o códon 269, semelhante ao que ocorre com a mutação identificada no presente estudo (TANG *et al.*, 2006). Entretanto no citado trabalho o tipo de BPES dos indivíduos não foi identificado pelos autores.

As mutações que levam à formação de uma proteína truncada são essencialmente associadas ao desenvolvimento da BPES tipo-I. Isto ocorre mais frequentemente nas mutações sem sentido ou do tipo mudança na janela de leitura, localizadas na terminação 5' da *ORF*, antes da região codificadora do domínio *forkhead* ou no próprio domínio (MOUMNÉ *et al.*, 2005). Entretanto, mutações como a encontrada no presente estudo onde a proteína predita é truncada, com domínio *forkhead* completo e sem o trato poliAla, também levam ao desenvolvimento do fenótipo mais severo, com BPES e FOP (BPES tipo-I). Mutações *in-frame*, com alongamento da proteína, pela adição de 10 ou mais resíduos de alanina ao domínio poliAlanina de 14 resíduos, levam geralmente ao fenótipo da BPES tipo-II (Crisponi *et al.*, 2001). Segundo vários autores, este tipo de mutação seria responsável por um fenótipo mais brando, sem a presença de FOP, denotando portanto a presença de um alelo mutante hipomórfico (De BAERE *et al.*, 2003; MOUMNÉ *et al.*, 2005; NALLATHAMBI *et al.*, 2007). De Baere et al. publicaram, em 2003, estudos sob uma série de mutações no gene FOXL2, das quais 47% originaram *frameshift*, 34%

Excluído: frameshift

Excluído: que modificam a matriz de leitura,

foram *in-frame*, sendo a maior parte de expansões poliAla, 13% foram mutações sem sentido e 6% de mesmo sentido (De BAERE *et al.*, 2003).

Baseado na classificação proposta por De Baere *et al.*, 2003, as mutações do gene *FOXL2* podem ser divididas, de acordo com seu efeito na proteína predita, em: grupos A – D que contém proteínas truncadas: sem o domínio *forkhead* (grupo A), com domínio *forkhead* parcial (grupo B), com domínio *forkhead* completo e sem o domínio poliAla (grupo C), e com domínio *forkhead* e poliAla completos (grupo D). O grupo E compreende mutações tipo *frameshift* com proteínas alongadas e domínio *forkhead* e poliAla completos. O Grupo F contém mutações *in-frame* e o grupo G mutações de mesmo sentido. O grupo H compreende rearranjos citogenéticos e as outras variantes são incluídas no grupo I (De BAERE *et al.*, 2003). De acordo com esta classificação, a mutação do gene *FOXL2* encontrada no presente estudo é classificada como grupo C, pois apresenta o domínio *forkhead* completo e o domínio poliAlanina ausente (**Figuras 33 e 35**).

Ainda segundo o trabalho de De Baere *et al.*, 2003, mutações do gene *FOXL2*, como a identificada nesta pesquisa, que levam à predição de proteínas truncadas antes do trato poliAlanina apresentam alto risco para o desenvolvimento de FOP (BPES tipo-I). Nas mutações que levam ao truncamento ou expansão, porém com domínio *forkhead* e poliAlanina completos não é possível predizer o fenótipo. Nos casos de expansão do trato poliAlanina, o fenótipo encontrado é a BPES tipo-II, ou seja, sem a FOP (DE BAERE, *et al.*, 2003). Todos os aspectos avaliados sobre a correlação genotípica-fenotípica do gene *FOXL2* chamam a atenção para uma característica importante deste gene: o pleiotropismo. Em sua revisão, De Baere *et al.*,

2003, demonstram claramente que diante de alguns tipos de mutação não é possível prever o fenótipo do indivíduo. Ainda no mesmo estudo os autores identificam variações fenotípicas intra e inter-familiares, em indivíduos com o mesmo genótipo, o que comprova o efeito pleiotrópico do gene em questão (De BAERE *et al.*, 2003)

Apesar do seu envolvimento na determinação dos fenótipos da BPES tipo-I ou tipo-II, a função específica do trato poliAlanina ainda não está bem estabelecida. Além do *FOXL2*, existem pelo menos mais oito genes nos quais a expansão do trato poliAla, acima de um limiar crítico, pode causar doenças em humanos. Mutações do *HOXD13*, na sinpolidactilia; do *RUNX2*, na displasia cleidocranial; do *ZIC2*, na holoprosencefalia; do *HOXA13*, na síndrome mão-pé-genital; do *ARX*, no retardo mental ligado ao X; do *SOX3*, no retardo mental ligado ao X com deficiência de hormônio do crescimento; do *PHOX2B*, na síndrome da hipoventilação central congênita; do *PABPN1*, na distrofia muscular oculofaríngea (CABURET *et al.*, 2004). Foi demonstrado, em alguns trabalhos, que a seqüência poliAlanina no gene *FOXL2*, bem como o número de 14 resíduos de alanina é bastante conservada entre várias espécies de mamíferos (COCQUET *et al.*, 2002; COCQUET *et al.*, 2003). Isto sugere a existência de uma forte limitação funcional e estrutural, ao ponto em que modificações nesta seqüência podem levar a efeitos deletérios (COCQUET *et al.*, 2002).

Recentemente, foram publicados alguns trabalhos que estudaram o trato poliAlanina no gene *FOXL2*. Caburet *et al.*, 2004, estudaram o efeito de mutações do tipo expansão do trato poliAlanina em células transfectadas e identificaram uma grande agregação das proteínas no núcleo e no citoplasma das

células, enquanto as proteínas do tipo selvagem se localizam preferencialmente no núcleo celular (CABURET *et al.*, 2004). Nestes casos, a proteína mutada promove um seqüestro e agregação da proteína tipo selvagem, enquanto parte da proteína mutada permanece ativa e parcialmente compensa a proteína normal seqüestrada. Dessa forma a atividade total do transcrito do *FOXL2* pode atingir um limiar que leva a alterações no desenvolvimento palpebral, mas não chega a determinar o fenótipo mais severo. Por isso os ovários não são afetados nos casos de mutação por expansão poliAla, levando à BPES tipo II.

