



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

GABRIELA CORASSA RODRIGUES DA CUNHA

**AVALIAÇÃO GENÉTICA EM MULHERES DIAGNOSTICADAS CLINICAMENTE
COM SÍNDROME DE MAYER-ROKITANSKY-KÜSTER-HAUSER**

Orientadora: Professora Doutora Aline Pic-Taylor

BRASÍLIA

2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

GABRIELA CORASSA RODRIGUES DA CUNHA

**AVALIAÇÃO GENÉTICA EM MULHERES DIAGNOSTICADAS CLINICAMENTE
COM SÍNDROME DE MAYER-ROKITANSKY-KÜSTER-HAUSER**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em Biologia Animal, pelo
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, da
Universidade de Brasília (UnB).

Orientadora: Dra. Aline Pic-Taylor

BRASÍLIA

2018

Dedico este trabalho aos meus pais, Lucas Rodrigues e Fernanda Corassa, por toda a importância que têm em minha vida, por todo apoio e pelas palavras de carinho e conforto. Sem vocês esse trabalho não teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pelas maravilhas que faz em minha vida.

Agradeço também à minha orientadora, Dr^a Aline Pic Taylor, por ter me aceitado como orientanda e por ter confiado em mim durante todo o percurso desse mestrado. À Dr^a Juliana Mazzeu pela disponibilidade e pelos ensinamentos em genética clínica e molecular.

Agradeço à equipe de médicos do Ambulatório de Genética Médica, por todo o suporte oferecido para a realização desse trabalho. Ao Dr Marcus Von Zuben pela avaliação das pacientes no âmbito da ginecologia e pela paciência em sanar minhas dúvidas. À equipe de endocrinologia, em especial à Dr^a Adriana Lofrano, por ser sempre tão generosa e prestativa para discussão dos casos avaliados. À equipe de radiologia, em especial Dr^a Mayra, por todo o cuidado na avaliação radiológica das pacientes.

À minha família, em especial aos meus pais, Lucas e Fernanda, por possuírem tanto significado para mim. Por não pouparem esforços para criação e educação de suas filhas. Por serem exemplos de comprometimento, força e dedicação. Por me ensinarem que família está sempre em primeiro lugar. Eu amo vocês.

Ao meu querido namorado, Fernando Fellows, por todo o apoio e suporte emocional durante a elaboração deste trabalho. Obrigada por ser meu parceiro de vida e por ter tamanha cumplicidade. Você sempre será meu porto seguro. Eu amo você.

À minha amiga, Vanessa Sodré, com quem tenho a oportunidade de conviver e aprender durante tantos anos. Obrigada por ser meu braço direito no percurso acadêmico. Que possamos continuar lado a lado nessa busca de conhecimentos, no nosso amor pela Genética e pela Ciência.

A Universidade de Brasília pelo apoio científico e a CAPES pelo fomento dos estudos.

RESUMO

A Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) é caracterizada por ausência do útero e vagina. Essa patologia é considerada a segunda causa mais frequente de amenorreia primária, ficando atrás somente da disgenesia gonadal. A etiologia genética da MRKH ainda não é conhecida e a identificação de alterações genéticas que estejam associadas a esse quadro clínico poderá contribuir para sua elucidação e ajudar na compreensão do desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi investigar a etiologia genética da MRKH. Participaram do estudo 14 mulheres diagnosticadas clinicamente com a síndrome. Inicialmente houve reclassificação das pacientes: quatro mulheres (28,5%) não se enquadravam nos critérios de MRKH. Dez pacientes receberam o diagnóstico de MRKH (71,5%), duas foram classificadas com MRKH I, sete com MRKH II e uma se enquadrava na associação de MURCS. Foi possível identificar através da Análise Cromossômica por *Microarray* (CMA), alterações submicroscópicas em duas pacientes (14,28%), uma com duplicação 7q11.23 e outra com deleção 6q14.3. O fato de 28,5% das mulheres terem sido diagnosticadas erroneamente como MRKH, ressalta a importância de investigações detalhadas nas pacientes com ausência de útero e vagina, já que um diagnóstico correto é essencial para o aconselhamento genético e tratamento.

Palavras-chave: Síndrome de Rokitansky. Malformação mülleriana. MRKH. CMA.

ABSTRACT

Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome (MRKH) is characterized by a congenital absence of the uterus and vagina. This pathology is considered the second most frequent cause of primary amenorrhea after gonadal dysgenesis. The genetic etiology of MRKH remains unknown. Therefore, the identification of genetic alterations associated with this clinical condition may contribute to its elucidation and help to understand the development of the female reproductive tract. This study aims to investigate the genetic etiology of MRKH. We selected 14 patients clinically diagnosed with this syndrome. We initially reclassified the patients since four (28.5%) of them did not fit the MRKH criteria. Ten patients did meet the MRKH criteria (71.5%), two were classified as MRKH I, seven were classified as MRKH II and one patient was classified as MURCS association. Chromosomal Microarray Analysis (CMA) identified abnormalities in two patients (14.28%), one with a duplication 7q11.23 and the other with a deletion 6q14.3. Identification of 28.5% of the women misdiagnosed as MRKH, highlights the importance of a more detailed investigation of patients with uterus and vagina agenesis since a correct diagnosis is essential for genetic counselling and treatment outcome.

Keywords: Rokitansky Syndrome. Müllerian malformation. MRKH. CMA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corte transversal de um embrião.	16
Figura 2. Migração das células germinativas primordiais.	17
Figura 3. Gônada bipotencial.	17
Figura 4. Cascata simplificada de ativação de genes que participam do desenvolvimento masculino e feminino.	20
Figura 5. Esquema representativo da atuação dos genes <i>HOXA</i> na padronização do desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino.	27
Figura 6. Dilatadores de diversos tamanhos utilizados no tratamento não cirúrgico de MRKH.	29
Figura 7. Fluxograma do estudo.	33
Figura 8. Protocolo da plataforma <i>Affymetrix</i> para Análise Cromossômica por <i>Microarray</i> .	36
Figura 9. Representação gráfica das proporções de diferentes diagnósticos detectados no estudo.	37
Figura 10. Gráficos apresentando as frequências das diferentes alterações clínicas observadas nas pacientes com diagnóstico de MRKH.	41
Figura 11. PCR para detecção do gene <i>SRY</i> .	43
Figura 12. Deleção 6q14.3 $\text{arr[hg19]6q14.3(86,635,033-87,762,722)x1}$, representada pelo retângulo vermelho, identificada na paciente P6.	47
Figura 13: Duplicação 7q11.23 $\text{arr[hg19]7q11.23(72,732,834-74,136,633)x3}$, representada pelo retângulo azul, identificada na paciente P8.	49
Figura 14: Imagem de RM da paciente P11, no plano axial, ponderada em T2.	52
Figura 15: Imagem de RM da paciente P11 no plano sagital, ponderada em T2.	53

Figura 16: Heredograma da paciente P12.	54
Figura 17: Imagem de RM no plano sagital da paciente P12, ponderada em T2.	55
Figura 18: Imagem de RM no plano axial da paciente P12, ponderada em T2.	55
Figura 19: Proposta de fluxograma composto por exames genéticos, hormonais e de imagem para avaliação, diagnóstico e classificação de MRKH.	62
Figura 20: Representação do trato genitourinário feminino normal e alterado.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes previamente estudados na MRKH, com suas respectivas localizações, funções e desordens associadas.	25
Tabela 2. Resumo das características clínicas das participantes do estudo.	38
Tabela 3. Resumo das alterações encontradas nas pacientes.	39
Tabela 4. Resultados de cariótipos e CMAs realizados.	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIS	Síndrome da Insensibilidade Androgênica
AMH	Hormônio anti-mülleriano
AMHR	Receptor do hormônio anti mulleriano
AR	Receptor androgênico
Array-CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>
AVE	Acidente vascular encefálico
CAIS	Síndrome da Insensibilidade Androgênica Completa
CGP	Células germinativas primordiais
ChAS	<i>Chromosome Analysis Suite</i>
CHD	Helicases com cromodomínio de ligação ao DNA
CIA	Comunicação Intratrial
CIV	Comunicação interventricular
CMA	Análise Cromossômica por <i>Microarray</i>
CNVs	Variação de número de cópias
<i>DAX1</i>	<i>Dosage sensitive adrenal hypoplasia on chromosome X</i>
DDS	Distúrbio de diferenciação sexual
DGS	Síndrome de DiGeorge
DGS-like	DiGeorge-like
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamina tetracético
ER	Receptor estrogênico
FDT	Fator de determinação testicular

<i>FGF9</i>	<i>Fibroblast growth factor 9</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GALT	Galactose-1-fosfato uridil transferase
GH	Hormônio do crescimento
<i>HTRIE</i>	<i>5-hydroxytryptamine receptor 1E</i>
HUA	Displasia urogenital hereditária (HUA)
HUB	Hospital Universitário de Brasília
LH	Hormônio Luteinizante
<i>LHX1</i>	<i>Lim homeobox gene 1</i>
LOH	Perda de heterozigose
MA	Aplasia Mülleriana
MAIS	Síndrome da Insensibilidade Androgênica Leve
MIS	Substância Inibidora Mülleriana (MIS)
MRKH	Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser
MÜ	Anomalia mülleriana
MURCS	Aplasia do ducto de Müller, displasia renal e anomalias da coluna cervical
<i>NROB1</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1</i>
OD	Ovário direito
OE	Ovário esquerdo
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man database</i>
PAIS	Síndrome da Insensibilidade Androgênica Parcial
<i>PAX2</i>	<i>Paired box gene 2</i>
PCA	Persistência do canal arterial
PCR	Reação em cadeia da polimerase

RM	Ressonância Magnética
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>RSPO-1</i>	<i>R-spondin family, member 1</i>
SC	Síndrome de CHARGE
SDD	Sem diagnóstico determinado
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo
<i>SOX9</i>	<i>SRY-related HMG box gene 9</i>
<i>SRY</i>	<i>Sex-determining region of the Y chromosome</i>
SW	Síndrome de Williams
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)
USG	Ultrassonografia
VT	Vértebra de transição
<i>WNT4</i>	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 4</i>
<i>WT1</i>	<i>Wilms tumor 1</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. EMBRIOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR.....	16
3. GENES QUE ATUAM NA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL.....	18
4. SÍNDROME DE ROKITANSKY: ETIOLOGIA GENÉTICA E TIPO DE HERANÇA ...	21
5. SINAIS E SINTOMAS ASSOCIADOS À SÍNDROME DE ROKITANSKY	22
6. DIAGNÓSTICO	23
7. GENES E REGIÕES CANDIDATAS	24
8. TRATAMENTO.....	28
9. JUSTIFICATIVA	30
10. OBJETIVO	31
10.1 Objetivo Geral	31
10.2 Objetivos específicos.....	31
11. METODOLOGIA.....	31
11.1 Pacientes	31
11.1.1 Critérios de Inclusão	32
11.1.2 Critérios de Exclusão	32
11.1.3 Material Biológico	32
11.1.4 Exame de Cariótipo.....	33
11.2 Extração de DNA	34
11.3 Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	34
11.4 Análise Cromossômica por Microarray (CMA).....	35
12. RESULTADOS	36
12.1 PCR para detecção do gene <i>SRY</i>	43
12.2 Descrição das pacientes portadoras de MRKH	43
12.3 Descrição da paciente com anomalia mülleriana.....	52
12.4 Descrição da paciente com distúrbio de diferenciação sexual.....	53
12.5 Descrição das pacientes sem diagnóstico definido.....	56
13. DISCUSSÃO	58
13.1 Pacientes com MRKH	58
13.2 Paciente com anomalia mülleriana	63
13.3 Paciente com distúrbio de diferenciação sexual.....	64
13.4 Pacientes sem diagnóstico determinado	66
14. CONCLUSÃO.....	69

15. REFERÊNCIAS	70
16. ANEXOS	84
ANEXO A – AVALIAÇÃO HORMONAL DAS PACIENTES PARTICIPANTES DO ESTUDO.....	84
ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNB	85
ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)...	87
ANEXO D – TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO DE IMAGEM PARA FINS DE PESQUISA	89

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH; OMIM %277000), também chamada Síndrome de Rokitansky ou Aplasia Mülleriana (MA), é uma doença congênita de etiologia desconhecida caracterizada por aplasia/agenesia do útero e dos dois terços superiores da vagina em mulheres com cariótipo 46, XX (GUTSCHE et al., 2011). A agenesia de útero foi relatada pela primeira vez em 1559 por Realdus Columbus, porém a síndrome só foi descrita em 1838 por Rokitansky, que a caracterizou por ausência congênita da vagina, útero pequeno bipartido e ovários normais (SOUSA et al., 2014).

Acredita-se que o defeito genital seja decorrente de alterações nos ductos de Müller, que são os primórdios do sistema reprodutor feminino. Eles dão origem ao útero, colo do útero, tubas uterinas e à porção superior da vagina. Pacientes afetadas apresentam ovários funcionais, desse modo, o desenvolvimento das características sexuais secundárias é normal. A MRKH é a segunda causa mais comum de amenorréia primária e tem incidência em torno de 1 para cada 5000 mulheres (GERVASINI et al., 2010).

Essa síndrome pode se manifestar de forma isolada ou estar associada a outras malformações, que incluem: alterações do trato urinário superior que compreendem agenesia renal, rim ectópico ou em formato de ferradura, hipoplasia renal e hidronefrose; malformações esqueléticas, especialmente na coluna vertebral, com presença de escoliose, fusão de vértebras e anomalia de Klippel-Feil; defeitos auditivos; anormalidades digitais (polidactilia ou sindactilia) e cardíacas, que são manifestações menos frequentes (MORCEL et al., 2007).

Inicialmente, a síndrome MRKH era considerada de ocorrência esporádica, sem envolvimento de fatores genéticos e associada a fatores ambientais como diabetes gestacional e exposição a substâncias teratogênicas (COUTINHO, 2011). Entretanto, a associação entre tais fatores ambientais e a síndrome não foi confirmada, e a etiologia da doença continua desconhecida (MORCEL et al., 2007). Contudo, a presença de agregação familiar na síndrome sugere uma possível influência genética na doença (WANG, et al., 2017).

2. EMBRIOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR

A determinação do sexo genético ocorre no momento da fertilização e depende da presença do cromossomo X ou Y no espermatozóide. No entanto, o aparecimento de características femininas ou masculinas só ocorrerá na sétima semana de vida intra-embriônica. Por esse motivo, no período inicial do desenvolvimento embrionário, uma gônada indiferenciada e comum aos dois sexos está presente (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2012). Essa gônada é composta por uma região cortical mais externa e uma porção mais interna, medular (MITCHELL; SHARMA, 2009).

A diferenciação do sistema reprodutor humano se inicia no 24º dia após a fertilização, com a migração das células germinativas primordiais (CGP). Essas células se originam do epiblasto, migram pela linha primitiva e se posicionam no mesoderma extraembrionário que recobre o saco vitelínico próximo a origem do alantóide (figura 1) (CARLSON, 2014; IRIE; TANG; SURANI, 2014). Por expressarem as proteínas *Sox*, *Nanog* e *Oct-4*, se mantêm indiferenciadas. As CGP migram inicialmente, da base do alantóide para o futuro intestino posterior e depois, do intestino posterior até o mesentério dorsal nas cristas urogenitais (figura 2) (CARLSON, 2014).

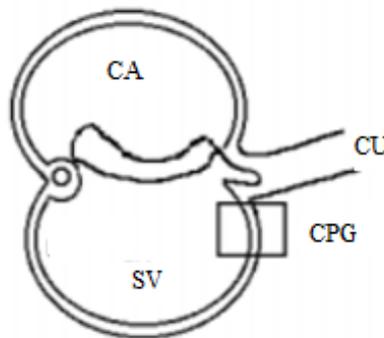


Figura 1: Corte transversal de um embrião. A área marcada mostra a localização das células germinativas primordiais no mesoderma extraembrionário da parede posterior do saco vitelínico (SV). CA (cavidade amniótica). CU (cordão umbilical). Foto adaptada de: CHUAIRE; SÁNCHEZ, 2002.