Em 2005, Mounmé *et al.*, realizaram estudo com mutações que produzem proteínas truncadas com terminação prematura, semelhantes à encontrada no presente estudo. Foram utilizadas células COS-7 transfectadas com proteínas mutantes e os autores concluem que a produção de proteínas truncadas tem um efeito dominante negativo. O produto truncado pode antagonizar a atividade normal do *FOXL2*, primeiramente por se ligar ao DNA ou algum co-fator e impedir a ligação destes à proteína normal, e, segundo, a proteína truncada pode reter a proteína normal em agregados intranucleares impedindo sua atuação (MOUMNÉ *et al.*, 2005). A deleção parcial ou total do trato poliAla, pode levar a intensa atividade de agregação intranuclear, provavelmente por alterações estruturais ou físico-químicas da proteína produzidas pela mutação. Além disso, estas mutações podem ser deletérias no ambiente ovariano, levando também à conformação inadequada da proteína favorecendo a agregação intranuclear e secundariamente a disfunção ovariana (CABURET *et al.*, 2004; MOUMNÉ *et al.*, 2005).

Excluído:

7. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo são importantes na medida em que corroboram os principais achados descritos até o momento para a BPES. A identificação de uma mutação nova, ainda não descrita, esporádica, do tipo deleção de uma única base, no gene *FOXL2*, localizada entre os dois principais domínios, *forkhead* e polialanina, reforça a hipótese de que a integridade de ambos os domínios é essencial para o funcionamento normal da proteína FOXL2. Entretanto, mais estudos devem ser realizados com o intuito de se descobrir a função principal do domínio polialanina, bem como identificar os principais genes em que o *FOXL2* tem atuação como fator de transcrição. Desta forma, poderemos entender melhor a maneira pela qual este gene interfere sobre o desenvolvimento e a fisiologia ovariana.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR, R.; ORVIETO, R.; DICKER, D.; ZUKERMAN, Z.; BARNETT, M.; FISCH, B. Preliminary studies on apoptosis in human fetal ovaries. **Fertil Steril**. v. 78, p. 259–264, 2002.

Formatado: Inglês (EUA)

ACHREMANN, J. C.; MEEKS, J. J.; JAMESON, J. L. Phenotypic spectrum of mutations in DAX-1 and SF-1. **Mol Cell Endocrinol**. v. 185, p. 17-25, 2001.

Formatado: Inglês (EUA)

ADASHI, E. Y. The ovarian follicular apparatus. In: **Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology**. ADASHI, E. Y.; ROCK, J. A.; ROSENWAKS, Z. (eds.) 1st ed. New York: Lippincott-Raven., cap. 2, p. 17-40, 1995.

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

AHONEN, P.; MIETTINEN, A.; PERHEENTUPA, J. Adrenal and steroidal cell antibodies in patients with autoimmune polyglandular disease type I and risk of adrenocortical and ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 64, p. 494-500, 1987.

ALPER, M. M.; GARNER, P. R. Premature ovarian failure: its relationship to autoimmune disease. **Obstet Gynecol**. v. 66, p. 27-30, 1985.

AMATI, P.; CHOMEL, J. C.; NIVELON-CHEVALIER, A.; GILGENKRANTZ, S.; KITZIS, A.; KAPLAN, J.; BONNEAU, D. A gene for blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome maps to chromosome 3q23. **Hum Genet**. v. 96, p. 213-5, 1995.

AMATI, P.; GASPARINI, P.; ZLOTOGORA, J.; ZELANTE, L.; CHOMEL, J. C.; KITZIS, A.; KAPLAN, J.; BONNEAU, D. A gene for premature ovarian failure associated with eyelid malformation maps to chromosome 3q22–q23. **Am J Hum Genet**. v. 58, n. 5, p. 1089–92, 1996.

AMSTERDAM, A.; DANTES, A.; HOSOKAWA, K.; SCHERE-LEVY, C. P.; KOTSUJI, F.; AHARONI, D. Steroid regulation during apoptosis of ovarian follicular cells. **Steroids**. v. 63, p. 314–8, 1998.

AMSTERDAM, A.; KEREN-TAL, I.; AHARONI, D.; DANTES, A.; LANDBRACHA, A.; RIMON, E.; SASSON, R.; HIRSH, L. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. **Steroids**. v. 68, p. 861–7, 2003a.

AMSTERDAM, A.; SASSON, R.; KEREN-TAL, I.; AHARONI, D.; DANTES, A.; RIMON, E.; LAND, A.; COHEN, T.; DOR, Y.; HIRSH, L. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. **Biochem Pharmacol**. v. 66, p. 1355–62, 2003b.

ANASTI, J. M. Premature ovarian failure: an update. **Fertil Steril.** v. 70, p. 1-15, 1998.

Formatado: Espanhol
(Espanha-tradicional)

ATRIA, A. La menopausia precoz y tratamiento hormonal. **Rev Med Chil.** v. 78, p. 373-7, 1950.

Formatado: Inglês (EUA)

BAKALOV, V. K.; VANDERHOOF, V. H.; BONDY, C. A.; NELSON, L. M. Adrenal antibodies detect asymptomatic auto-immune adrenal insufficiency in young women with spontaneous premature ovarian failure. **Hum Reprod.** v. 17, p. 2096-100, 2002.

BAKALOV, V. K.; ANASTI, J. N.; CALIS, K. A.; VANDERHOOF, V. H.; PREMKUMAR, A.; CHEN, S.; FURMANIAK, J.; SMITH, BR.; MERINO, M. J.; NELSON, L. M. Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure. **Fertil Steril.** v. 84, n. 4, p. 958-65, 2005.

Formatado: Inglês (EUA)

BARBIERI, L. F. Female infertility. In: **Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management** / [Edited by] Jerome F. Strauss, Robert L. Barbieri. 5th ed., Elsevier Saunders, p. 633-68, 2004.

BARDONI, B.; ZANARIA, E.; GUIOLI, S.; FLORIDIA, G.; WORLEY, K. C.; TONINI, G.; FERRANTE, E.; CHIUMELLO, G.; MCCABE, E. R. B.; FRACCARO, M.; ZUFFARDI, O.; CAMERINO, G.; *et al.* A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. **Nat Genet.** v. 7, p. 497-501, 1994.

Formatado: Inglês (EUA)

BATISTA, F.; VAIMAN, D.; DAUSSET, J.; FELLOUS, M.; VEITIA, R. A. Potential targets of FOXL2, a transcription factor involved in craniofacial and follicular development, identified by transcriptomics. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 104, p. 3330-5, 2007.

Formatado: Inglês (EUA)

BEERENDONK, C. C.; BRAAT, D. D. Present and future options for the preservation of fertility in female adolescents with cancer. **Endocr Dev.** v. 8, p. 166-75, 2005.