As CGP chegam à gônada primitiva em torno da quinta semana, porém só adentram às cristas urogenitais na sexta semana. Enquanto as CGP migram em direção a crista gonadal o epitélio do sulco genital prolifera e as células epiteliais penetram o mesênquima subjacente, formando os cordões gonadais (figura 2). (CARLSON, 2014; SADLER, 2006).

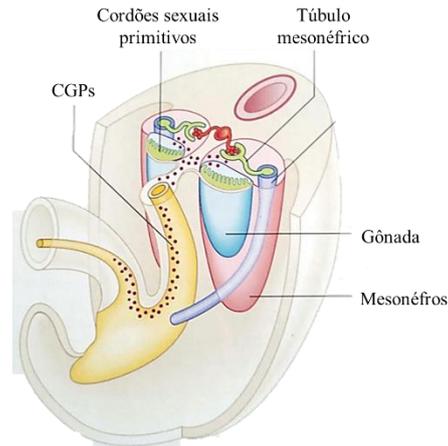


Figura 2: Migração das células germinativas primordiais. Foto adaptada de: Mitchell; Sharma, 2009.

A diferenciação fenotípica sexual começa pelas gônadas e avança por induções gonadais nos sistemas de dutos sexuais. Durante a quinta e sexta semanas de gestação, está presente uma gônada bipotencial onde os embriões masculinos e femininos apresentam tanto os ductos mesonéfricos (de Wolff) quanto os ductos paramesonéfricos (de Müller), como demonstrado na figura 3 (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2012).

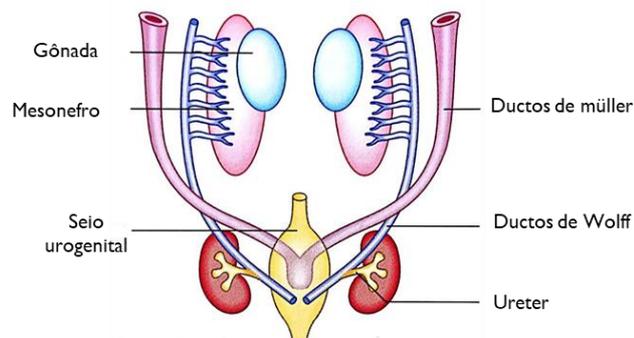


Figura 3: Gônada bipotencial. Imagem que demonstra a localização dos ductos mesonéfricos e paramesonéfricos na gônada bipotencial. Foto adaptada de: Mitchell; Sharma, 2009.

No embrião geneticamente masculino, na presença do cromossomo Y, há produção do Fator de Determinação Testicular (FDT) que induz o desenvolvimento dos testículos. Os cordões gonadais se diferenciam em cordões seminíferos e adentram a medula da gônada e posteriormente formam a rede testicular. Neste ambiente, algumas células vão se diferenciar em células de Sertoli. Concomitantemente o FDT induz o mesenquima gonadal a se diferenciar em células de Leydig (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2012). Os ductos de Wolff se diferenciam, sob a ação da testosterona liberada pelas células de Leydig, em genitália interna masculina, isso é, epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal. Além disso, as células de

Sertoli, presentes nos testículos, liberam hormônio anti-mülleriano (AMH) que é responsável pela degeneração dos ductos de Müller (KIERSZENBAUM, 2007).

O desenvolvimento das gônadas de um embrião 46, XX ocorre de maneira mais lenta. A ausência de testosterona promove regressão dos ductos de Wolf e, como não há a presença de células de Sertoli, não ocorre a produção de AMH, permitindo que os ductos de Müller se desenvolvam e deem origem a maior parte do sistema genital feminino (CHEROKI, 2008).

Esses ductos caminham em direção ao local em que futuramente se originará a região pélvica, passando paralelamente aos ductos de Wolf. Ao chegarem à região determinada, os ductos de Müller cruzam ventralmente os ductos mesonéfricos e se fundem, dando origem ao primórdio uterovaginal. A porção cranial do ducto, que não sofreu fusão, dará origem às tubas uterinas (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2012).

Os cordões gonadais, presentes no desenvolvimento ovariano, penetram na medula formando a *rete ovarii* rudimentar que degenera. Posteriormente, na sétima semana de desenvolvimento, surgem os cordões corticais que penetram no mesênquima e passam a incorporar as CGP que adentraram a região medular da gônada. No decorrer do desenvolvimento, esses cordões se rompem e liberam os folículos primordiais que são constituídos por uma ovogônia e rodeados por uma camada de células foliculares (MOORE, PERSAUD, TORCHIA, 2012; SADLER, 2006). As CGP dão origem às ovogônias que proliferam por mitose e entram na meiose I, passando a ser chamadas de ovócitos (SCHOENWOLF, et al., 2009; CARLSON, 2014).

3. GENES QUE ATUAM NA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL

Diversos genes são necessários para a diferenciação sexual e alguns deles já possuem funções conhecidas. Entretanto, ainda é difícil estabelecer como esses genes interagem na determinação da gônada. No braço curto do cromossomo Y está localizado um gene cuja função é muito importante para o desenvolvimento masculino. Conhecido como *SRY* (*sex-determining region of the Y chromosome*), este gene é responsável pela codificação do fator de determinação testicular (FDT), além de ativar a diferenciação das células de Sertoli (GILBERT, 2006; KIERSZENBAUM, 2007; TAJOURI, et al., 2017).

Indivíduos que não possuem o braço curto do cromossomo Y se desenvolvem fenotipicamente como mulheres. Dessa maneira, o *SRY* está presente em homens XY e também em casos raros onde ocorre translocação desse gene, normalmente para o cromossomo X, resultando em homens XX com o gene *SRY* translocado (GILBERT, 2006; WITCHEL, 2018).

De forma oposta, o *SRY* está ausente em mulheres XX e presente também em raras situações onde esse gene possui mutação de ponto ou de leitura que altera seu produto final, resultando em mulheres XY com o gene *SRY* não funcional (GILBERT, 2006).

O gene *SRY* também apresenta função de regular positivamente outro gene importante para o desenvolvimento sexual, o gene *SOX9*. Esse gene autossômico, localizado em 17q24.3, está envolvido em diversos processos como o controle da diferenciação das células de Sertoli e a iniciação da diferenciação das células de Leydig (ALANKARAGE et al., 2016).

Em experimentos com camundongos, foi possível observar que o gene *SOX9* ativa a expressão de *FGF9*, que atuam em conjunto para suprimir a expressão de *WNT4* (localizado no cromossomo 1p36.12) por meio de feedback positivo com mecanismo ainda não conhecido, ocorrendo, dessa maneira, a diferenciação sexual da via masculina. (EGGERS; SINCLAIR, 2012). Além disso, o gene *WNT4* regula a produção de uma proteína importante para a formação do trato genital feminino, rins e glândulas endócrinas (GENETICS HOME REFERENCE).

Apesar dos genes envolvidos no desenvolvimento masculino já terem sido extensivamente estudados, as vias de regulação feminina ainda não estão completamente definidas (BIASON-LAUBER, 2012). Na ausência do gene *SRY*, não ocorre diferenciação das células de Sertoli, promovendo em seu lugar a diferenciação das células foliculares (SCHOENWOLF, et al., 2009).

O gene *DAX1* (*dosage sensitive adrenal hypoplasia on chromosome X*), também conhecido como *NROB1*, é um fator de transcrição importante para o desenvolvimento sexual. Esse gene parece atuar como um “repressor de testículos” ou fator “pró-ovariano” além de possuir papel antagonista ao *SRY*. *DAX1* reprime a transcrição da Substância Inibidora Mülleriana (MIS), prevenindo, dessa maneira, a regressão dos ductos de Müller (IYER, McCABE, 2004; SUNTHARALINGHAM et al., 2015).

O gene *WNT4* é um fator “pró-ovariano” que durante a vida embrionária é expresso nos ovócitos e nas células da granulosa. Esse gene atua reprimindo o desenvolvimento masculino e regulando positivamente *DAX1*. A duplicação de *WNT4* induz a feminilização em homens 46, XY enquanto que a baixa expressão desse gene induz a masculinização de mulheres 46, XX (BIASON-LAUBER, 2012). *WNT4* atua no processo de diferenciação ovariana, tendo papel considerado importante na formação dos ductos de Müller (EGGERS; SINCLAIR, 2012).

O gene *WNT4* faz parte da família *WNT* que é responsável pela codificação de glicoproteínas consideradas altamente conservadas. Os genes da família *WNT* exercem sua função através da via canônica ou não canônica (DRUMMOND, 2007). Uma das formas de

ativação da via canônica *WNT/βcatenina* ocorre pela ligação de *WNT4* ao receptor *frizzled* e *LRP5/6*, que sofre fosforilação. A fosforilação de *LRP5/6* inibe a formação do complexo de destruição de *βcatenina* permitindo seu acúmulo no citoplasma e consequente migração para o núcleo, onde se ligará a fatores de transcrição (SANTOS, 2015).

Outro gene importante na cascata de ativação da via feminina de desenvolvimento é o gene *RSPO-1*, que faz parte da família R-spondina, sendo considerada importante para a diferenciação ovariana (SILVA, 2015). O gene *RSPO-1* atua ativando *WNT4* e em conjunto, atuam na estabilização de *βcatenina*, estabelecendo a via feminina de diferenciação (figura 4) (OHNESORG;VILAIN; SINCLAIR, 2014).

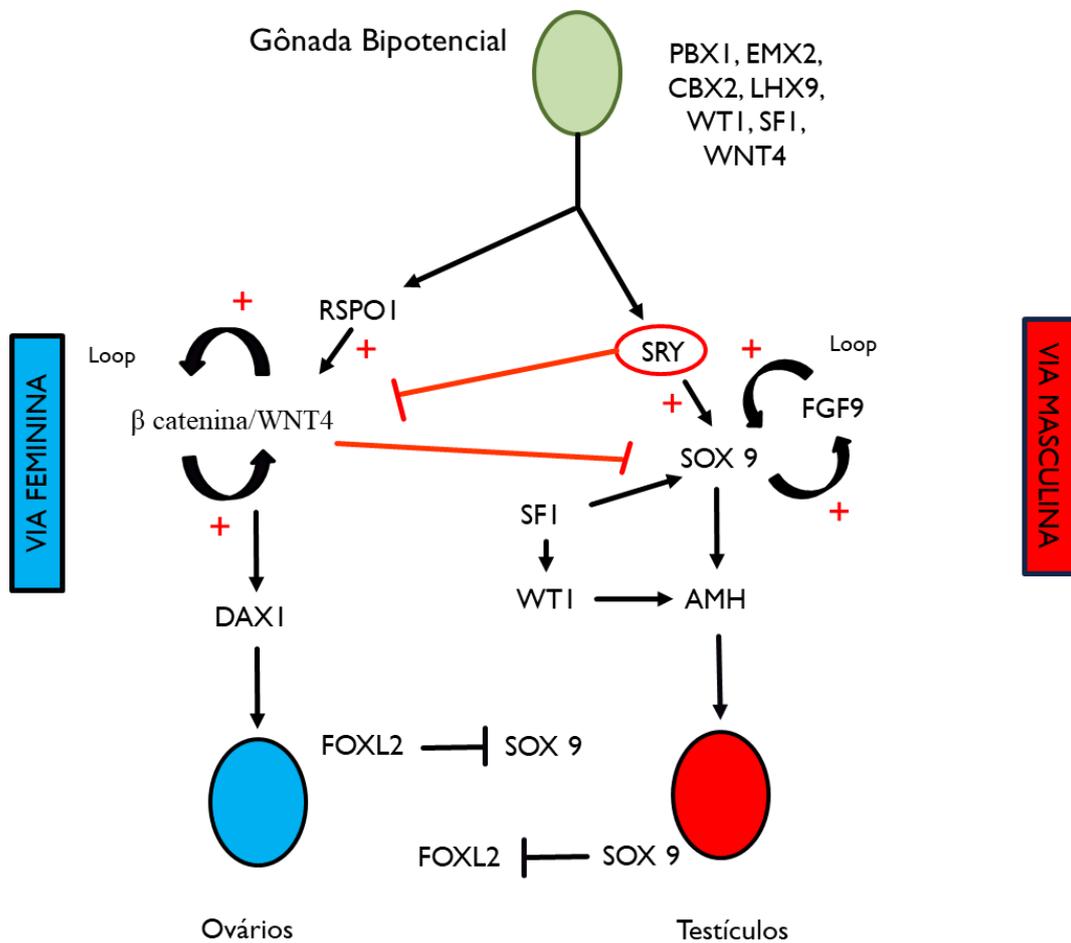


Figura 4: Cascata simplificada de ativação de genes que participam no desenvolvimento masculino e feminino. Figura adaptada da aula de desenvolvimento do sistema urogenital - Dra. Adriana Lofrano.

4. SÍNDROME DE ROKITANSKY: ETIOLOGIA GENÉTICA E TIPO DE HERANÇA

As malformações observadas mais frequentemente na síndrome envolvem sistemas que possuem proximidade espacial entre a quarta e décima segunda semana do desenvolvimento embrionário. O acometimento urogenital observado nestas pacientes sugere que o defeito ocorra, devido a uma possível falha na fusão dos ductos de Müller (CHEROKI, 2008; REZENDE, et al., 2013; PITTOCK; VUKSANOVIC; LTEIF, 2005). Os ductos paramesonéfricos se desenvolvem lateralmente às gônadas e sua porção caudal cruza os ductos mesonéfricos e se fundem dando origem ao primórdio uterovaginal, que formará o útero e também a porção superior do canal vaginal (figura 3) (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2012).

Na tentativa de estabelecer o padrão de herança genética associada à MRKH, diferentes estudos apresentaram resultados divergentes (SCHIMKE, 1980; MORCEL, 2008; PETROZZA et al., 1997; CARSON, et al., 1983). Além destas divergências, também existem dificuldades relacionadas ao estudo da progênie. Contudo, grande parte dos trabalhos sugere que a MRKH possua herança autossômica dominante com penetrância incompleta e expressividade variável (FONTANA, et al., 2017; HERLIN, et al., 2014).

Em 1980, Schimke e colaboradores sugeriram a existência de uma relação entre a MRKH e adisplasia urogenital hereditária (HUA), propondo um gene autossômico dominante responsável pelas alterações renais e müllerianas presentes na HUA. Segundo Morcel (2008), a MRKH parece ter herança autossômica dominante, com penetrância incompleta e expressividade variável. Entretanto, um estudo realizado anteriormente por Petrozza e colaboradores (1997), utilizando a técnica de fertilização assistida em mulheres portadoras de MRKH, demonstrou que esse não é o padrão de herança relacionado à síndrome. Não foram observadas anomalias congênitas nos 34 pacientes nascidos vivos (17 mulheres e 17 homens), exceto por defeito de orelha média e alteração na audição encontrada em um recém-nascido do sexo masculino. Autores concluem que os resultados obtidos nesse estudo sugerem herança recessiva ou multifatorial. O estudo realizado por Carson, et al. (1983), também sugeriu que MRKH poderia apresentar um tipo de herança multifatorial/poligênica.

A hipótese de herança autossômica dominante também é contestada por um relato em 2003 no qual foi descrito pela primeira vez um caso de gêmeas monozigóticas que apresentavam anomalias diferentes. Uma delas procurou a ginecologia com queixa de amenorréia primária, sendo diagnosticada com MRKH. Seu exame constatou agenesia uterovaginal combinada à

ausência de rim direito. Sua irmã foi diagnosticada com deficiência longitudinal tibial bilateral isolada. Esse relato também demonstra a associação entre o desenvolvimento do sistema esquelético e genitourinário (STEINKAMPF; DHARIA; DICKERSON, 2003).

Segundo Layman (2014), é possível que o mecanismo de *imprinting* esteja envolvido com a patogênese da MRKH. Entretanto, existem estudos que demonstram a ocorrência esporádica da síndrome e, efetivamente, fatores epigenéticos também podem estar relacionados à esses casos (FONTANA, et al., 2017; WATANABE, et al., 2017).