Formatado: Inglês (EUA)

BEYSEN, D.; RAES, J.; LEROY, B. P.; LUCASSEN, A.; YATES, J. R.; CLAYTON-SMITH, J.; ILYINA, H.; BROOKS, S. S.; CHRISTIN-MAITRE, S.; FELLOUS, M.; FRYNS, J. P.; KIM, J. R.; LAPUNZINA, P.; LEMYRE, E.; MEIRE, F.; MESSIAEN, L. M.; OLEY, C.; SPLITT, M.; THOMSON, J.; VAN DE PEER, Y.; VEITIA, R. A.; DE PAEPE, A.; DE BAERE, E. Deletions involving long-range conserved nongenic sequences upstream and downstream of FOXL2 as a novel disease-causing mechanism in blepharophimosis syndrome. **Am J Hum Genet.** v. 77, p. 205-18, 2005.

BEYSEN, D.; DE BAERE, E. Blepharophimosis, Ptosis, and Epicanthus Inversus. In: <http://www.geneclinics.org/servlet/access?id=8888892&key...RTGRY&fcnyfw=io0z&filename=/profiles/bpes/details.html> (1 of 26). Acesso em 29/5/2006.

BERTA, P.; HAWKINS, J. R.; SINCLAIR, A. H.; TAYLOR, A.; GRIFFITHS, B. L.; GOODFELLOW, P. N.; FELLOWS, M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. **Nature**. v. 348, p. 448–50, 1990.

BETTERLE, C.; ROSSI, A.; DALLA PRIA, S.; ARTIFONI, A.; PEDINI, B.; GAVASSO, S.; CARETTO, A. Premature ovarian failure: autoimmunity and natural history. **Clin Endocrinol**. v. 39, p. 35–43, 1993.

BETTERLE, C.; DAL PRA, C.; MANTERO, F.; ZANCHETTA, R. Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction. **Endocr Rev**. v. 23, p. 327–64, 2002.

BETTERLE, C.; LAZZAROTTO, F.; PRESOTTO, F. Autoimmune polyglandular syndrome Type 2: the tip of an iceberg? **Clin Exp Immunol**. v. 137, p. 225–33, 2004.

BLASTN, versão 2.2.15, National Center for Biotechnology Information, 15/10/2007. On line software. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>> Acesso em: 20/10/2006.>

BOCCONE, L.; MELONI, A.; FALCHI, A. M.; USAI, V.; CAO, A. Blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus syndrome, a new case associated with de novo balanced autosomal translocation [46,XY,t(3;7)(q23;q32)]. **Am J Med Genet**. v. 51, p. 258-9, 1994.

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

BRITT, K. L.; FINDLAY, J. K. Regulation of the phenotype of ovarian somatic cells by estrogen. **Mol Cell Endocrinol**. v. 202, n. 1-2, p. 11-7, 2003.

BUSSO, N. E. **Indução da ovulação**. In: BUSSO, N. E.; ACOSTA, A. A.; REMOHI, J. Editora Atheneu, p. 107-10, 1999.

Formatado: Português (Brasil)

CABURET, S.; DEMAREZ, A.; MOUMNE, L.; FELLOUS, M.; DE BAERE, E.; VEITIA, R. A. A recurrent polyalanine expansion in the transcription factor FOXL2 induces extensive nuclear and cytoplasmic protein aggregation. **J Med Genet**. v.41, n. 12, p.932-6, 2004.

Formatado: Inglês (EUA)

CHA, S. C.; JANG, Y. S.; LEE, J. H.; KIM, H. K.; KIM, S. C.; KIM, S.; BAEK, S. H.; JUNG, W. S.; KIM, J. R. Mutational analysis of forkhead transcriptional factor 2 (FOXL2) in Korean patients with blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome. **Clin Genet**. v.64, n. 6, p.485-90, 2003.

Formatado: Inglês (EUA)

CLUSTAL W. European Bioinformatics Institute. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>> Acesso em: outubro, 2006.>

CONWAY, G. S.; KALTSAS, G.; PATEL, A.; DAVIES, M. C.; JACOBS, H. S. Characterization of idiopathic premature ovarian failure. **Fertil Steril.** v. 65, p. 337-41, 1996.

Formatado: Inglês (EUA)

COLLINS, J. A. Unexplained Infertility. In: KEYE, W. R.; CHANG, J. R.; REBAR, R. W.; SOULES, M. R. **Infertility: Evaluation and Treatment.** (Eds). Philadelphia: WB Saunders, p. 249-62, 1995.

Formatado: Inglês (EUA)

COCQUET, J.; DE BAERE, E.; GAREIL, M.; PANNETIER, M.; XIA, X.; FELLOUS, M.; VEITIA, R. A. Structure, evolution and expression of the FOXL2 transcription unit. **Cytogenet Genome Res.** v. 101, p. 206-11, 2003.

COCQUET, J.; PAILHOUX, E.; JAUBERT, F.; SERVEL, N.; XIA, X.; PANNETIER, M.; DE BAERE, E.; MESSIAEN, L.; COTINOT, C.; FELLOUS, M.; VEITIA, R. A. Evolution and expression of FOXL2. **J Med Genet.** v. 39, p. 916-21, 2002.

CODONCODE ALIGNER, CodonCode Corporation, version 1.6.3, 2002-2006. Disponível em: <<http://www.codoncode.com/aligner/>> Download em: 15/09/2006.>

Formatado: Inglês (EUA)

Código de campo alterado

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

COULAM, C. B.; KEMPERS, R. D.; RANDALL, R. V. Premature ovarian failure: evidence for the autoimmune mechanism. **Fertil Steril.** v. 36, p. 238-40, 1981.

COULAM, C. B. Premature gonadal failure. **Fertil Steril.** v. 38, p. 645-55, 1982.

COULAM, C. B.; ADAMSON, S. C.; ANNEGERS, J. F. Incidence of premature ovarian failure. **Obstet Gynecol.** v. 67, p. 604-6, 1986.

CRISPONI, L.; DEIANA, M.; LOI, A.; CHIAPPE, F.; UDA, M.; AMATI, P.; BISCEGLIA, L.; ZELANTE, L.; NAGARAJA, R.; PORCU, S.; RISTALDI, M. S.; MARZELLA, R.; ROCCHI, M.; NICOLINO, M.; LIENHARDT-ROUSSIE, A.; NIVELON, A.; VERLOES, A.; SCHLESSINGER, D.; GASPARINI, P.; BONNEAU, D.; CAO, A.; PILIA, G. The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/ epicanthus inversus syndrome. **Nat Genet.** v. 27, p. 159-66, 2001.

CROSIGNANI, P. G.; COLLINS, J.; COOKE, I. D.; DICZFALUSY, E.; RUBIN, B. Recommendations of the ESHRE workshop on 'Unexplained Infertility'. Anacapri, August 28-9, 1992. **Hum Reprod.** v. 8, n. 6, p. 977-80, 1993.

Formatado: Inglês (EUA)

DE BAERE, E.; BEYSEN, D.; OLEY, C.; LORENZ, B.; COCQUET, J.; DE SUTTER, P.; DEVRIENDT, K.; DIXON, M.; FELLOUS, M.; FRYNS, J.P.; GARZA, A.; JONSRUD, C.; KOIVISTO, P. A.; KRAUSE, A.; LEROY, B. P.; MEIRE, F.; PLOMP, A.; VAN MALDERGEM, L.; DE PAEPE, A.; VEITIA, R.; MESSIAEN, L. FOXL2 and BPES: mutational hotspots, phenotypic variability, and revision of the genotype–phenotype correlation. **Am J Hum Genet.** v. 72, p. 478–87, 2003.

DE BAERE, E.; DIXON, M. J.; SMALL, K. W.; JABS, E. W.; LEROY, B. P.; DEVRIENDT, K.; GILLEROT, Y.; MORTIER, G.; MEIRE, F.; VAN MALDERGEM, L.; COURTENS, W.; HJALGRIM, H.; HUANG, S.; LIEBAERS, I.; VAN REGEMORTER, N.; TOURAINE, P.; PRAPHANPHOJ, V.; VERLOES, A.; UDAR, N.; YELLORE, V.; CHALUKYA, M.; YELCHITS, S.; DE PAEPE, A.; KUTTENN, F.; FELLOUS, M.; VEITIA, R.; MESSIAEN, L. Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis- picanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype–phenotype correlation. **Hum Mol Genet.** v. 10, p. 1591-600, 2001.

DE BAERE, E.; FUKUSHIMA, Y.; SMALL, K.; UDAR, N.; VAN CAMP, G.; VERHOEVEN, K.; PALOTIE, A.; DE PAEPE, A.; MESSIAEN, L. Identification of BPESC1, a novel gene disrupted by a balanced chromosomal translocation, t(3;4) (q23;p15.2) in a patient with BPES. **Genomics.** v. 68, p. 296-304, 2000.

DE BAERE, E.; LEMERCIER, B.; CHRISTIN-MAITRE, S.; DURVAL, D.; MESSIAEN, L.; GODERIS, N.; FELLOUS, M.; VEITIA, R. FOXL2 mutation screening in a large panel of POF patients and XX males. **J med Genet.** v. 39, p. e43, 2002.

DE BAERE, E.; VAN ROY, N.; SPELEMAN, F.; FUKUSHIMA, Y.; DE PAEPE, A.; MESSIAEN, L. Closing in on the BPES gene on 3q23: mapping of a de novo reciprocal translocation t(3;4)(q23;p15.2) breakpoint within a 45-kb cosmid and mapping of three candidate genes, RBP1, RBP2, and β^2 -COP, distal to the breakpoint. **Genomics.** v. 57, p. 70–8, 1999.

Formatado: Inglês (EUA)

DE LANCEY, J. O. L. Anatomia cirurgica da pelve feminina. In: ROCK, A. J.; THOMPSON, D. J. (eds.) **Te Linde ginecologia operatória.** Philadelphia: Lippincott-Raven, cap. 6, p. 51-76, 1997..

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

DOMINICE, S.; CORREA, M. V.; COSTA, E. M. F.; NISHI, N. Y.; VILAIN, E.; ARNHOLD, I. J. P.; MENDONÇA, B. B. Mutations in the *SRY*, *DAX1*, *SFI*

and *WNT4* genes in Brazilian sex-reversed patients. **Braz J Med Biol Res.** v. 37, p. 145-50, 2004.

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

ENGELEN, J. J.; DE DIE-SMULDERS, C. E.; BACK, E. De novo mosaic 46,XX,del(3) (q21q25)/46,XX karyotype in a patient with BPES. **Genet Couns.** v. 13, p. 359-61, 2002.

FALORNI, A.; LAURETI, S.; CANDELORO, P.; PERRINO, S.; CORONELLA, C.; BIZZARRO, A.; BELLASTELLA, A.; SANTEUSANIO, F.; DE BELLIS, A. Steroid-cell autoantibodies are preferentially expressed in women with premature ovarian failure who have adrenal autoimmunity. **Fertil Steril.** v. 78, p. 270-9, 2002.

FÉNICHEL, P.; SOSSET, C.; BARBARINO-MONNIER, P.; GOBERT, B.; HIERONIMUS, S.; BENE, M. C.; HARTE, M. Prevalence, specificity and significance of ovarian antibodies during spontaneous premature ovarian failure. **Hum Reprod.** v. 12, p. 2623-8, 1997.

FLEMING, A.; VILAIN, E. The endless quest for sex determination genes. **Clin Genet.** v. 67, p. 15-25, 2004.

FOKKEMA, I. F. A. C.; DEN DUNNEN, J. T.; TASCHNER, P. E. M. LOVD: easy creation of a locus-specific sequence variation database using an "LSDB-in-a-box" approach. **Hum Mutat.** V. 26, n. 2, p. 63-8, 2005.

FOXL2 Mutation database. LOVD system. Leiden University Medical Center. versão 1.1.0., 2005. Disponível em: <<http://medgen.ugent.be/foxl2>> Acesso em 16/02/07.

FORGES, T.; MONNIER-BARBARINO, P.; FAURE, G. C.; BENE, M. C. Autoimmunity and antigenic targets in ovarian pathology. **Hum Reprod Update.** v. 10, p. 163-75, 2004.

Formatado: Inglês (EUA)

FUKUSHIMA, Y.; WAKUI, K.; NISHIDA, T.; UEOKA, Y. Blepharophimosis sequence and de novo balanced autosomal translocation [46,XY,t(3;4)(q23;p15.2)]: possible assignment of the trait to 3q23. **Am J Med Genet.** v. 40, p. 485-7, 1991.

GOBERT, B.; BARBARINO-MONNIER, P.; GUILLET-ROSSO, F.; BENE, M. C.; FAURE, G. C. Ovary antibodies after IVF. **Lancet.** v. 335, p. 723, 1990.

Código de campo alterado

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Código de campo alterado

Código de campo alterado

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

GOBERT, B.; BARBARINO-MONNIER, P.; GUILLET-MAY, F.; BENE, M. C.; FAURE, G. C. Antiovary antibodies after attempts at human *in vitro* fertilization induced by follicular puncture rather than hormonal stimulation. **J. Reprod. Fert.** v. 96, p. 213-8, 1992.

GOLDENBERG, R. L.; GRODIN, R. L.; RODBARD, D.; ROSS, G. T. Gonadotropins in women with amenorrhea. **Am J Obstet Gynecol.** v. 116, p. 1003–9, 1973.