5. SINAIS E SINTOMAS ASSOCIADOS À SÍNDROME DE ROKITANSKY

Amenorréia primária é normalmente o primeiro sinal clínico observado em pacientes que apresentam MRKH, podendo estar acompanhada ou não de dores abdominais que se assemelham a cólicas menstruais e estão presentes de maneira cíclica (REZENDE, et al., 2013). A dispareunia e esterilidade também são queixas frequentes. Portadoras da MRKH não possuem o terço superior da vagina (vagina em fundo cego) e apresentam aplasia/hipoplasia de útero, possuem fenótipo feminino com desenvolvimento normal das características sexuais secundárias, pois apresentam ovários funcionais. Portanto, possuem pubarca e telarca normais e genitália externa sem alterações (MORCEL, et al., 2007; OPPELT, et al., 2006; GUTSCHE et al., 2011).

A MRKH pode ocorrer de maneira isolada, ou seja, tendo comprometimento apenas do sistema reprodutor, ou podem ocorrer complicações mais graves, apresentando malformações em outros sistemas além do sistema genital (BORGES, et al.; 2012).

O nível de comprometimento reflete na classificação da síndrome. Sendo classificada da seguinte maneira:

- MRKH típica (tipo I) – É caracterizada por alterações que são restritas ao sistema reprodutor. Paciente apresenta aplasia/hipoplasia uterovaginal, porém os ovários, tubas uterinas e sistema renal não apresentam anormalidades (HERLIN; HOJLAND; PETERSEN, 2014).
- MRKH atípica (tipo II) – Recebem essa classificação pacientes que possuem alterações que vão além da aplasia uterovaginal. Também podem ser observadas malformações ovarianas, renais, esqueléticas, cardíacas e auditivas (HERLIN, et al., 2016; OPPELT, 2006).
- Associação de MURCS – Algumas pacientes classificadas como MRKH atípica também possuem alterações que se encaixam nos critérios de diagnóstico para MURCS. Nessa

classificação da síndrome, a paciente apresenta uma combinação de aplasia mülleriana e renal e displasia dos somitos cérico torácicos (COUTO; MARQUES; ÁGUAS, 2007).

As diversas malformações associadas à MRKH podem ter origem a partir da interação dos ductos de Wolff e de Müller durante as primeiras semanas do desenvolvimento embrionário. Cerca de 60% das portadoras da MRKH apresentam malformações associadas. As malformações do trato urinário são as anomalias mais frequentemente encontradas (cerca de 40% dos casos (MORCEL et al., 2007). As principais alterações incluem: agenesia renal, rins ectópicos, rim em ferradura, duplicação da pelve renal e hidronefrose. Por serem alterações muito prevalentes, a investigação de alterações renais torna-se essencial na avaliação de pacientes com a síndrome (OPPELT et al, 2006; MORCEL et al, 2007; OPPELT et al, 2012).

Além das malformações do trato urinário superior, alterações no sistema esquelético também são encontradas em 20% dos casos (REZENDE et al., 2013). Estas anormalidades envolvem principalmente a coluna vertebral e de forma menos frequente a face e as extremidades. Entre as alterações relatadas estão fusão de corpos vertebrais, escoliose e anomalia de Klippel-Feil, que se caracteriza por pescoço curto, baixa implantação capilar e restrição da mobilidade do pescoço com a presença de duas ou mais vértebras fusionadas na região cervical (REZENDE et al, 2013; IUTAKA et al, 2011).

A perda auditiva, encontrada em cerca de 10 a 15% das pacientes com associação de MURCS, pode ser condutiva devido à má formação da orelha média ou neurossensorial com gravidade variável. As malformações cardíacas associadas são raras, já foram descritas alterações como janela aortopulmonar, comunicação interatrial (CIA) e estenose pulmonar valvar. Alterações digitais como sindactilia e polidactilia têm manifestação menos frequente (MORCEL et al., 2007).

6. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da MRKH geralmente é tardio devido ao desenvolvimento normal da genitália externa e dos caracteres sexuais secundários. A média de idade do diagnóstico está entre 15 e 18 anos, tendo a amenorreia primária como queixa inicial para investigação da síndrome. No entanto já foram relatados casos de diagnóstico na infância, principalmente quando há manifestação de alterações associadas (GOVINDARAJAN, et al., 2008; BORGES et al, 2012). Ao exame físico as mulheres afetadas geralmente apresentam desenvolvimento pubertário normal, com distribuição pilosa e desenvolvimento mamário adequado para a idade. A vagina é hipoplásica ou ausente e o hímen pode estar presente (SOUSA et al., 2014).

Devido a uma expressão clínica heterogênea, além do exame físico, uma investigação complementar com base em exames de imagem e análise hormonal deve ser realizada quando existe a suspeita de MRKH. Na existência de outros sintomas associados, deve-se realizar raio-X ou ressonância magnética para avaliação de alterações esqueléticas e audiograma (SULTAN; BIASON-LAUBER; PHILIBERT, 2009).

A ultrassonografia pélvica é geralmente o primeiro exame de imagem solicitado em casos de suspeita de MRKH. Através do exame de imagem é possível verificar a presença ou não de útero, que se encontra entre a bexiga e o reto; a determinação da posição dos ovários e também a realização de uma avaliação renal. A ressonância magnética é recomendada por ser um método que apresenta melhor sensibilidade e especificidade. Além disso, para que se obtenham resultados mais precisos, é importante que o radiologista responsável pelo exame seja experiente. Este exame permite avaliação do útero, ovários, vagina e de anomalias associadas, porém não identifica todos os remanescentes müllerianos. A laparoscopia é um exame invasivo, realizado somente na existência de dúvida no reconhecimento de estruturas, pois permite uma avaliação precisa das alterações típicas presentes na síndrome (MORCEL et al., 2008; ROUSSET, et al., 2013; REZENDE et al., 2013; PIZZO, 2013).

A análise citogenética é necessária para a complementação do diagnóstico e permite a distinção desta síndrome e a síndrome de Morris (ou Síndrome da Insensibilidade Androgênica) em que ocorre feminilização testicular completa com cariótipo 46, XY. Eventualmente já foram encontradas alterações cromossômicas em pacientes afetadas, como o caso de translocação recíproca dos cromossomos 3 e 16 que resultou em agenesia útero-vaginal e o caso de mosaico para trissomia parcial do 8 com um fenótipo de aplasia mülleriana, defeitos renais, esqueléticos e assimetria facial (CHEROKI, 2008). Outros fatores importantes que devem ser considerados no diagnóstico diferencial são a presença de septo vaginal transversal e hímen imperfurado, que não são indicativos de aplasia mülleriana (PIZZO et al., 2013).

7. GENES E REGIÕES CANDIDATAS

Genes considerados importantes no desenvolvimento embrionário urogenital têm sido investigados e podem ter papel central na etiologia da doença (tabela 1). Dentre estes estão o *WT1* (*Wilms tumor 1*), gene essencial para o desenvolvimento renal e gonadal, *PAX2* (*paired box gene 2*), envolvido no início do desenvolvimento embrionário, sendo expresso também no tecido epitelial dos ductos de Müller e Wolff, além de *WNT4* e *HNF1B* (também conhecido como *TCF2*) (MASSÉ, et al., 2009; PIZZO et al., 2013).

Tabela 1. Genes previamente estudados na busca da etiologia da MRKH.

Genes	Localização	Função	Desordens Associadas
<i>WT1</i>	11p13	Fator de transcrição necessário para o desenvolvimento dos rins e gônadas	Susceptibilidade ao desenvolvimento de Tumor de Wilms; Síndrome WAGR; Síndrome nefrótica; Síndrome Denys-Drash; Síndrome Frasier Síndrome Meacham.
<i>PAX2</i>	10q24.31	Fator de transcrição que pode ter papel na diferenciação celular dos rins. Tem papel crítico no desenvolvimento do trato urogenital e olhos	Síndrome papilo renal; Glomérulo esclerose focal e segmentar; Hipoplasia renal.
<i>WNT4</i>	1p36.12	Altamente expresso nos rins	Síndrome SERKAL; Aplasia mülleriana; Hiperandrogenismo; Disgenesia gonadal completa 46 XY; Distúrbio de diferenciação sexual 46, XY.
<i>HNF1B</i>	17q12	Fator de transcrição Atua no desenvolvimento do néfron e regula o desenvolvimento embrionário do pâncreas	Diabetes Mellitus; Cisto renal; Displasia renal multicística unilateral e bilateral; Carcinoma de células renais.
<i>AMH</i>	19p13.3	Promove regressão dos ductos de müller. É capaz de inibir o crescimento de tumor derivado de tecidos de origem mülleriana	Persistência dos ductos de müller; Doença do sistema genital; Salpingo-ooforite crônica.
<i>HOXA9</i>	7p15.2	Fator de transcrição que atua no desenvolvimento do eixo anterior-posterior	Leucemia mielóide; Síndrome mielodisplásica; Cordoma de clivus.
<i>HOXA10</i>	7p15.2	Fator de transcrição que atua no desenvolvimento do eixo anterior-posterior	Criptorquidismo; Endometriose; Cordoma de clivus; Câncer endometrial; Doenças do sistema reprodutor feminino.
<i>HOXA11</i>	7p15.2	Fator de transcrição que atua no desenvolvimento do eixo anterior-posterior	Sinostose radio ulnar; Trombocitopenia; Incompetência uterina cervical.
<i>HOXA13</i>	7p15.2	Fator de transcrição que atua no desenvolvimento do eixo anterior-posterior	Síndrome mão-pé-útero; Síndrome Guttmacher; Hipospádias; Polegar trifalangeal; Carcinoma urotelial invasivo de bexiga.
<i>GALT</i>	9p13.3	Catalisa a via de Leloir	Galactosemia; Deficiência de galactoquinase com catarata; Galactosemia Duarte; Oclusão de artéria vertebral;

			Deficiência de galactose epimerase.
<i>LHX1</i>	17q12	Pode desempenhar um papel na formação do mesoderma precoce e, posteriormente, na diferenciação do mesoderma lateral e na neurogênese	Síndrome de microdeleção 17q12; Síndrome de Rokitansky; Ureterocele.
<i>TBX6</i>	16p11.2	Fator de transcrição T-box que desempenha um papel essencial na determinação do destino das células estaminais axiais: neural vs mesodermal	Disostose espondilocostal 5 (AD); Disostose espondilocostal 3 (AR); Disostose espondilocostal 1 (AR).
<i>WNT9B</i>	17q21.32	Pode ser uma molécula de sinalização que afeta o desenvolvimento de regiões discretas de tecidos	Síndrome de Rokitansky; Doença duodenal.

Tabela 1: Genes previamente estudados na MRKH, com suas respectivas localizações, funções e desordens associadas. Informações retiradas de: www.omim.org e www.genecards.org.

O gene *WNT4* faz parte da família *WNT* de fatores de sinalização que codifica glicoproteínas essenciais para o desenvolvimento embrionário. Uma mutação nesse gene foi responsável pela alteração do trato genital interno em uma paciente, porém os autores sugerem que essa mutação seja responsável por um fenótipo diferente da MRKH (MELLO; ASSUMPCÃO; HACKEL, 2005; DRUMMOND, 2007). A presença de uma alteração no gene *WNT4* descrita em uma mulher com excesso de andrógenos, dismórfica, com queixas de amenorréia primária e com ausência das estruturas derivadas dos ductos de Müller, corrobora com tal hipótese (BIASON-LAUBER, et al., 2007). Entretanto, tais alterações também foram associadas a um fenótipo diferente da MRKH, uma vez que, não se detectou o hiperandrogenismo nas mulheres com essa síndrome. Essas descobertas só se aplicam a um número pequeno de casos e a etiologia da doença continua desconhecida (HERLIN; HOJLAND; PETERSEN, 2014).

Outros genes candidatos foram investigados previamente e uma possível contribuição destes na etiologia da doença foi descartada. Entre eles estão: hormônio anti mulleriano (AMH), receptor do hormônio anti mulleriano (AMHR), gene *HOXA10* e *HOXA13* (TIMMERECK, et al., 2003). Os genes homeobox compreendem uma família de 39 genes, divididos em quatro classes (*HOXA*, *HOXB*, *HOXC* e *HOXD*) e são considerados importantes no período embrionário, já que são expressos nos rins e necessários para o desenvolvimento ósseo e do trato genital feminino. O gene *HOXA9* é essencial para o desenvolvimento das tubas uterinas, assim como o *HOXA10* é necessário para o útero e o *HOXA11* para a porção superior da vagina, como mostra a figura 5. Entretanto, na MRKH não foi encontrada alterações nesses genes (BUREL, et al.,

2006; DU; TAYLOR, 2004; SULTAN; BIASON-LAUBER; PHILIBERT, 2009; GUERRIER, et al., 2006).

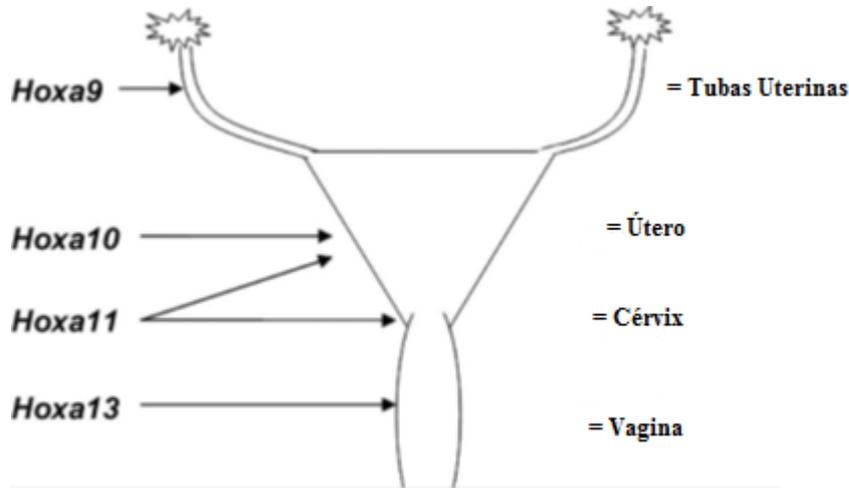


Figura 5: Esquema representativo da atuação dos genes *HOXA* na padronização do desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino. Foto adaptada de: SULTAN; BIASON-LAUBER; PHILIBERT, 2009.

A hipótese da relação entre a síndrome MRKH, galactosemia e fibrose cística também foi avaliada (CRAMER, et al., 1996; TIMMERECK, et al., 2003). Cramer et al., 1996 descreveram pacientes com agenesia vaginal e suas mães para investigar a associação de uma mutação no gene galactose-1-fosfato uridil transferase (*GALT*) e a ocorrência da síndrome. Eles observaram que 46% das mulheres afetadas pela síndrome possuíam a mutação (N314D). Segundo os autores, é possível que as demais participantes do estudo possuísem outra mutação no gene *GALT* ou deficiência de enzimas envolvidas no metabolismo da galactose. Contudo, a relação entre esses dois acontecimentos não pode ser demonstrada posteriormente por Klipstein, et al., 2003.

O gene *LHX1*, também conhecido como *Lim homeobox gene 1*, está localizado no braço longo do cromossomo 17, 17q12 (OMIM 601999). Ele é expresso durante o período embrionário no mesoderma intermediário e na gônada fetal. Em camundongos, a ausência do gene *LHX1* foi associada à agenesia mülleriana. Tais camundongos (*Lim1-null*) apresentaram ausência de útero, cervix, tubas uterinas e porção superior do canal vaginal, o que aponta para um possível papel deste gene no desenvolvimento normal do sistema reprodutor feminino (KOBAYASHI, et al., 2004).

Em adição, uma mutação responsável pela ausência de proteína funcional do gene *LHX1* foi descrita em uma paciente com MRKH, sugerindo que mutação em *LHX1* pode causar

MRKH (LEDIG, et al., 2012). Em 2013, este achado foi corroborado por Sandbacka, et al., que também descreveu a associação entre mutação no gene *LHX1* e a ocorrência da síndrome.