GOSWAMI, D.; CONWAY, G. S. Premature ovarian failure. **Hum Reprod Update.** v. 11, p. 391-410, 2005.

Formatado: Inglês (EUA)

GURATES, B.; AMSTERDAM, A.; TAMURA, M.; YANG, S.; ZHOU, J.; FANG, Z.; AMIN, S.; SEBASTIAN, S.; BULUN, S. E. WT1 and DAX-1 regulate SF-1 mediated human P450arom gene expression in gonadal cells. **Mol Cell Endocrinol.** v. 208, p. 61-75, 2003.

Formatado: Inglês (EUA)

HAQQ, C. M.; KING, C-Y.; DONAHOE, P. K.; WEISS, M. A. SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 90, p. 1097, 1993.

HARLEY, V. R.; JACKSON, D. I.; HEXTALL, P. J.; HAWKINS, J. R.; BERKOVITZ, G. D.; SOCKANATHAN, S.; LOVELL-BADGE, R.; GOODFELLOW, P. N. DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. **Science.** v. 255, p. 453–6, 1992.

Formatado: Cor da fonte: Automática, Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

HARLEY, V. R.; CLARKSON, M. J.; ARGENTARO, A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors SRY (Sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 {SRY-related high-mobility group (HMG) Box 9}. **Endocr Rev.** v. 24, p. 466, 2003.

HISTOLOGY Home page. Department of anatomy. University of Wisconsin. Disponível em: <<http://www.histology.wisc.edu/histo/res/desc/female/femD1-12.htm>> Acesso em: 08/12/2006.>

HOEK, A.; SCHOEMAKER, J.; DREXHAGE, H. A. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. **Endocr Rev.** v. 18, p. 107–34, 1997.

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

HOWELL, S.; SHALET, S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. **Endocrinol Metab Clin North Am.** v. 27, p. 927–43, 1998.

HUGHES, F. M. JR.; GOROSPE, W. C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. **Endocrinology.** v. 129, p. 2415–22, 1991.

HUMAN Mutation Database. Disponível em: <http://medgen.ugent.be/LOVD/index.php?select_db=FOXL2> Acesso em: 19/02/2007.>

HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Hum Reprod update.** v. 11, p. 162-78, 2005.

IRVINE, W. J.; CHAN, M. M. W.; SCARTH, L.; KOLB, F. O.; HARTOG, M.; BAYLISS, R. I. S.; DRURY, M. I. Immunological aspects of premature ovarian failure associated with idiopathic Addison's disease. **Lancet**. v. 2, p. 883-7, 1968.

JAFFE, R. B. Período da menopausa e perimenopausa. In: YEN, S. S. C.; JAFFE, R. B. editors. **Endocrinologia Reprodutiva, fisiologia, fisiopatologia e tratamento clínico**. 2nd. Ed. São Paulo: Roca, p. 389-406, 1990.

Formatado: Português (Brasil)

JAGER, R. J.; ANVRET, M.; HALL, K.; SCHERER, G. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. **Nature**. v. 348, n. 6300, p. 452-4, 1990.

Formatado: Inglês (EUA)

JEWETT, T.; RAO, P. N.; WEAVER, R. G.; STEWART, W.; THOMAS, I. T.; PETTENATI, M. J. Blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome (BPES) associated with interstitial deletion of band 3q22: review and gene assignment to the interface of band 3q22.3 and 3q23. **Am J Med Genet**. v. 47, p. 1147-50, 1993.

JONES, G. S.; DE MORAES-RUEHSEN, M. A new syndrome of amenorrhea in association with hypergonadotropism and apparently normal ovarian follicular apparatus. **Am J Obstet Gynecol**. v. 104, p. 597-600, 1969.

JORDAN, B. K.; MOHAMMED, M.; CHING, S. T.; DELOT, E.; CHEN, X. N.; DEWING, P.; SWAIN, A.; RAO, N.; ELEJALDE, B. R.; VILAIN, E. Up regulation of WNT4 signaling and dosage sensitive sex reversal in humans. **Am J Hum Genet**. v. 68, p. 1102-09, 2001.

KALANTARIDOU, S. N.; BRADDOCK, D. T.; PATRONAS, N. J.; NELSON, L. M. Treatment of autoimmune premature ovarian failure. **Hum Reprod**. v. 14, p. 1777-82, 1999.

KOOPMAN, P.; MUNSTERBERG, A.; CAPEL, B.; VIVIAN, N.; LOVELL-BADGE, R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. **Nature**. v. 348, p. 450-2, 1990.

LAML, T.; PREYER, O.; UMEK, W.; HENGSTSCHLAGER, M.; HANZAL, H. Genetic disorders in premature ovarian failure. **Hum Reprod Update**. v. 8, n. 5, p. 483-91, 2002.

LAML, T.; SCHULZ-LOBMEYR, I.; OBRUCA, A.; HUBER, J. C.; HARTMANN, B. W. Premature ovarian failure: etiology and prospects. **Gynecol Endocrinol**. v. 14, p. 292-302, 2000.

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

LAWSON, C. T.; TOOMES, C.; FRYER, A.; CARETTE, M. J.; TAYLOR, G. M.; FUKUSHIMA, Y.; DIXON, M. J. Definition of the blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus syndrome critical region at chromosome 3q23 based on the analysis of Blepharophimosis, Ptosis, and Epicanthus Inversus chromosomal anomalies. **Hum Mol Genet.** v. 4, p. 963-7, 1995.

Formatado: Inglês (EUA)

LEUNG, P. C. K.; ADASHI, E. Y. **The Ovary.** 2^a ed. Utah: Academic press inc., 2003.

LOFFLER, K. A.; ZARKOWER, D.; KOOPMAN, P. Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. **Endocrinology.** v. 144, p. 3237-43, 2003.

LUBORSKY, J. Ovarian autoimmune disease and ovarian autoantibodies. **J Women's Health Gend Based Med.** v. 11, p. 585-99, 2002.

LUBORSKY, J.; LLANES, B.; DAVIES, S.; BINOR, Z.; RADWANSKA, E.; PONG, R. Ovarian autoimmunity: greater frequency of autoantibodies in premature menopause and unexplained infertility than in the general population. **Clin Immunol.** v. 90, p. 368-74, 1999.

LUBORSKY, J. L.; VISINTIN, I.; BOYERS, S.; ASARI, T.; CALDWELL, B.; DECHERNEY, A. Ovarian antibodies detected by immobilized antigen immunoassay in patients with premature ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 70, p. 69-75, 1990.

MAW, M.; KAR, B.; BISWAS, J.; BISWAS, P.; NANCARROW, D.; BRIDGES, R.; KUMARAMANICKAVEL, G.; DENTON, M.; BADRINATH, S. S. Linkage of blepharophimosis syndrome in a large Indian pedigree to chromosome 7p. **Hum Mol Genet.** v. 5, p.371-86, 1996.

MEEKS, J. J.; WEISS, J.; JAMESON, J. L. Dax 1 is required for testis determination. **Nat Genet** v. 34, n. 1, p. 32-3, 2003.

Formatado: Inglês (EUA)

MEHTA, A. E.; MATWIJIW, I.; LYONS, E. A.; FAIMAN, C. Noninvasive diagnosis of resistant ovary syndrome by ultrasonography. **Fertil Steril.** v. 57, p. 56-61, 1992.

MELO, M. A. B.; LAGE, E. M.; SOUZA, E. B.; BARCELOS, T. B.; MARINHO, R. M. Falência ovariana prematura e gravidez. **Reprod Clim.** v. 14, p. 204-6, 1999.

Formatado: Inglês (EUA)

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.** v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MONNIAUX, D. Oocyte apoptosis and evolution of ovarian reserve. **Gynecol Obstet Fertil.** v. 30, p. 822–6, 2002.

Formatado: Inglês (EUA)

MOORE, C. C. D.; GRUMBACH, M. M. Sex determination and gonadogenesis: a transcription cascade of sex chromosome and autosome genes. **Seminars Perinatol.** v. 16, n. 5, p. 266-78, 1992.

MORRISON, J. C.; GIVENS, J. R.; WISER, W. L.; FISH, S. A. Mumps oophoritis: a cause of premature menopause. **Fertil Steril.** v. 26, p. 655–9, 1975.

MOTTA, P. M.; MAKABE, S. Germ cells in the ovarian surface during fetal development in humans. A three-dimensional microanatomical study by scanning and transmission electron microscopy. **J Submicrosc Cytol.** v. 18, p. 271–90, 1986a.

Formatado: Inglês (EUA)

MOTTA, P. M.; MAKABE, S. Elimination of germ cells during differentiation of the human ovary: an electron microscopic study. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** v. 22, p. 271–86, 1986b.

MOTTA, P. M.; MAKABE, S.; NOTTOLA, A. S. The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. **Hum Reprod Update.** v. 3, n. 3, p. 281-95, 1997.

MOUMNÉ, L.; FELLOUS, M.; VEITIA, R. A. Deletions in the poly alanine-containing transcription factor FOXL2 lead to intranuclear aggregation. **Hum Mol Genet.** v. 14, n. 23, p. 3557-64, 2005.

MULLER, J.; SCHWARTZ, M.; SKAKKEBAEK, N. E. Analysis of the sex-determining region of the Y Chromosome (SRY) in sex reversed patients: point-mutation in SRY causing sex-reversion in a 46,XY female. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 75, n. 1, p. 331-3, 1992.

NALLATHAMBI, J.; MOUMNÉ, L.; De BAERE, E.; BEYSEN, D.; USHA, K.; SUNDARESAN, P.; VEITIA, R. A. A novel polyalanine expansion in FOXL2: the first evidence for a recessive form of the blepharophimosis syndrome (BPES) associated with ovarian dysfunction. **Hum Genet.** v. 121, p. 107-12, 2007.

NASRIN, N.; BUGGS, C.; KONG, X.F.; CARNAZZA, J.; GOEBL, M.; ALEXANDER-BRIDGES, M. DNA-binding properties of the product of the testis-determining gene and a related protein. **Nature.** v. 354, p. 317–20, 1991.

NELSON, L. M.; ANASTI, J. N.; FLACK, M. R. Premature ovarian failure. In: ADASHI, E. Y.; ROCK, J. A.; ROSENWAKS, Z. editors. **Reproductive endocrinology, surgery, and technology**. 1st ed. New York: Lippincott-Raven, p. 1393–410, 1995.

Formatado: Fonte: Negrito, Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

NELSON, L. M.; ANASTI, J. N.; KIMZEY, L. M.; DEFENSOR, R. A.; LIPETZ, K. J.; WHITE, B. J.; SHAWKER, T. H.; MERINO, M. J. Development of luteinized graafian follicles in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 79, n. 5, p. 1470–5, 1994.

NELSON, L. M.; BAKALOV, V. K. Mechanisms of follicular dysfunction in 46,XX spontaneous premature ovarian failure. **Endocrinol Metab Clin N Am**. v. 32, p. 613-37, 2003.

Formatado: Inglês (EUA)

NELSON, L. M.; COVINGTON, S. N.; W-C, L. C. S.; REBAR, R. W. An update: spontaneous premature ovarian failure is not an early menopause. **Fertil Steril**. v. 83, p. 1327-32, 2005.

Formatado: Inglês (EUA)

HGVS. Nomenclature for the description of sequence variations. Human Genome Variation Society. 2006. Disponível em: <<http://www.hgvs.org/mutnomen/>> Acesso em 25/01/2007.

Formatado: Inglês (EUA)

OLEY, C.; BARATSIER, M. Blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus syndrome (BPES syndrome). **J. Med. Genet**. v. 25, p. 47-51, 1988.

Formatado: Inglês (EUA)

PANNETIER, M.; FABRE, S.; BATISTA, F.; KOCER, A.; RENAULT, L.; JOLIVET, G.; MANDON-PEPIN, B.; COTINOT, C.; VEITIA, R.; PAILHOUX, E. FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. **J Mol Endocrinol**. 36:399-413, 2006.

PARKER, K. L.; RICE, D. A.; LALA, D. S.; IKEDA, Y.; LUO, X.; WONG, M.; BAKKE, M.; ZHAO, L.; FRIGERI, C.; HANLEY, N. A.; SATLLINGS, N.; SCHIMMER, B. P. Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. **Recent Prog Horm Res**. v. 57, p. 19–36, 2002.

Formatado: Inglês (EUA)

PELLETIER, J.; BRUENING, W.; LI, F. P.; GLASER, T.; HARBER, D. A.; HOUSMAN, D. WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilm's tumor. **Nature**. v. 353, p. 431-4, 1991.

PERHEENTUPA, J. APS-I/APECED: the clinical disease and therapy. **Endocrinol Metab Clin N Am**. v. 31, p. 295-320, 2002.

PISARSKA, M. D.; BAE, J.; KLEIN, C.; HSUEH, A. J. Forkhead L2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. **Endocrinology** v. 145, n.7, p. 3424-33, 2004.