A participação dos genes *RAR* e *RXR* no desenvolvimento do aparelho genital de camundongos foi descrita por Mendelsohn, (1994) e Kastner, (1997). Estes autores observaram a presença de mutações nestes genes em animais cujo fenótipo se assemelhava ao da MRKH. Contudo, esses resultados não foram replicados em estudo posterior realizado em 25 mulheres diagnosticadas com MRKH, nas quais não foram detectadas mutações nos genes *RAR-gamma* e *RXR-alpha*, desta maneira, o autor sugere a exclusão destes genes como determinantes para ocorrência da síndrome (CHEROKI, 2006).

Deleções em outras regiões genômicas como 1q21.1, 17q12 e 22q11.21 também foram descritas em pacientes com MRKH. Dada uma possível participação de diferentes genes na síndrome, autores sugerem a possibilidade de herança oligogênica para a MRKH (LEDIG et al., 2011).

Esta suposição se alinha com o trabalho realizado por Morcel em 2011. Neste estudo, deleções nas regiões 4q34-qter, 8p23, 10p14 e 22q11.2 foram observadas em quatro pacientes com aplasia útero vaginal. Todas essas regiões são relacionadas a Síndrome de DiGeorge (DGS) e DiGeorge-like (DGS-like) sugerindo que a aplasia de útero e vagina pode estar relacionada a essas síndromes e que a associação de MURCS pode ser uma variação dentro do amplo espectro da DGS e DGS-like. Adicionalmente, uma deleção de 4 Mb em 22q11 foi também descrita em uma paciente com MRKH. Esta região está associada a diferentes defeitos congênitos como DGS e também Síndrome velocardiofacial (CHOUSSEIN; NASIOUDIS; SCHIZAS, 2017).

Dentre os casos de MRKH já investigados geneticamente, foram propostas cinco regiões que contém alterações (deleção/duplicação) descritas como mais recorrentes na literatura, são elas: 1q21.1, 16p11.2, 17q12, 22q11.21 e Xp22 e podem possuir envolvimento na síndrome, sendo 17q12 a mais frequente (FONTANA, et al., 2017; WILLIAMS, et al., 2017).

8. TRATAMENTO

Normalmente o tratamento da MRKH é postergado até que a paciente queira dar início a sua vida sexual. Atualmente, existem duas formas de tratamento das alterações anatômicas para a criação de uma neovagina: cirúrgico e não cirúrgico. Nos casos em que a escolha do procedimento é o não cirúrgico, o método mais difundido é a técnica dilatadora de Frank, descrito pela primeira vez em 1938. Nessa técnica, a neovagina é obtida progressivamente por meio da utilização de dilatadores que variam em comprimento e diâmetro (figura 6) (FRANK, 1938; FOLCH; PIGEM; KONJE, 2000).



Figura 6: Dilatadores de diversos tamanhos utilizados no tratamento não cirúrgico de MRKH. Fonte: <http://magazinemedica.com.br>.

Em 1981, Ingram desenvolveu adaptações para a técnica de Frank, sugerindo a colocação do dilatador em um assento de bicicleta. Dessa maneira, as pacientes possuem a possibilidade de realizar outras atividades durante o tratamento. Tanto a metodologia de Frank como de Ingram possuem altas taxas de sucesso, sendo recomendadas como tratamento de primeira linha, porém só podem ser aplicadas quando o canal vaginal já tem uma certa profundidade (MORCEL, et al., 2007; PIAZZA, 2014).

Segundo Folch, Pingem e Konje (2000), o tempo de criação de neovagina varia entre 6 e 8 semanas. Contudo, um estudo realizado por Edmonds e colaboradores (2012) selecionou 245 mulheres, entre o período de 1998 e 2010, que não tinham realizado nenhum tipo de tratamento e as submeteram ao uso de dilatadores. O processo durou entre 2 e 19 meses com resultado satisfatório em 94,9% dos casos. Em 2001, Roberts, Haber e Rock, publicaram um estudo onde foram selecionadas 51 pacientes para realização da variante proposta por Ingram. Dessas, 37 aceitaram realizar o procedimento e 34 delas obtiveram sucesso, constatando uma taxa de 91,9% de sucesso.

A criação de neovagina também pode ser realizada através de intercuro sexual. Essa é uma possibilidade para aquelas mulheres que possuem parceiro fixo, constituindo assim uma metodologia alternativa para procedimentos cirúrgicos (MOEN, 2014).

Quando a opção escolhida é a do procedimento cirúrgico, existem três técnicas que são mais difundidas: método de McIndoe, de Vecchiatti e a colpoplastia sigmóide, que atualmente se encontra em desuso. Na técnica de McIndoe ocorre dissecação da região localizada entre o reto e a bexiga. Após a cirurgia, ainda são necessárias dilatações frequentes, o que constitui uma desvantagem do método (FOLCH, PIGEM, KONJE, 2000; SOUSA, et al., 2014; MORCEL et al., 2007).

Abramowicz et al., 2013 afirmam que a técnica de Vecchiatti é um procedimento simples, rápido, eficaz e com baixa morbidade. Esses pesquisadores avaliaram 8 pacientes

submetidas ao método de Vecchiatti por laparoscopia, obtendo sucesso anatômico em 75% dos casos.

Mulheres com MRKH podem ter a vida sexual comprometida assim como a possibilidade na vida reprodutiva. Dessa forma, além do manejo e correções das anomalias anatômicas, o tratamento de sintomas tais como quadros de depressão, perda da autoestima e distúrbios na personalidade também se tornam importantes devido ao grande impacto psicológico desencadeado nessas pacientes quando descobrem agenesia útero vaginal (EDMONDS, 2003; REZENDE, 2013).

Carrard e colaboradores (2012) avaliaram o resultado funcional e a influência sobre a sexualidade de 59 pacientes que foram submetidas à colpoplastia sigmóide ou ao método de Frank. Nos dois grupos, 28% das pacientes apresentavam sinais de depressão. Em relação à imagem corporal que as pacientes tinham de si mesmas, 70% do grupo submetido à colpoplastia sigmóide se sentiu “totalmente feminina” contra 60% do grupo submetido ao método de Frank. Outro aspecto analisado foi o desejo da maternidade, 77% do total desejavam ou já tinha optado pela adoção e 82% iriam considerar a maternidade por útero de substituição. Vale ressaltar que 6 pacientes relataram a presença de depressão devido ao desejo não realizado da maternidade.

Estudos indicam que o diagnóstico precoce da MRKH é muito importante e o desempenho dos médicos, pediatra e ginecologista, é essencial para isso (NAVARRO et al., 2012). Contudo, outros trabalhos afirmam que quando mais tarde for diagnosticada a condição, melhor a capacidade de aceitação das pacientes (KRUPP et al., 2014). Apesar das divergências existentes entre os estudos, há a necessidade de acompanhamento psicológico às pacientes visto que a síndrome afeta a vida sexual assim como a capacidade de gestação (COUTINHO, 2011; BEAN et al., 2009). O momento ideal para determinar o início do tratamento é uma decisão da paciente assim como a técnica que será utilizada. (NAVARRO et al., 2012).

9. JUSTIFICATIVA

A MRKH é uma doença congênita diagnosticada, na maioria dos casos, tardiamente, durante a adolescência. Responsável por uma percentagem significativa dos casos de amenorréia primária é a segunda causa mais frequente, ficando atrás somente da disgenesia gonadal. A doença ainda não possui etiologia conhecida e a identificação de alterações genéticas que estejam associadas a esse quadro clínico poderá contribuir para sua elucidação, além de ajudar na compreensão do desenvolvimento do aparelho reprodutor.

O melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nessa condição clínica poderá cooperar para a qualidade de vida das mulheres afetadas. Além disso, o diagnóstico precoce e

correto da síndrome também pode auxiliar no manejo dos impactos psicológicos associados, além contribuir para o aconselhamento genético.

Muitas pacientes procuram centros de saúde já com diagnóstico de MRKH. Contudo, nem sempre essas mulheres se encaixam nos critérios da doença. A realização de exames de imagem, hormonais e o cariótipo são necessários para efetuar um diagnóstico diferencial com outras enfermidades que se apresentam com características semelhantes como amenorreia primária e caracteres sexuais secundários desenvolvidos. Por esse motivo, um fluxograma para análise do quadro se torna essencial para o correto diagnóstico da síndrome além de auxiliar no manejo de alterações associadas.

10. OBJETIVO

10.1 Objetivo Geral

Identificar alterações genéticas que possam estar associadas à etiologia da MRKH.

10.2 Objetivos específicos

1. Descrever o conjunto de sinais clínicos observados em um grupo de 14 pacientes diagnosticadas clinicamente com a MRKH;
2. Analisar o cariótipo destas pacientes;
3. Investigar alterações submicroscópicas no grupo de pacientes investigadas;
4. Verificar a relação genótipo/fenótipo entre as alterações encontradas e o quadro clínico das pacientes;
5. Propor um fluxograma de investigação geral para pacientes com malformação no sistema genital feminino.

11. METODOLOGIA

11.1 Pacientes

As pacientes participantes desse estudo foram provenientes do Hospital Universitário de Brasília (HUB) assim como de outros estados do Brasil. Após a realização da consulta, as médicas geneticistas informaram sobre o projeto e seus objetivos.

As pacientes que concordaram em participar da pesquisa foram elucidadas no que diz respeito ao sigilo de identidade dos participantes e também sobre a utilização de imagens. Após esclarecimento das dúvidas, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi

disponibilizado para preenchimento. As que residiam em Brasília foram então encaminhadas à avaliação ginecológica detalhada, permitindo classificá-las nos três subtipos da síndrome.

Para aquelas pacientes que não puderam vir a Brasília para a consulta, mas que quiseram participar do projeto, foram encaminhadas instruções para o envio do material biológico juntamente com os pedidos médicos de exames necessários para o diagnóstico de MRKH, além de um questionário utilizado na avaliação do quadro clínico. Da mesma forma, foram elucidadas as dúvidas a respeito do estudo e, por fim, procedeu-se a assinatura do TCLE. Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CEP-FM – CAAE: 60695716.1.0000.5558).

11.1.1 Critérios de Inclusão

- 1) Apresentar diagnóstico clínico prévio da síndrome;
- 2) Assinatura dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pacientes/responsáveis.

11.1.2 Critérios de Exclusão

- 1) Não concordância em participar do estudo;
- 2) Não apresentar fenótipo clínico de MRKH.

11.1.3 Material Biológico

Para a realização dos exames propostos neste trabalho, foram coletados de 4 a 8 ml de sangue periférico de cada paciente em um tubo de sangue contendo heparina, que foi utilizado para exame de cariótipo, e um tubo com ácido etileno diamina tetracético (EDTA) que foi encaminhado para extração de DNA seguido de PCR para detecção de *SRY* e *CMA*, conforme apresentado no fluxograma elaborado para o estudo (figura 7).

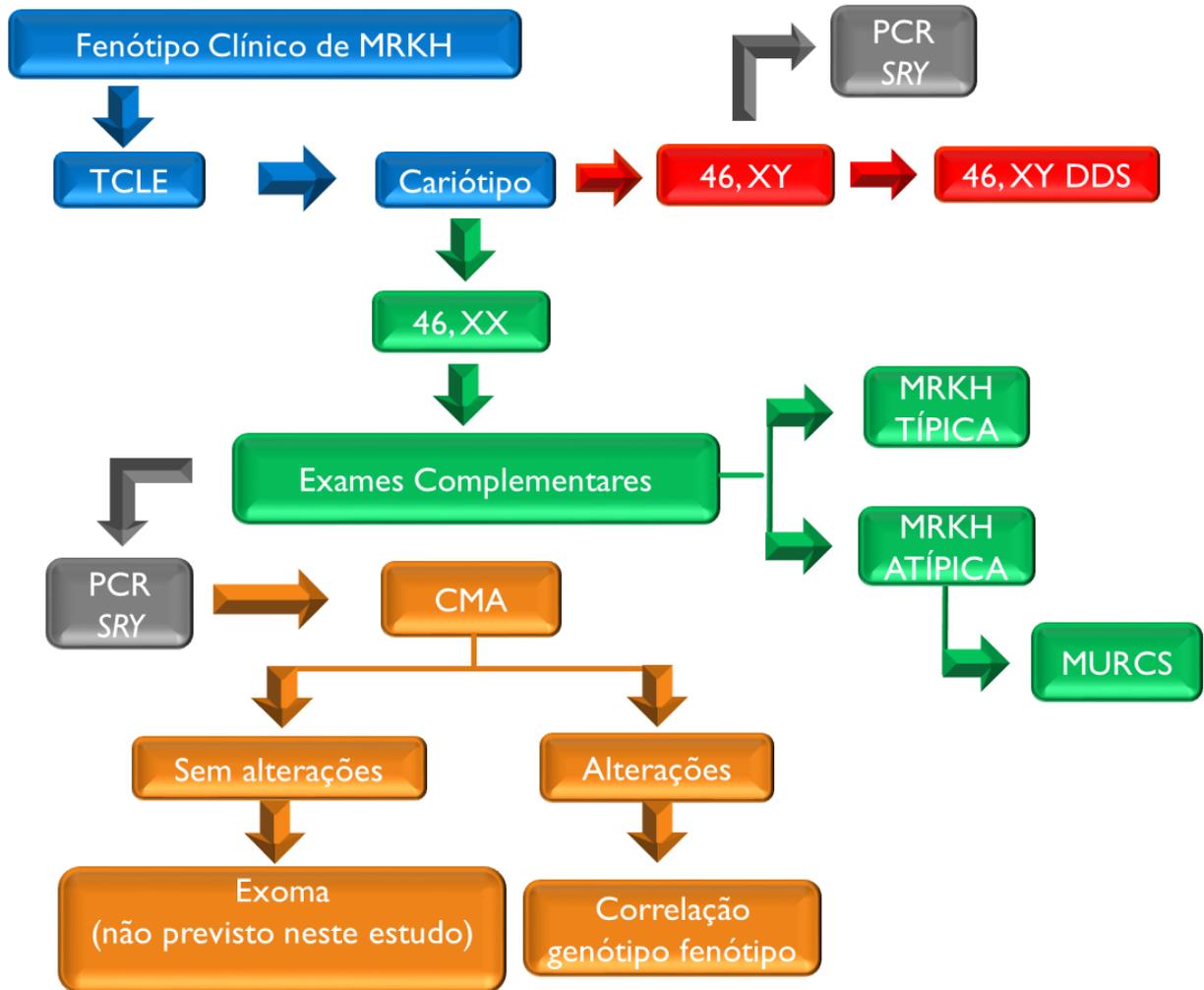


Figura 7: Fluxograma do estudo.

11.1.4 Exame de Cariótipo

Seguindo o protocolo de rotina para a obtenção de linfócitos a partir de sangue periférico, a amostra de sangue coletada em tubo contendo heparina foi semeada em garrafa estéril para cultura de células contendo meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) enriquecido com fitohemaglutinina, L-glutamina e soro fetal bovino. Após 72h de incubação a 37°C, foi adicionado Colchicina, com o intuito de parar a divisão celular na etapa de metáfase, onde os cromossomos estão mais condensados.

Posteriormente, as amostras foram transferidas para tubos falcons de 15 ml, submetidas à centrifugação, retirada do sobrenadante e em seguida, foi realizada a hipotonização. Após a centrifugação e descarte do sobrenadante, foi realizada a fixação das células com Fixador de Carnoy I (3:1 Álcool Metílico/ Ácido Acético Glacial). Em seguida, as amostras foram gotejadas em lâminas de vidro e colocadas a 37°C ou a temperatura ambiente por 7-10 dias, submetidas ao Bandamento G e ao final, coradas com Giemsa.

11.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA foi utilizado o método Puregene. A lise celular foi promovida em um tubo falcon contendo sangue total e 5mM de MgCl₂ e 1mM EDTA pH 8,0, seguida de centrifugação a 3400 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido, preservando-se o *pellet* de células e 100-200 µl de líquido residual. O tubo foi homogeneizado para ressuspender as células brancas e foi adicionado 3ml da solução de lise celular (10mM Tris pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0 e 1% SDS).