Formatado: Inglês (EUA)

POLLACK, S. E.; FURTH, E. E.; KALLEN, C. B.; ARAKANE, F.; KIRIAKIDOU, M.; KOZARSKY, K. F.; STRAUSS, 3RD. J. F. Localization of the steroidogenic acute regulatory protein in human tissues. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 82, p. 4243-51, 1997.

PONTE, J. G. Anatomia clínico-cirúrgica em ginecologia: órgãos genitais femininos. In: HALBE, H. W. (ed.) **Tratado de ginecologia.** 2ª ed. São Paulo: Roca, cap. 34, p. 280-91, 1993.

Formatado: Inglês (EUA)

PRAPHANPHOJ, V.; GOODMAN, B. K.; THOMAS, G. H.; NIEL, K. M.; TOOMES, C.; DIXON, M. J.; GERAGHTY, M. T. Molecular cytogenetic evaluation in a patient with a translocation (3;21) associated with blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus syndrome (BPES). **Genomics.** v. 65, p. 67-9, 2000.

Formatado: Inglês (EUA)

PRUEITT, R. L.; ZINN, A. R. A fork in the road to fertility. **Nat Genet** v. 27, p. 132-34, 2001.

Formatado: Inglês (EUA)

RABINOWE, S. L.; BERGER, M. J.; WELCH, W. R.; DLUHY, R. G. Lymphocyte dysfunction in autoimmune oophoritis. Resumption of menses with corticosteroids. **Am J Med.** v. 81, n. 2, p. 347-50, 1986.

REBAR, R. W.; CEDARS, M. I. Hypergonadotropic forms of amenorrhea in young women. **Endocrinol Metab Clin North Am.** v. 21, p. 173-91, 1992.

Formatado: Inglês (EUA)

REBAR, R. W.; CONNOLLY, H. V. Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea. **Fertil Steril.** v. 53, n. 5, p. 804-10, 1990.

REBAR, R. W.; ERICKSON, G. F.; YEN, S. S. C. Idiopathic premature ovarian failure: clinical and endocrine characteristics. **Fertil Steril.** v. 37, p. 35-41, 1982.

SCHATZ, D. A.; WINTER, W. E. Autoimmune polyglandular syndrome II: clinical syndrome and treatment. **Endocrinol Metab Clin N Am.** v. 31, p. 339-52, 2002.

SCHMAHL, C.; CAPEL, B. Cell proliferation is necessary for the determination of male fate in the gonad. **Dev Biol** v. 258, n. 2, p. 264- 76, 2003.

SCHREIBER, J. R.; DAVAJAN, V.; KLETZKY, O. A. A case of intermittent ovarian failure. **Am J Obstet Gynecol.** v. 132, p. 698-9, 1978.

SEQSCAPE. SeqScape software Version 2.5. Applied Biosystems, 2004.

SINCLAIR, A. H.; BERTA, P.; PALMER, M. S.; HAWKINS, J. R.; GRIFFITHS, B. L.; SMITH, M. J.; FOSTER, J. W.; FIRSCHAUF, A. M.; LOVELL-BADGE, R.; GOODFELLOW, P. N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature**. v. 346, p. 240–4, 1990.

Formatado: Inglês (EUA)

SMALL, K. W.; STALVEY, M.; FISHER, L.; MULLEN, L.; DICKEL, C.; BEADLES, K.; REIMER, R.; LESSNER, A.; LEWIS, K.; PERICAK-VANCE, M. A. Blepharophimosis syndrome is linked to chromosome 3q. **Hum. Mol. Genet.** v. 4, n. 5, p. 443–8, 1995.

SOTSIOU, F.; BOTTAZZO, G. F.; DONIACH, D. Immunofluorescence studies on autoantibodies to steroid-producing cells, and to germline cells in endocrine disease and infertility. **Clin Exp Immunol.** v. 39, p. 97–111, 1980.

SPEROFF L., FRITZ M. A. The ovary – embryology and development. In: **Clinical gynecologic endocrinology and infertility**. 7^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, cap. 3, p. 97-111, 2005.

SPEROFF L., FRITZ M. A. Amenorrhea. In: **Clinical gynecologic endocrinology and infertility**. 7^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, cap. 11, p. 401-464, 2005.

TANG, S.; WANG, X.; LIN, L.; SUN, Y.; WANG, Y.; YU, H. Mutation analysis of the FOXL2 gene in Chinese patients with blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome. **Mutagenesis**. v. 21, n. 1, p.35-9, 2006.

Formatado: Inglês (EUA)

TAYLOR, A. E. Systemic adversities of ovarian failure. **J Soc Gynecol Investig.** v. 8, S7–S9, 2001.

THE ESHRE CAPRI GROUP. Social determinants of human reproduction. **Hum Reprod.** v. 16, n. 7, p. 1518-26, 2001.

Formatado: Inglês (EUA)

THIBAUD, E.; RAMIREZ, M.; BRAUNER, R.; FLAMANT, F.; ZUCKER, J. M.; FEKETE, C.; RAPPAPORT, R. Preservation of ovarian function by ovarian transposition performed before pelvic irradiation during childhood. **J Pediatr.** v. 121, n. 6, p. 880–4, 1992.

Formatado: Fonte: Não Negrito, Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

THOMPSON, W. E.; POWELL, J.; THOMAS, K. H.; WHITTAKER, J. A. Immunolocalization and expression of the steroidogenic acute regulatory protein during the transitional stages of rat follicular differentiation. **J Histochem Cytochem.** v. 47, p. 769–76, 1999.

THONNEAU, P.; MARCHAND, S.; TALLEC, A.; FERIAL, M. L.; LANSAC, J.; LOPES, P.; TABASTE, J. M.; SPIRA, A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1.850.000) of three French regions(1988-1989). **Hum Reprod.** v. 6, p. 811–6, 1991.

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

TILLY, J. L.; KOWALSKI, K. I.; JOHNSON, A. L.; HSUEH, A. J. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. **Endocrinology.** v. 129, p. 2799–801, 1991.

TILMANN, C.; CAPEL, B. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. **Rec Prog Horm Res.** v. 57, p. 1-18, 2002.

TOOMES, C.; DIXON, M. J. Refinement of a translocation breakpoint associated with blepharophimosis – ptosis – epicanthus inversus syndrome to a 280-kb interval at chromosome 3q23. **Genomics** v. 53, p. 308–14, 1998.

TORGERSON, D. J.; THOMAS, R. E.; REID, D. M. Mothers and daughters menopausal ages: is there a link? **Eur. J. Obst. Gyn. Reprod. Biol.** v. 74, p. 63–6, 1997.

TURKINGTON, R. W.; LEOVITZ, H. E. Extra-adrenal endocrine deficiencies in Addison's disease. **Am J Med.** v. 43, p. 499–507, 1967.