Em seguida, foi realizada a etapa de precipitação de proteína adicionando 1ml da solução de precipitação (7,5M NH₄Ac e 57,81g de acetato de amônia). Novamente, o tubo foi homogeneizado e centrifugado a 3400 rpm por 10 minutos. Esse procedimento promoveu a formação de um *pellet* marrom compacto.

A precipitação do DNA foi realizada transferindo o sobrenadante contendo o DNA para outro tubo falcon contendo 3ml de isopropanol 100%. O tubo foi invertido lentamente até o aparecimento de um precipitado de DNA. A amostra foi centrifugada a 3400 rpm por 3 minutos, ocorrendo a formação de *pellet* branco. Após a retirada do sobrenadante foi adicionado 3ml de etanol 70% seguido por nova centrifugação a 3400 rpm por 1 minuto e descarte do sobrenadante. A amostra foi deixada a temperatura ambiente por 15 minutos.

Por último, 200-250µl de tampão TE 1x foi adicionado para hidratação do DNA. O DNA foi armazenado entre 2-8°C.

11.3 Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR para detecção do gene *SRY* foi realizada em todas as pacientes participantes do estudo. Cada reação de 15µl conteve: 10µl de GoTaq® DNA polimerase, 2µl de DNA, 0,3µl de *primer SRY forward*, 0,3µl de *primer SRY reverse* e 2,4µl de água. As sequências dos *primers forward* e *reverse* foram respectivamente: 5' – CAT GAA CGC ATT CAT CGT GTG GTC – 3' e 5' – CTG CGG GAA GCA AAC TGC AAT TCT T – 3'.

A reação de PCR foi realizada a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos para desnaturação; 65°C por 20 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 20 segundos para extensão. Por fim, 72°C por 10 minutos. O produto da PCR foi aplicado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado no transiluminador de luz UV.

11.4 Análise Cromossômica por Microarray (CMA)

Neste estudo foi utilizada a plataforma Cytoscan™ 750k (Affymetrix) para a investigação da presença de alterações cromossômicas submicroscópicas nas pacientes participantes do estudo. Essa plataforma permite alta resolução tanto de variações no número de cópias (CNVs) quanto de perda de heterozigose (LOH), por possuir um sistema de sondas que identificam CNVs (aproximadamente 500.000 sondas) e polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) (aproximadamente 250.000 sondas).

O CMA foi conduzido conforme orientações do fabricante. Inicialmente, após a extração do DNA genômico, foi realizado ajuste das concentrações das amostras para 50ng/μl. As amostras das pacientes mais um controle positivo e negativo, fornecido pelo fabricante, foram digeridos com enzima de restrição Nsp I (Affymetrix, EUA). Posteriormente, ocorreu a ligação do DNA digerido a adaptadores, que são reconhecidos por *primers* universais utilizados na reação de PCR para amplificação dos fragmentos. Esses fragmentos devem se apresentar no gel de agarose 2% em TBE 1X com 150 - 2.000 pb de comprimento.

Após a corrida em gel de agarose, o produto de PCR foi purificado utilizando esferas magnéticas (Affymetrix, EUA) que permitem a aderência do DNA em sua superfície. Em seguida, foi realizada a quantificação das amostras em espectrofotômetro. A fragmentação foi realizada com mix de fragmentação (Affymetrix, EUA) e confirmadas em gel de agarose 4% em TBE 1X com fragmentos de 25 - 125 pb. As amostras foram marcadas com biotina e aplicadas no GeneChip® (Affymetrix, EUA) para hibridização que tem duração de 16-18h.

Posteriormente, os GeneChip® foram lavados em uma estação fluídica com tampões de lavagem e marcados com fluoróforos para leitura pelo laser. Os GeneChip® foram escaneados no GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) e analisados no Chromosome Analysis Suite (ChAS) 2.0 software (Affymetrix). As etapas da técnica de CMA estão apresentadas na figura 8.

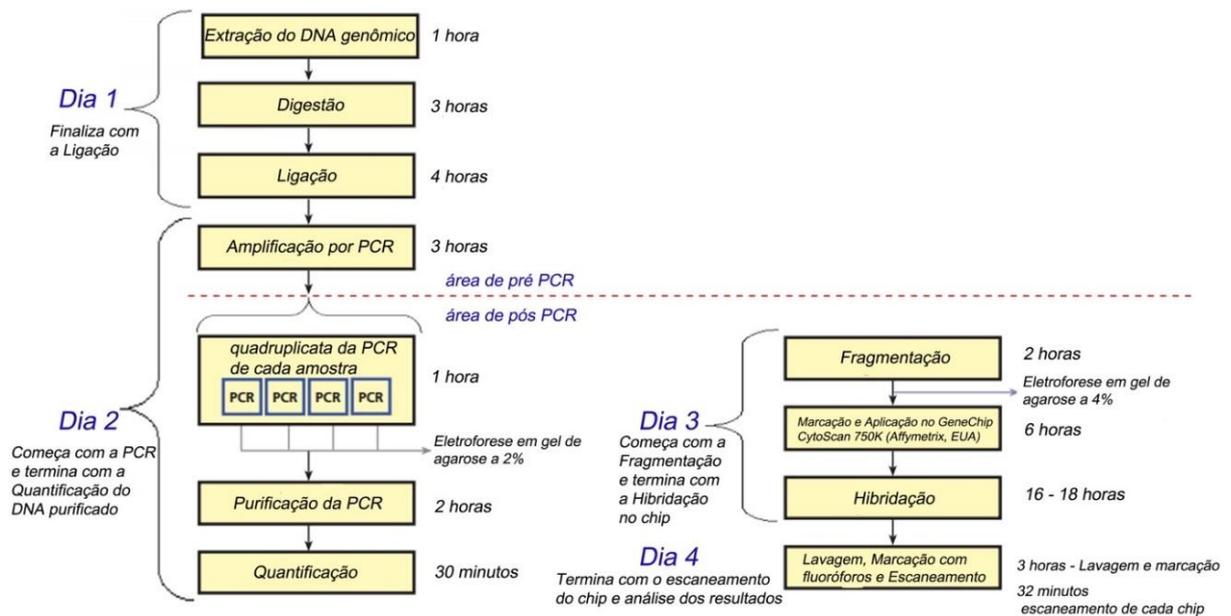


Figura 8: Protocolo da plataforma *Affymetrix* para Análise Cromossômica por *Microarray*.

12. RESULTADOS

Inicialmente, 14 pacientes diagnosticadas clinicamente com MRKH foram avaliadas e inseridas neste estudo. Entretanto, ao longo de investigações complementares, uma paciente foi reclassificada em outras categorias de malformações müllerianas (MÜ) (P11), uma paciente foi diagnosticada com distúrbio de diferenciação sexual (DDS) (P12) e duas pacientes não apresentavam os critérios necessários para diagnóstico de MRKH, mas não foi possível estabelecer o diagnóstico clínico (P4, P10). Portanto, no presente trabalho, 10 pacientes foram diagnosticadas com MRKH. A figura 9 apresenta a representação gráfica da proporção de cada diagnóstico detectado no estudo e apresenta maior proporção de pacientes com diagnóstico de MRKH I.

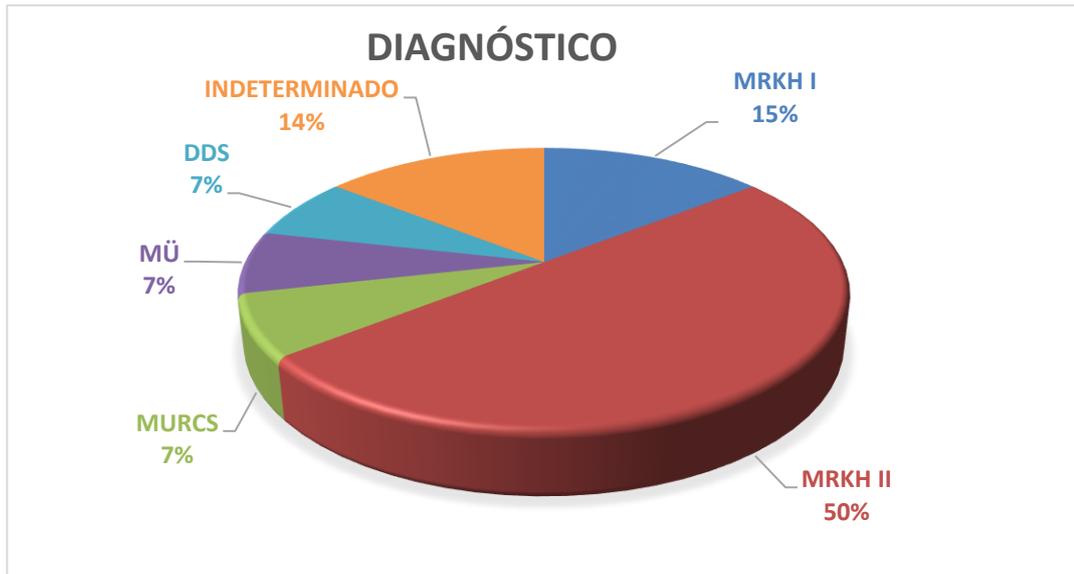


Figura 9: Representação gráfica das proporções de diferentes diagnósticos detectados no estudo (n=14).

Os dados ginecológicos das participantes do estudo estão apresentados na tabela 2, mostrando que dentre as pacientes avaliadas, apenas uma possuía útero com volume normal, porém septado (7,1%), uma possuía presença de corno uterino (7,1%), dez possuíam agenesia uterina (71,43%); e duas possuíam útero rudimentar (14,37%). As avaliações complementares incluem avaliação renal, esquelética, cardíaca e auditiva, representadas na tabela 3.

Tabela 2: Resumo das características clínicas das participantes do estudo.

PACIENTES	IDADE (anos)	CANAL VAGINAL (cm)	ÚTERO	OVÁRIOS	OD (cm³)	OE (cm³)
P1	25	NA	Ausente	No limite inferior	NA	NA
P2	28	1,4	Ausente	Sem alterações	7,4	11,4
P3	22	1,5	Ausente	Ovários com aspecto micropolicístico	20	26,2
P4	22	2	Rudimentar	Sem alterações	10,8	12,3
P5	41	Dilatação natural	Ausente	Atróficos	1,9	0,7
P6	38	8,5*	Ausente	Posição mais cranial. Formações císticas	28,5	26
P7	41	4,6	Ausente	Sem alterações	7,3	4
P8	29	3,3	Presença de corno uterino	Sem alterações	5,6	20
P9	29	6,1**	Rudimentar	Sem alterações	3,2	3,6
P10	12	Não foi possível a avaliação	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
P11	32	3,9	Septado em retroversão	Sem alterações	13,5	10,6
P12	29	9,5	Ausente	OD com presença de cisto	3,31	4,81
P13	33	Somente terço inferior	Ausente	Somente OD	NA	NA
P14	29	1	Ausente	Sem alterações	NA	NA

Tabela 2: Não avaliado (NA), Ovário direito (OD), ovário esquerdo (OE). *Após realização de cirurgia para construção de neovagina. **Após dilatação natural.

Tabela 3: Resumo das alterações encontradas nas pacientes.

PACIENTES	IDADE (anos)	AVALIAÇÃO RENAL	AVALIAÇÃO ESQUELÉTICA	AVALIAÇÃO CARDÍACA	AVALIAÇÃO AUDITIVA
P1	25	Sem alterações	NA	Prolapso da valva mitral/insuficiência mitral	Sem alterações
P2	28	Sem alterações	Diminuição dos espaços vertebrais	NA	NA
P3	22	Sem alterações	NA	CIA, CIV e PCA	Sem alterações
P4	22	Sem alterações	Hipoplasia de disco intervertebral de L5-S1	Registro de duas extrassístoles supraventriculares isoladas	Rebaixamento na função coclear bilateral
P5	41	Sem alterações	Escoliose	Sem alterações	Sem alterações
P6	38	RD ausente; RE pélvico com aneurisma no ramo arterial distal e caliectasia	Vértebra de transição lombossacra com megapófise transversa esquerda neoarticulada ao sacro	Sem alterações	Perda auditiva em altas frequências
P7	41	Sem alterações	NA	NA	NA
P8	29	Sem alterações	Escoliose/Osteofitose	Sem alterações	Sem alterações
P9	29	Sem alterações	Osteofitose/Redução do espaço intervertebral T11-T12	Sem alterações	Sem alterações
P10	12	RE ausente	Costelas cervicais rudimentares bilaterais e redução dos espaços intervertebrais em C3-C4, C5-C6 e L5-S1. Acentuação da cifose torácica e desvio do eixo vertebral torácico a direita	Sem alterações	Sem alterações
P11	32	Sem alterações	NA	NA	NA

P12	29	Sem alterações	NA	NA	NA
P13	33	Sem alterações	NA	NA	NA
P14	29	Sem alterações	Escoliose	NA	Sem alterações

Tabela 3: Comunicação intratrial (CIA), comunicação interventricular (CIV), persistência do canal arterial (PCA), rim direito (RD), rim esquerdo (RE). Não avaliado (NA).

Nota-se que dentre as alterações extragenitais, as alterações esqueléticas foram mais frequentes neste estudo. A figura 10 agrega a frequência de alterações renais, esqueléticas, auditivas e cardíacas nas pacientes diagnosticadas com MRKH, avaliadas neste estudo.

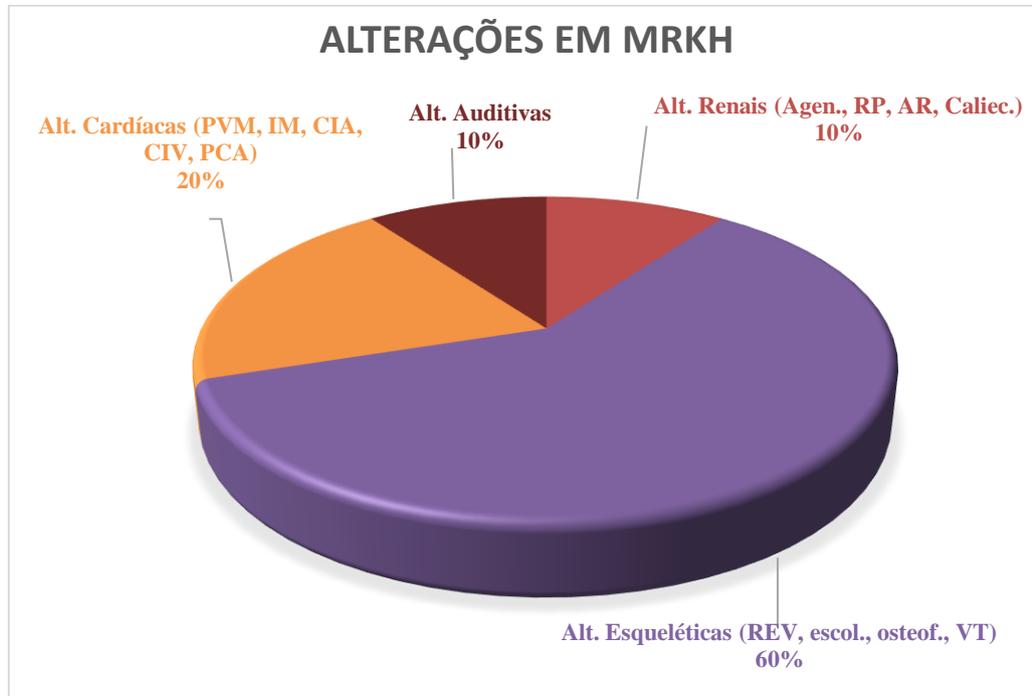


Figura 10: Gráficos apresentando as frequências das diferentes alterações clínicas observadas nas pacientes com diagnóstico de MRKH (n=10). Prolapso da valva mitral (PVM), Insuficiência mitral (IM), Comunicação intratrial (CIA), comunicação interventricular (CIV), persistência do canal arterial (PCA), Agenesia (Agen), rim pélvio (RP), aneurisma renal (AR), caliectasia (Caliec), Redução dos espaços vertebrais (REV), Escoliose (Escol.), Osteofitose (Osteof.), vértebra de transição (VT).

O resumo dos resultados obtidos por cariótipo, CMA e a classificação das pacientes estão representados na tabela 4.

Tabela 4: Resultados de cariótipos e CMAs realizados.

PACIENTE	CARIÓTIPO	CMA	TAMANHO DA ALTERAÇÃO	FENÓTIPO
P1	46,XX	Sem alterações	-	MRKH II; prolapso da valva mitral e insuficiência mitral
P2	46,XX	Sem alterações	-	MRKH II; diminuição dos espaços vertebrais
P3	46,XX	Sem alterações	-	MRKH II; CIA, CIV e PCA
P4	46,XX	Sem alterações	-	SDD
P5	46,XX	Sem alterações	-	MRKH II; escoliose
P6	46,XX	Deleção 6q14.3 arr[hg19]6q14.3(86,635,033-87,762,722)	1,128Kb	MURCS; aplasia RD, vértebra de transição
P7	46,XX	Sem alterações	-	MRKH I
P8	46,XX	Duplicação 7q11.23 arr[hg19]7q11.23(72,732,834-74,136,633)x3	1,404Kb	MRKH II; escoliose/osteofitose
P9	46,XX	Sem alterações	-	MRKH II, osteofitose/redução dos espaços intervertebrais
P10	46,XX	Sem alterações	-	SDD
P11	46,XX	Sem alterações	-	MÜ
P12	46,XY	Sem alterações	-	DDS
P13	46, XX, 22pstk+	Sem alterações	-	MRKH I
P14	46,XX	Sem alterações	-	MRKH II; escoliose

Tabela 4: Paciente sem diagnóstico definido (SDD), anomalia mülleriana (MÜ).

12.1 PCR para detecção do gene *SRY*

Os resultados obtidos pela técnica de PCR revelaram a presença de *SRY* em apenas uma paciente participante do estudo (figura 11).

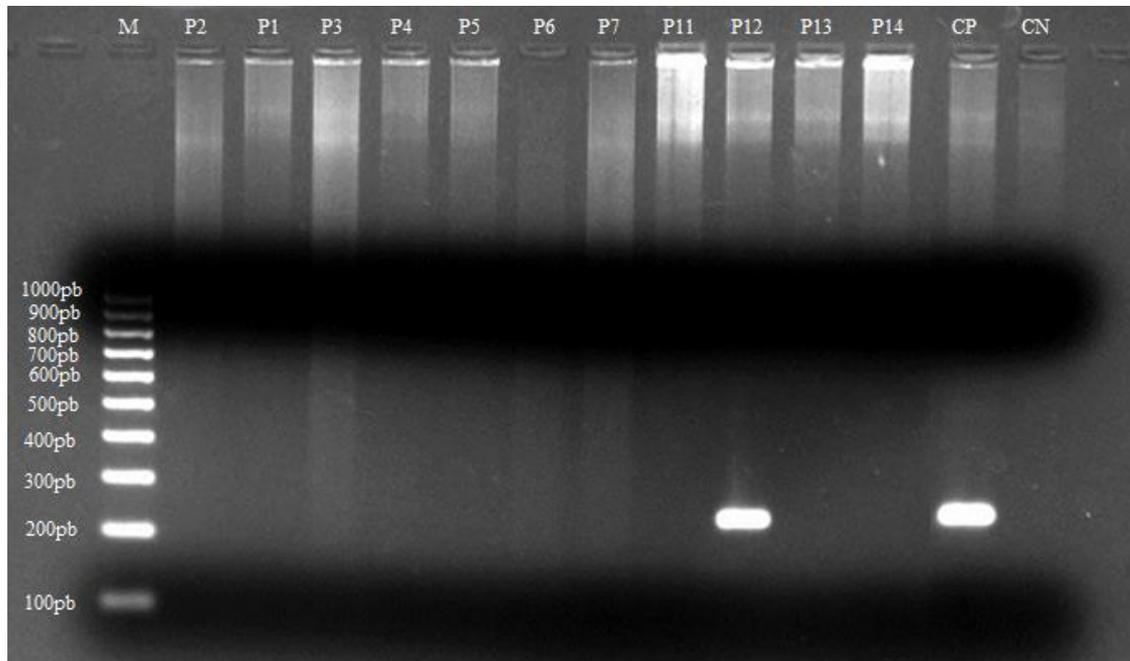


Figura 11: PCR para detecção do gene *SRY*. Marcador (M), controle positivo (CP), controle negativo (CN). Somente a paciente P12 mostrou banda positiva para *SRY*.

12.2 Descrição das pacientes portadoras de MRKH

Paciente 1

Paciente de 25 anos de idade, atendida no ambulatório de genética do HUB, filha de pais não consanguíneos. Refere telarca e pubarca aos 9 anos de idade, sem menarca. Procurou o serviço de saúde aos 15 anos de idade e realizou exames que identificaram agenesia uterina e presença de ovários bilateralmente.

No exame ginecológico foi relatada a presença de vagina curta em fundo cego, presença de pelos pubianos e genitália externa sem alterações. O ultrassom (USG) realizado revelou agenesia uterina, presença de ovários com volume no limite inferior. Possui rins tópicos de contornos e volume preservados. O exame cardíaco revelou prolapso da valva mitral e insuficiência mitral. A paciente relata amenorréia primária e dispareunia no início do ato sexual. Paciente também apresenta gastrite, úlcera, refluxo gastroesofágico e miopia. Ao exame físico, não apresenta dismorfias.

Nos exames laboratoriais apresentou: LH: 28,88; FSH: 5,69; prolactina: 19,65; estradiol: 249,5; testosterona total: 43,54 e progesterona: 0,903.

A análise de metáfases, obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino. A PCR para detecção do gene *SRY* foi negativa.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

Paciente 2

Paciente de 28 anos de idade, atendida no ambulatório de genética do HUB, filha de pais não consanguíneos, foi encaminhada à genética para investigação. Ao exame físico, não apresenta dismorfias.

O USG realizado revelou agenesia uterina, presença de ovários bilateralmente, ovário direito (OD) com volume de 7,4 cm³, ovário esquerdo (OE) com volume de 11,4 cm³, vagina curta em fundo cego, de aproximadamente 1,4 cm de comprimento. Possui rins tópicos, com forma, contorno, ecotextura e dimensões normais.

Relata que possui uma irmã que teve tumor renal que foi extraído e outra irmã com nódulo mamário. A primeira filha de seus pais faleceu com pouco mais de 1 ano. Raio X demonstrou diminuição de espaços vertebrais, sem fusões.

A análise de metáfases, obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino. A PCR para detecção do gene *SRY* foi negativa.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

Paciente 3

Paciente de 22 anos, atendida no ambulatório de genética do HUB, filha de pais não consanguíneos. Refere pubarca e telarca aos 13 anos de idade. Paciente refere que tinha hímen imperfurado e que realizou tratamento com dilatadores. Ao exame físico, apresenta características sexuais secundárias desenvolvida e não apresenta dismorfias.

No exame ginecológico foi relatado mamas e vulva íntegras e presença de vagina curta em fundo cego, de aproximadamente 1,5 cm de comprimento. O USG realizado mostrou agenesia uterina, presença de ovários bilateralmente, OD com volume de 20,0 cm³ e OE com

volume de 26,3 cm³, ambos com aspecto micropolicístico. Possui rins tópicos, de contornos e volume preservados.

A ressonância magnética (RM) da pelve confirmou agenesia uterina com presença de ovário bilateralmente. Também revelou presença de fibroma ovariano esquerdo sem significado patológico específico.

Nasceu com alterações cardíacas como comunicação intra-atrial (CIA), comunicação interventricular (CIV) e persistência do canal arterial (PCA). O CIA e PCA tiveram fechamento espontâneo. Paciente relata que já realizou exames de audição sem alterações.

Nos exames laboratoriais apresentou: LH: 6,8; FSH:3,7; prolactina: 24,3; estradiol: 97,6; testosterona: 32,9 e progesterona: 5,9.

A análise de metáfases, obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino. A PCR para detecção do gene *SRY* foi negativa.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

Paciente 5

Paciente de 41 anos de idade, atendida no ambulatório de genética do HUB, filha de pais consanguíneos (primos de 1º grau). Refere telarca e pubarca aos 14 anos, sem menarca. Aos 24 anos procurou ajuda médica e aos 28 tentou ter relação sexual, porém não houve penetração. Depois de vários atendimentos foi constatada ausência do terço superior da vagina. Relata que teve dilatação natural, não necessitando de cirurgias ou uso de dilatadores. Paciente possui hérnia de hiato, hipermetropia. Ao exame físico, não apresenta dismorfias.

O USG pélvico mostrou agenesia uterina, presença de ovários atróficos bilateralmente, OD com volume de 1,9 cm³, OE com volume de 0,7 cm³ e vagina normal (após dilatação natural). O USG de abdômen total não mostrou alterações. O raio X revelou escoliose lombar dextro convexa. Paciente refere que exames cardíacos não demonstraram alterações assim como o audiograma.

Nos exames laboratoriais apresentou: LH: 9,34 mIU/mL; FSH 13,6 mIU/mL; prolactina 7,2 ng/mL; estradiol 56,1 pg/ml; testosterona: 32,5 ng/dl e progesterona: 1,50 ng/mL.

A análise de metáfases, obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino. A PCR para detecção do gene *SRY* foi negativa.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

Paciente 6

Paciente de 38 anos de idade, atendida no ambulatório de genética do HUB, filha de pais não consanguíneos. Relata que entre 13 e 14 anos teve a telarca, entretanto só aos 15 anos procurou o serviço médico com queixa de amenorréia. Ao exame físico, não apresenta dismorfias.

No USG realizado nessa época foi dado o diagnóstico de gravidez, porém na repetição do exame foi constatada a presença de rim pélvico, único; ausência de útero, canal vaginal e ovários.

Novo USG revelou agenesia uterina, presença de ovários bilateralmente e canal vaginal de aproximadamente 8,5 cm de comprimento, após cirurgia de neovagina. Outros achados desse USG incluem: cisto simples de aspecto funcional no OE, agenesia de rim direito (RD), rim esquerdo (RE) pélvico com hipertrofia vicariante e esteatose hepática grau I.

Na RM, foi identificado aneurisma no ramo arterial distal do rim pélvico, sem sinais de trombose, medindo 1,9 cm de diâmetro. Ainda neste exame, foi observada caliectasia de alguns segmentos do rim pélvico, preenchido por material de alto conteúdo proteico/hemático. Os ovários foram caracterizados em situação mais cranial do que o habitual, mostrando formações císticas de permeio em formato levemente alongado. Diferentemente do observado no USG, a RM revelou OD com volume de 28,5 cm³ e OE com volume de 26,0 cm³.

O RaioX realizado identificou presença de vértebra de transição lombossacra (VT), com megapófise transversa esquerda neoarticulada ao sacro, associada a alterações degenerativas secundárias. Exame cardíaco não demonstrou alterações. Audiograma revelou perda auditiva em altas frequências. A paciente se queixa de distúrbio de deglutição, com frequentes engasgos e apresenta leve frouxidão ligamentar de grandes articulações.

A paciente teve um acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico agudo em 10/2017. A angiografia cerebral revelou presença de estenose no segmento V4 da artéria vertebral direita. Presença de dissecação no segmento V3 da Artéria vertebral esquerda, com grande trombo intraluminal que se estende até a artéria basilar e segmento P1 de artéria cerebral posterior direita. Também foi evidenciado nesse exame oclusão da artéria cerebelar pósterio inferior esquerda.

Outros exames revelaram discreta irregularidade parietal no segmento V3 da artéria vertebral esquerda, com trombose arterial parcial aguda do segmento V4. Hipodensidade

sugestiva de insulto isquêmico no território irrigado pela artéria cerebelar posterior e inferior esquerda, comprometendo o hemisfério cerebral esquerdo.

Nos exames laboratoriais apresentou: FSH 4,1mIU/mL; prolactina 5,7ng/mL; estradiol 41,57pg/mL e progesterona inferior a 0,15ng/ml.

A análise de metáfases, obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino. A PCR para detecção do gene *SRY* foi negativa.

A análise cromossômica por *microarray* revelou uma deleção de 1,128KB no cromossomo 6q14.3 arr[hg19]6q14.3(86,635,033-87,762,722)x1, incluindo o gene *HTR1E* conforme mostrado na figura 12.

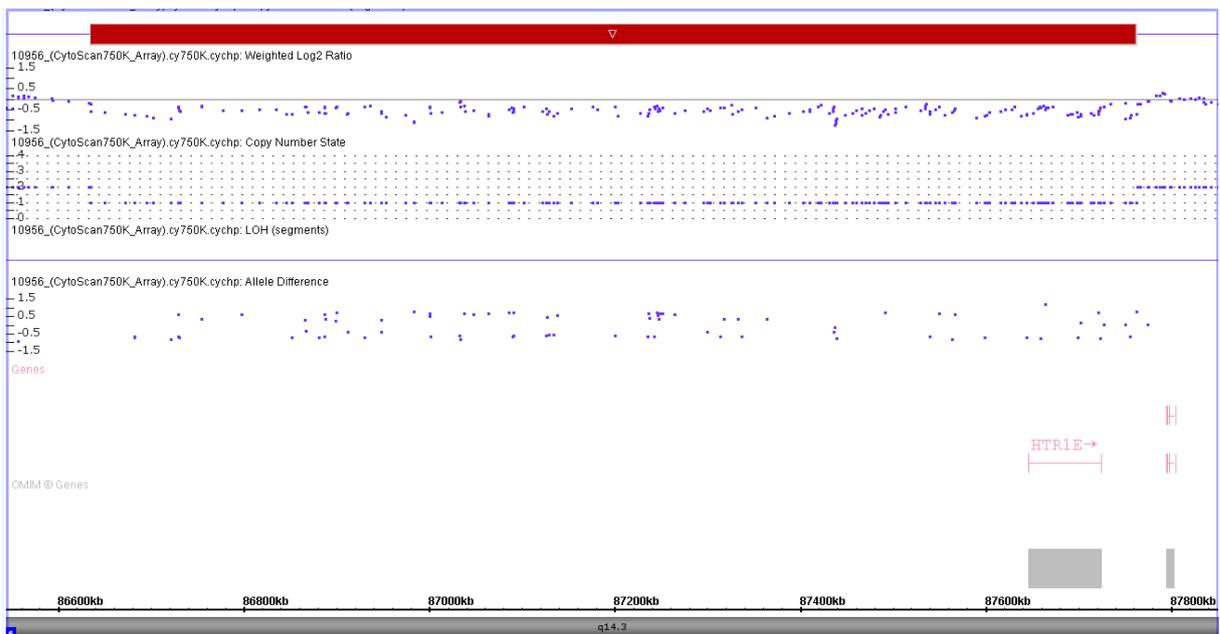


Figura 12: Deleção 6q14.3 arr[hg19]6q14.3(86,635,033-87,762,722)x1, representada pelo retângulo vermelho, identificada na paciente P6. Imagem gerada pelo *software* de análise (Chas).

Paciente 7

Paciente de 41 anos, atendida no ambulatório de genética do HUB, filha de pais não consanguíneos. Teve telarca e adrenarca aos 12 anos e aos 15 anos iniciou investigação por apresentar queixa de amenorréia primária e por cólica intensa. Foi orientada a utilizar contraceptivo hormonal por 2 anos. Aos 17 anos foi reavaliada, com diagnóstico de útero infantil.

Teve coitarca aos 18 anos, com dispareunia e sangramento. Aos 21 anos passou por nova avaliação ginecológica que identificou encurtamento do canal vaginal. Paciente teve

dilatação natural, não sendo necessário procedimento cirúrgico ou utilização de dilatadores. Ao exame físico, não apresenta dismorfias.

O USG pélvico mostrou agenesia uterina, presença de ovários bilateralmente, OD com volume de 7,3 cm³, OE com volume de 4,0 cm³, canal vaginal com aproximadamente 4,6 cm de comprimento. Possui rins tópicos, com forma, contornos, dimensões e ecotextura normais.