UDAR, N.; YELLORE, V.; CHALUKYA, M.; YELCHITS, S.; SILVA-GARCIA, R.; SMALL, K. Comparative analysis of the FOXL2 gene and characterization of mutations in BPES patients. **Hum Mutat.** v. 22, p. 222-8, 2003.

VAINIO, S.; HEIKKILA, M.; KISPERT, A.; CHIN, N.; MCMAHON, A. P. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. **Nature.** v. 397, p. 405-9, 1999.

VAN KASTEREN, Y. M.; SCHOEMAKER, J. Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. **Hum Reprod Update.** v. 5, p. 483–92, 1999.

Formatado: Português (Brasil)

VEGETTI, W.; MAROZZI, A.; MANFREDINI, E.; TESTA, G.; ALAGNA, F.; NICOLOSI, A.; CALIARI, I.; TABORELLI, M.; TIBILETTI, M. G.; DALPRA, L.; CROSIGNANI, P. G. Premature ovarian failure. **Mol Cell Endocrinol.** v. 161, p. 53–7, 2000.

Formatado: Inglês (EUA)

VEGETTI, W.; TIBILETTI, M. G.; TESTA, G.; DELAURETIS, Y.; ALAGNA, F.; CASTOLDI, E.; TABORELLI, M.; MOTTA, T.; BOLIS, P. F.; DALPRA, L.; CROSIGNANI, P. G. Inheritance in idiopathic premature ovarian failure: analysis of 71 cases. **Hum. Reprod.** v. 13, p. 1796-1800, 1998.

VITAL-REYES, V.; TELLEZ-VELASCO, S.; CHHIENG, D.; GRIZZLE, W.; REYES-FUENTES, A. Spontaneous pregnancy in a woman with premature ovarian failure: a case report. **J Reprod Med.** v. 49, p. 989-91, 2004.

WANG, S.; KOBAYASHI, T.; ZHOU, L.; PAUL-PRASANTH, B.; IJIRI, S.; SAKAI, F.; OKUBO, K.; MOROHASHI, K-I.; NAGAHAMA, Y. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with Ad4BP/SF-1. **Mol Endocrinol.** v. 21, n. 3, p. 712-25, 2007.

WHEATCROFT, N. J.; SALT, C.; MILFORD-WARD, A.; COOKE, I. D.; WEETMAN, A. P. Identification of ovarian antibodies by immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay or immunoblotting in premature ovarian failure. **Hum Reprod.** v. 12, p. 2617-22, 1997.

Formatado: Inglês (EUA)

WHEATCROFT, N. J., TOOGOOD, A. A., LI, T. C. COOKE, I. D.; WEETMAN, A. P. Detection of antibodies to ovarian antigens in women with premature failure. **Clin. Exp. Immunol.** v. 96, n. 1, p. 122-8, 1994.

WORLD Health Organization(WHO) Scientific Group Report. Consultation on the Diagnosis and Treatment of Endocrine forms of female infertility. **Technical Report Series.** n. 514, 1976.

WORLD Health Organization (WHO). Recent advances in Medically Assisted Conception. **Technical Report Series.** n. 820, p. 1-111, 1992.

YU, R. N.; ITO, M.; SAUNDERS, T. L.; CAMPER, S. A.; JAMESON, J. L. Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. **Nat Genet** v. 20, p. 353-7, 1998.

Formatado: Inglês (EUA)

ZLOTOGORA, J.; SAGI, M.; COHEN, T. The Blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome: delineation of two types. **Am. J. Hum. Genet.** v. 35, p. 1020-7, 1983.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) Senhor(a) está sendo convidado para participar de um estudo de forma voluntária com o objetivo de confirmar o diagnóstico de uma síndrome genética presente em um dos indivíduos de sua família. **A Síndrome genética é um conjunto de sinais ou alterações no organismo de uma pessoa provocadas por alguma alteração nos genes ou cromossomos, que são estruturas responsáveis pela produção de inúmeras substâncias importantes na formação e nas funções do corpo humano.** Caso aceite participar deste estudo e, após ter sido esclarecido sobre as informações contidas neste documento, assine as duas vias do mesmo. Caso não queira participar, nenhum tipo de penalização lhe será imposta e o tratamento / acompanhamento seu ou do seu familiar, seguirá normalmente.

O estudo será realizado por mim, Prof. Frederico José Silva Corrêa e pelo Prof. Adriano Bueno Tavares no laboratório de Genômica da Universidade Católica de Brasília. **O título do estudo é “Diagnóstico de Mutação no Gene da FOXL2 em Mulher com Síndrome da Blefarofimose e Falência Ovariana Prematura.”**

Os participantes deverão se submeter a coleta uma pequena quantidade de sangue (10 ml), da mesma forma como se colhe sangue para exames laboratoriais (exames de sangue). A amostra colhida será utilizada para a pesquisa da presença ou não de alterações genéticas nos indivíduos estudados. Os riscos, desconforto, ou prejuízos são aqueles inerentes à coleta de sangue para exames de sangue comuns, não havendo maiores riscos para o participante. Os pesquisadores se comprometem, juntamente com as instituições participantes (Hospital Regional de Taguatinga – SES e Universidade Católica de Brasília) a tratamento e acompanhamento de qualquer problema causado pela coleta de sangue.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar o sangue colhido única e exclusivamente para a realização desta pesquisa e após o término da mesma o material (sangue) será descartado.

Fica garantido ao paciente, o sigilo (segredo) absoluto de todas as informações prestadas ao presente estudo. Além disto, ficam garantidos esclarecimentos a qualquer momento, para os participantes, pelo pesquisador responsável, bem como a retirada deste termo de consentimento e conseqüente desligamento (desistência) da pesquisa a qualquer momento, sem que haja nenhum tipo de restrição ou constrangimento.

Os resultados serão informados aos participantes pelo médico pesquisador responsável.

Após esclarecimento de todos os pontos deste termo, aceito participar deste projeto de pesquisa.

Qualquer dúvida contactar o responsável pela pesquisa, Dr. Frederico José Silva Corrêa (61) 3352-7717, (61) 9967 2141 ou Prof. Doutor Adriano Bueno Tavares (61) 9984 3040, (61) 3356 9416.

Em caso de dúvidas ou questionamentos sobre a pesquisa pode-se contactar o Comitê de Ética em Pesquisa que aprovou a realização da mesma. Fone CEP/SES/DF – 3325 4955 ou e-mail cepsesdf@saude.df.gov.br

NOME:

ASSINATURA:

LOCAL E DATA:

OBSERVAÇÕES:

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)