A análise de metáfases, obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino. A PCR para detecção do gene *SRY* foi negativa.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

Paciente 8

Paciente de 29 anos, atendida no ambulatório de genética do HUB, filha de pais não consanguíneos. Refere que aos 16 anos procurou assistência médica com queixa de amenorréia primária. O USG realizado revelou agenesia uterina e vagina de aproximadamente 0,5 cm. A paciente iniciou tratamento não cirúrgico para criação de neovagina com uso de dilatadores.

Um novo USG confirmou a agenesia uterina e presença de ovários bilateralmente. OD com volume de 5,6 cm³, OE com volume de 20 cm³ e revelou aumento do canal vaginal para aproximadamente 3,3 cm de comprimento. Possui rins tópicos, com forma, volume e contorno normais, porém possui esteatose hepática de grau II.

A RM da pelve que demonstrou lesão expansiva na região anexial esquerda, de provável natureza neoplásica, com possível componente fibroso. Nova RM foi solicitada com o objetivo de acompanhar a lesão na região anexial. Esse exame demonstrou corno uterino rudimentar na região anexial esquerda, com anatomia zonal, sinal e realce semelhante ao útero, medindo 3,5 cm com presença de tecido endometrial de 0,3 cm de espessura. Na região anexial direita, há formação uterina rudimentar menor, porém sem diferenciação zonal ou tecido endometrial.

O raioX de coluna total revelou escoliose sinistro convexa dorsal e osteofitose marginal ântero-lateral. Paciente refere exames cardíacos e auditivos normais.

Nos exames laboratoriais demonstrou: LH: 4,21 mIU/mL; FSH: 4,85 mIU/mL; prolactina: 13,40 ng/mL; estradiol: 74 pg/mL; testosterona: 36,2 ng/dL; e progesterona: 1,28 ng/mL.

No exame físico foi vista implantação estreita de cabelos na fronte, orelhas pequenas com lóbulos aderidos, arcada supraciliar proeminente, fendas palpebrais oblíquas para baixo, raiz nasal média/alta, pequena assimetria das asas do nariz (esquerda menor que direita), filtro

médio, úvula íntegra, palato alto, queixo proeminente, acantose nigricans cervical, estrias na região superior do ombro, tanto na porção anterior quanto posterior, mãos sem alterações, quintos dedos curto, coxins fetais do 3º ao 5º dedo, unhas hiperconvexas, foliculite acentuadas nas coxas, pés planos e discreta micrognatia. Possui também miopia, astigmatismo e estrabismo.

A análise de metáfases, obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino. A PCR para detecção do gene *SRY* foi negativa.

A análise cromossômica por *microarray* revelou uma duplicação de 1,404 KB em 7q11.23 arr[hg19]7q11.23(72,732,834-74,136,633)x3 que inclui ao todo 24 genes, são eles: *TRIM50*, *FKBP6*, *FZD9*, *BAZ1B*, *BCL7B*, *TBL2*, *MLXIPL*, *VPS37D*, *DNAJC30*, *WBSCR22*, *STX1A*, *CLDN3*, *CLDN4*, *WBSCR27*, *WBSCR28*, *ELN*, *LIMK1*, *EIF4H*, *LAT2*, *RFC2*, *CLIP2*, *GTF2IRD1*, *GTF2I*, *BC070376*, conforme demonstrado na figura 13.

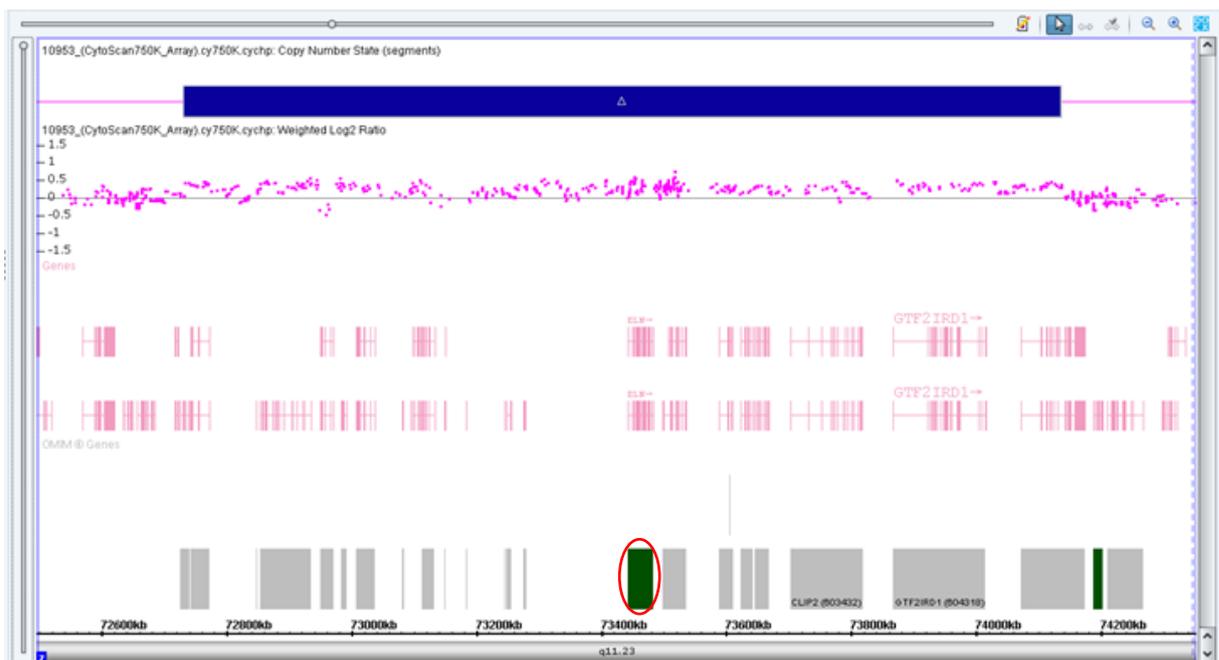


Figura 13: Duplicação 7q11.23 arr[hg19]7q11.23(72,732,834-74,136,633)x3, representada pelo retângulo azul, identificada na paciente P8. A duplicação envolve o gene da elastina, circulado em vermelho. Imagem gerada pelo *software* de análise (Chas).

Paciente 9

Paciente de 29 anos de idade, atendida no ambulatório de genética do HUB, filha de pais não consanguíneos. Aos 12 anos teve pubarca e telarca e aos 14 anos começou a ter quadros de cólicas abdominais uma vez por mês, porém apenas aos 18 anos recebeu o diagnóstico de

Síndrome de Rokitansky. Paciente relata dilatação natural, não necessitando de cirurgias ou uso de dilatadores. Ao exame físico, não apresenta dismorfias.

No USG foi constatado útero rudimentar, sem comunicação com a vagina e endométrio com espessura de 5 mm. Também foi evidenciado presença de ovários bilateralmente, OD com volume de 3,2 cm³, OE com volume de 3,6 cm³ e canal vaginal normal de aproximadamente 6,1 cm de comprimento, após a dilatação natural. Possui rins tópicos, com forma, contorno, ecotextura e dimensões normais e apresenta esteatose hepática grau I. A RM magnética realizada confirmou os achados identificados no USG.

Paciente retornou ao ambulatório de genética com queixa de dores abdominais intensas, relatando a necessidade de aplicar medicação intravenosa para cessar a dor. Foi solicitada investigação da dosagem do marcador tumoral CA-125 que apresentou resultado normal. Em seguida, a medicação para controle da dor foi suspensa e solicitado um novo USG pélvico a ser realizado no momento da dor abdominal. Novo USG revelou hematométrio com volume uterino aumentado, em relação ao último exame, e colo do útero não configurado com a vagina e quase separado do útero.

O raioX solicitado para avaliação esquelética revelou osteofitose marginal dos corpos vertebrais e redução do espaço intervertebral T11-T12. As avaliações cardíacas e auditivas não mostraram alterações.

Nos exames laboratoriais demonstrou: LH:5,72 mUI/mL; FSH: 3,59 mUI/mL; estradiol: 262pg/mL; testosterona: 51 ng/dL e progesterona: 7,12ng/mL.

A análise de metáfases, obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino. A PCR para detecção do gene *SRY* foi negativa.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

Paciente 13

Paciente de 33 anos, filha de pais não consanguíneos. Procurou ajuda médica por apresentar dor na relação sexual. Refere pubarca aos 11 anos de idade e telarca aos 12. Ao exame físico, não apresenta dismorfias.

O USG transvaginal realizado revelou agenesia uterina, presença somente de OD com volume de 3,4 cm³. Paciente refere que realizou remoção cirúrgica do OE devido à grande quantidade de cistos que promoveram sua ruptura. No USG abdominal revelou rins tópicos de

dimensões habituais e presença de cálculos na vesícula biliar. A RM confirmou agenesia uterina mostrando OD com volume de 8,5 cm³.

Nos exames laboratoriais apresentou: LH: 6,99mIU/mL; FSH: 6,21 mIU/mL; prolactina: 19,8 ng/mL e estradiol: 47pg/mL.

A análise de metáfases, obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou um cromossomo 22 com aumento no comprimento da haste e do satélite no seu braço curto. Essa alteração cromossômica é, provavelmente, variante da normalidade, não estando relacionada com o quadro clínico da paciente. O cariótipo determinado foi 46, XX, 22pstk+. A PCR para detecção do gene *SRY* foi negativa.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

Paciente 14

Paciente de 29 anos, filha de pais consanguíneos (primos em primeiro grau), procurou ajuda médica com queixa de amenorreia primária. Refere pubarca e telarca aos 11 anos de idade. Ao exame físico, não apresenta dismorfias.

O USG abdominal realizado não detectou alterações renais. A RM demonstrou agenesia uterina e presença de ovários bilateralmente. A paciente refere que ao receber diagnóstico apresentava canal vaginal de aproximadamente 1 cm de comprimento. Atualmente faz tratamento com uso de dilatadores e já atingiu comprimento de 8,5 cm.

O raioX realizado revelou discreta escoliose sinistro côncavo. Paciente refere audiometria sem alterações

Nos exames laboratoriais apresentou: LH: 9,93 mUI/mL; FSH: 4,2 mUI/mL; estradiol: 152,50 pg/mL; testosterona: 0,34 ng/mL e progesterona: 13,62 ng/mL;

A análise de metáfases, obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino. A PCR para detecção do gene *SRY* foi negativa.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

12.3 Descrição da paciente com anomalia mülleriana

Paciente 11

Paciente de 32 anos, atendida no ambulatório de genética do HUB, filha de pais não consanguíneos. Relata pubarca, telarca e menarca aos 11 anos de idade. Aos 21 anos de idade procurou ajuda médica por queixa de dispareunia e impossibilidade de penetração na relação sexual. Refere incontinência urinária e infecção de repetição. Ao exame físico, não apresenta dismorfias.

O USG revelou presença de útero com volume normal e presença de ovários bilateralmente. OD com volume de 13,5 cm³, OE com volume de 10,6 cm³ e vagina curta de aproximadamente 3,9 cm. Esse exame também demonstrou agenesia uretral com presença de seio urogenital não septado com o colo do útero localizado posteriormente à abertura da bexiga e vagina. Possui rins tópicos com forma, contornos e ecotextura habitual com discreta dilatação pielocalicial à direita.

A RM confirmou a presença de ovários bilateralmente e mostrou a presença de útero septado, com dimensões e contornos normais (figura 14). O miométrio possui textura homogênea e intensidade de sinal normal, sem lesões focais. Neste mesmo exame, foi detectado vagina de 5 cm de comprimento, e presença de uretra (figura 15). Contudo, não foi possível fazer avaliação mais precisa dessa região pois a paciente recusou a utilização do gel vaginal.

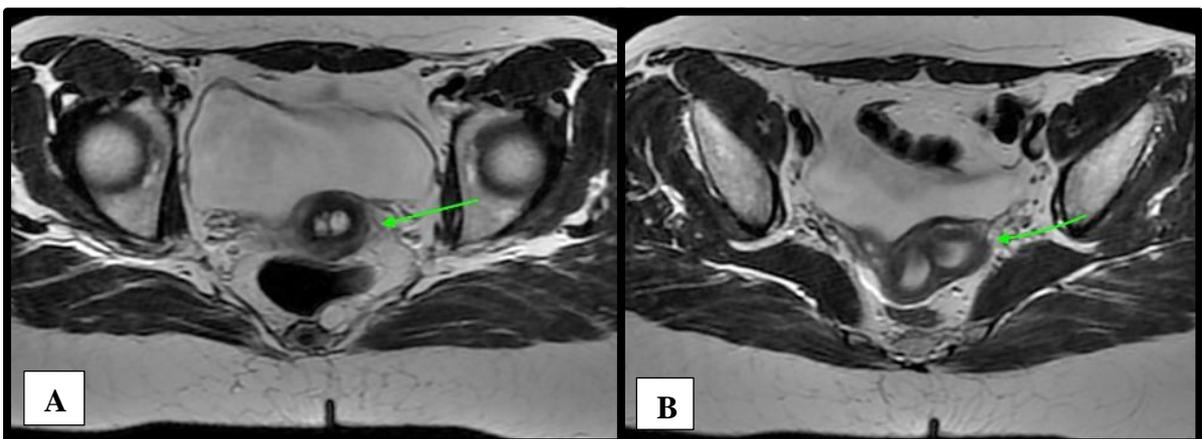


Figura 14: Imagem de RM da paciente P11, no plano axial, ponderada em T2. (A) Septação uterina em T2, sugerindo componente fibrótico, no colo uterino (seta) e (B) septação em T2, sugerindo componente fibrótico, no fundo e corpo uterino (seta).



Figura 15: Imagem de RM da paciente P11 no plano sagital, ponderada em T2. Seta fina indica sítio da uretra proximal e seta grossa indica o terço superior da vagina.

Nos exames laboratoriais apresentou: LH: 3,52 mIU/mL; FSH: 3,33 mIU/mL; prolactina: 17,73 ng/mL; estradiol: 90,12 pg/mL; testosterona total: <2,50 ng/dL e progesterona: 19,95 ng/mL.

A análise de metáfases, obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino. A PCR para detecção do gene *SRY* foi negativa.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

12.4 Descrição da paciente com distúrbio de diferenciação sexual

Paciente 12

Paciente de 29 anos, atendida no ambulatório de genética do HUB, filha de pais não consanguíneos. Aos 14 anos procurou ajuda médica por apresentar amenorreia primária e foi detectada ausência de útero e ovários. Refere que entre 14/15 anos de idade começou o desenvolvimento de seios, porém apresenta pouquíssimos pelos no corpo. Paciente relata que possui diversos casos na família de mulheres com queixa de amenorreia primária, conforme pode ser visto no heredograma (figura 16).

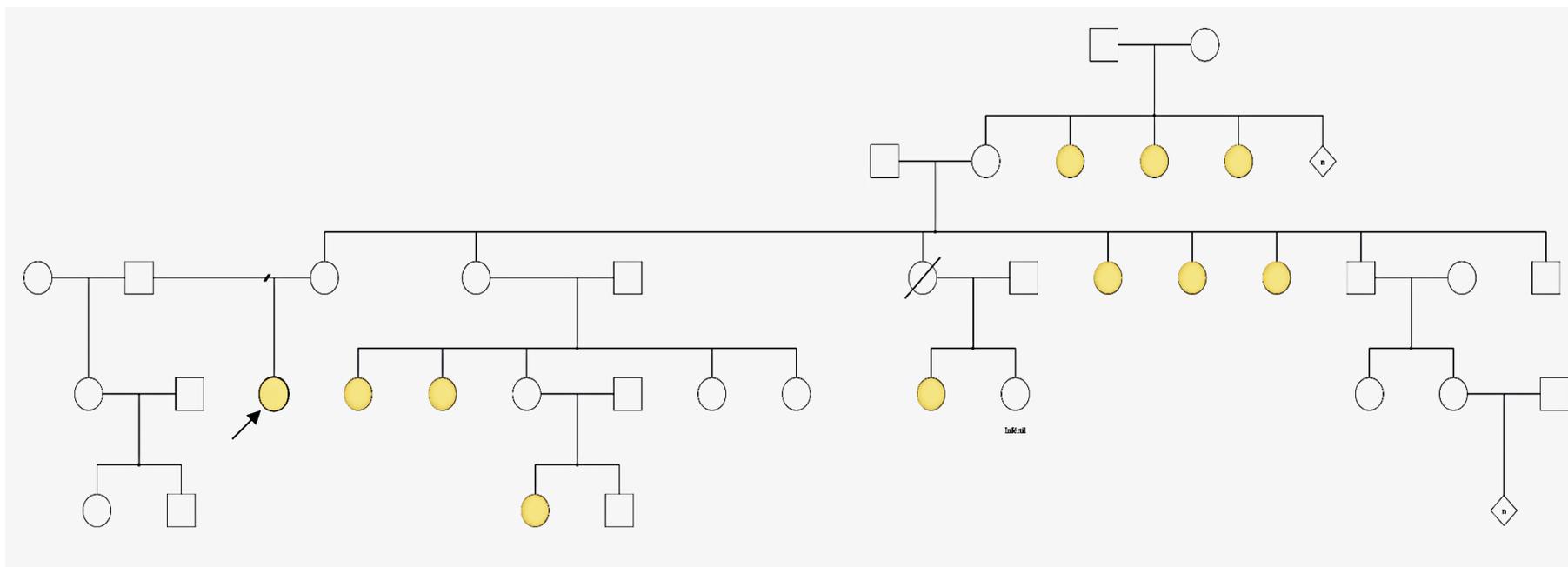


Figura 16: Heredograma da paciente P12. É possível identificar a presença de 11 mulheres que possuem queixa de amenorreia primária.

Em consulta, relatou que nunca fez uso de hormônios e que aos 6 meses de idade realizou retirada de hérnia localizada na região inguinal. Paciente possui 1,74 cm de altura e obesidade (129 kg). Ao exame físico, não apresenta dismorfias.

O USG realizado revelou agenesia uterina, com presença de ovários bilateralmente. OD com volume de 3,31 cm³, OE com volume de 4,81 cm³ e canal vagina de aproximadamente 9,5 cm de comprimento. Nota-se adjacente ao ovário direito, cisto anecóico com volume de 9,1 cm³. Possui rins com forma, contornos e ecotextura habitual.

A RM confirmou agenesia uterina, presença de canal vaginal (figura 17) e ovários normais, notando-se cistos com características funcionais à direita, com 3,3 cm (figura 18).



Figura 17: Imagem de RM no plano sagital da paciente P12, ponderada em T2. A estrela indica local de agenesia uterina, seta fina indica interposição do cólon sigmóide na loja uterina. Seta grossa, indica terço superior da vagina presente.

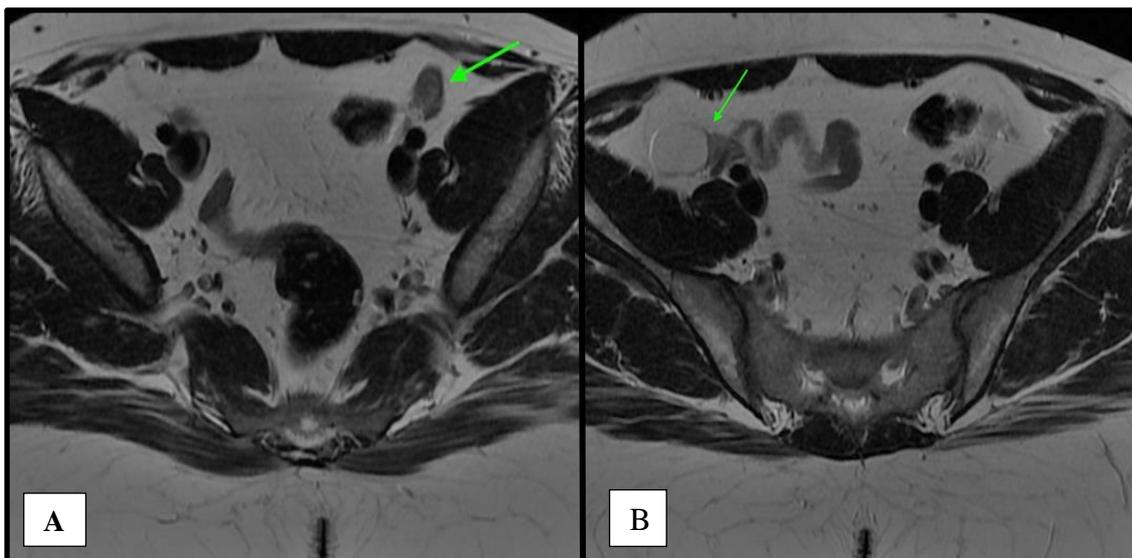


Figura 18: Imagem de RM no plano axial da paciente P12, ponderada em T2. (A) seta grossa indica gônada ovalar na região inguinal esquerda e (B) seta fina indica gônada ovalar na região inguinal direita, com cisto adjacente, que pode indicar ovário com cisto funcional associado.

Nos exames laboratoriais apresentou: LH: 12,27 mIU/mL; FSH: 7,61 mIU/mL; estradiol: 43,53pg/mL; testosterona total: 307,1 ng/dL e progesterona: 0,648 ng/mL. Teste de tolerância oral a glicose: glicemia basal: 112mg/dL; glicemia após 120 minutos: 161 mg/dL e hemoglobina glicada: 4,7%.

A análise de metáfases, obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XY, normal. A PCR para detecção do gene *SRY* foi positiva.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

12.5 Descrição das pacientes sem diagnóstico definido

Paciente 4

Paciente de 22 anos de idade, atendida no ambulatório de genética do HUB, filha de pais não consanguíneos. Iniciou investigação para linfadenopatia, pois apresenta aumento de volume dos gânglios linfáticos e teve vários episódios de parotidite epidêmica.

Aos 17 anos procurou ajuda médica por apresentar amenorréia primária e ausência de telarca, sendo submetida à mamoplastia. No exame ginecológico foi constatado genitália externa sem alterações com presença de canal vaginal de aproximadamente 2 cm. Ao exame físico, não apresenta distorções.

O USG revelou útero rudimentar em ante-versão, presença de ovários bilateralmente, OD com volume de 8,7 cm³ e OE com volume de 6,5 cm³. Relata que foi submetida a cirurgia para rompimento do hímen, sem sucesso.

Em tomografia, foi visualizado rins tópicos com dimensões e contornos preservados e presença de microcálculo de 2 mm no grupamento calicilar inferior do RD e pequeno nódulo de 3 mm na adrenal esquerda, sugestivo de adenoma.

O raioX demonstrou hipoplasia de disco intervertebral de L5-S1. No exame cardíaco houve o registro de 2 extrassístoles isoladas. A avaliação audiológica demonstrou emissões otoacústicas transientes em ambas as orelhas, sugestivo de rebaixamento na função coclear bilateral.

Nos exames laboratoriais apresentou: LH: 22,18 mIU/mL; FSH: 7,4 mIU/ml; prolactina: 7,7 ng/ml; estradiol: 225,5 pg/mL; testosterona total: 73,8. Paciente refere episódios constantes de hipoglicemia com dosagem do hormônio de crescimento (GH): 0,17 ng/mL;

A análise de metáfases, obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino. A PCR para detecção do gene *SRY* foi negativa.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

Paciente 10

Paciente de 12 anos de idade, atendida no ambulatório de genética do HUB, filha de pais não consanguíneos. Procurou endocrinologista por queixa de amenorréia primária e ganho de peso (10kg em 1 ano).

O USG pélvico realizado revelou agenesia uterina e ovariana. A RM constatou agenesia renal esquerda e de adrenal esquerda, não sendo possível a avaliação da vagina, já que ela não se encontra distendida.

O raioX revelou 11 vertebrae com configuração torácica, desvio do eixo vertebral a direita e acentuação da cifose torácica. Também mostrou costelas cervicais rudimentares bilaterais e redução dos espaços intervertebrais em C3-C4, C5-C6 e L5-S1. Exame cardíacos e auditivos não apresentaram alterações.

No exame físico foi visto orelhas com desdobramento de hélice, hipoplasia de lóbulos, coloboma de retina, pescoço curto, tórax em escudo, abdômen plano, frouxidão ligamentar de pequenas articulações, genitália feminina infantil, hipoplasia de lábios menores e encurtamento de 4º e 5º raios de mãos e pés.

Nos exames laboratoriais apresentou: LH < 0,07; FSH: < 0,3; prolactina: 5,7ng/mL; estradiol: 19,5; testosterona: 39,3ng/dL, progesterona: 0,5ng/mL; GH: <0,05ng/mL, além da presença de microcitose, leucocitose, eosinofilia leves.

A análise de metáfases, obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais, em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino. A PCR para detecção do gene *SRY* foi negativa.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

13. DISCUSSÃO

Apesar da MRKH não possuir etiologia definida, a publicação de estudos que relatam a presença da doença em mais de um membro da mesma família sugerem um possível componente genético responsável pela sua ocorrência (WILLIAMS, et al., 2016). A investigação genética para a síndrome deve ser iniciada com a realização do cariótipo, metodologia importante para o diagnóstico diferencial da MRKH, que possui resolução inferior (4Mb a 10 Mb) quando comparado a técnica de citogenética molecular.

Alterações no número de cópias (CNVs) são importantes para a variabilidade genética e podem ser herdadas ou ocorrer *de novo* (THAPAR; COOPER, 2013). No entanto, sabe-se que essas alterações estruturais podem ser patogênicas, possuindo papel significativo em diversas patologias (ZARREI, et al., 2015). Por esse motivo, o CMA foi realizado nas pacientes participantes do estudo na tentativa de encontrar alterações submicroscópicas que não são possíveis de ser identificadas através da técnica de citogenética clássica e que podem estar associadas ao quadro clínico apresentado. Dentre as 14 pacientes avaliadas neste trabalho, somente duas apresentaram resultado de CMA alterado. A técnica de PCR para detecção do gene *SRY* também foi realizada em todas as pacientes para afastar a possibilidade de translocação desse gene, considerado iniciador da cascata de ativação da via masculina de desenvolvimento.

13.1 Pacientes com MRKH

Os dados apresentados na literatura sugerem que a forma mais prevalente da síndrome, seja a MRKH II (WILLIAMS, et al., 2017). Os dados obtidos em nosso estudo vão ao encontro do que é descrito na literatura, sendo 20% das pacientes diagnosticadas com MRKH I e 80% com MRKH II. As alterações esqueléticas foram as mais frequentes, encontradas em 6 pacientes, seguida das alterações cardíacas, encontradas em 2 pacientes. As demais alterações, renais e auditivas, tiveram frequências iguais. Esses resultados são divergentes à literatura, que apresenta as alterações renais como as mais encontradas em pacientes com a síndrome. Esses dados divergentes podem se dever ao número relativamente pequeno de participantes neste trabalho.

Dentre as 10 pacientes avaliadas nesse estudo e diagnosticadas com MRKH, 8 (80%) apresentaram resultado de CMA normal. A ausência de microduplicações e microdeleções nessas pacientes sugere que outros aspectos genéticos possam estar ligados a patogênese da doença. É possível que outras alterações não identificáveis pela da técnica de CMA estejam relacionadas ao quadro de MRKH, como mutações de ponto, translocações balanceadas,

inversões. Não se pode ainda, descartar que modificações na cromatina e DNA, que atuam diretamente nos processos de expressão gênica, estejam relacionadas a alguns casos (LAYMAN, 2014). Maniglio, Ricciardi e Laganà (2016) levantaram a hipótese que alterações epigenéticas durante o desenvolvimento do trato reprodutor feminino podem afetar a organogênese. Em adição, um estudo publicado em 2011 identificou dois genes (*WT1* e *GATA4*) hipometilados em pacientes com MRKH quando comparado ao grupo controle (RALL, et al., 2011).

Em duas de nossas pacientes diagnosticadas com MRKH (20%), foram identificadas alterações submicroscópicas nas seguintes regiões genômicas: 6q14.3 e 7q11.23, nas pacientes P6 e P8, respectivamente. Em nossa revisão de literatura, não foram encontrados estudos que apontassem tais alterações cromossômicas em pacientes com MRKH. Estudos publicados anteriormente demonstram que a identificação de CNVs em pacientes com MRKH, é relativamente baixa, dados que vão ao encontro do que foi observado neste estudo. Nik-Zainal e colaboradores (2011) investigaram 63 portadoras da síndrome e encontraram deleções em 14% delas. No mesmo ano, Morcel, et al., também identificaram alterações em 7% das participantes do estudo. Posteriormente, Sandbacka, et al., 2013, identificaram CNVs em 16% das portadoras de MRKH.

A paciente P6, possui um quadro grave apresentando além das alterações uterovaginais, renais e esqueléticas, complicações vasculares que incluem estenose na artéria vertebral direita, dissecação da artéria vertebral esquerda com presença de trombose e aneurisma da artéria renal. Estenose da veia cava inferior e trombose venosa pélvica foi descrita em uma paciente de 19 anos, porém autores acreditam que a estenose encontrada não esteja relacionada ao quadro de MRKH (LONDRA, et al., 2014).

Com a realização da técnica de CMA na paciente P6, foi constatado a deleção 6q14.3 de 1.1 Mb que engloba um único gene - *HTR1E* (5-Hydroxytryptamine receptor 1E, OMIM-182132) que até o momento não possui correlação com o quadro de MRKH sendo improvável sua associação à patogênese da doença. Esse gene atua em aspectos relacionados à cognição e comportamento sendo altamente expresso no córtex frontal, hipocampo e bulbo olfatório atuando também na regulação da memória (KLEIN, et al., 2011; McALLISTER, et al., 1992).

Já a paciente P8 possui uma duplicação do segmento 7q11.23. A deleção dessa região causa a Síndrome de Williams (SW). Essa síndrome é considerada uma síndrome de genes contíguos que engloba entre 26 e 28 genes, apresentando uma deleção de aproximadamente 1,5Mb (POBER, 2010). Já a duplicação da mesma região é a causa da síndrome de

microduplicação descrita por Somerville e colaboradores em 2005, tendo sua incidência estimada em 1/7500 nascidos vivos (VELLEMAN; MERVIS, 2011).

A síndrome de microduplicação 7q11.23 é caracterizada por atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, anomalias renais, alterações cardiovasculares, anormalidades neurológicas, atraso no desenvolvimento da fala e anormalidades do crescimento, como a macrocefalia. Os afetados também podem apresentar comportamento autista, agressividade, ansiedade e pré-disposição ao desenvolvimento de esquizofrenia (MERVIS, et al, 2015; PATIL, et al., 2015).

O fenótipo facial inclui: sobrancelhas retas, testa ampla, filtro curto, lábio superior fino, nariz largo e com alta implantação e anomalias de orelha (PARROTT, et al., 2014). A paciente apresentada nesse estudo possui duplicação de tamanho típico e não apresenta alterações cardiovasculares, renais e comprometimento intelectual que são comumente descritas na síndrome de microduplicação 7q11.23. Contudo, algumas características físicas como a macrocefalia, nariz largo e anomalias de orelha podem ser notadas na paciente.

A microduplicação 7q11.23 foi descrita em dois casos que possuem relação fenotípica ao quadro observado na paciente P8. Essa microduplicação foi associada a malformações como agenesia renal unilateral, agenesia mülleriana e presença de 11 costelas em um feto do sexo feminino na 40ª semana de gestação. Em adição a duplicação 7q, essa paciente possui deleção de 10Kb no cromossomo Xq28. Malformações como ventriculomegalia, agenesia renal esquerda e útero didelfo foram descritas em um feto do sexo feminino na 39ª semana de gestação portador da microdeleção 7q11.23. Nesse estudo foram encontradas alterações renais em 18% dos pacientes avaliados. Autores sugerem que mulheres com malformação ou agenesia renal tenham as estruturas müllerianas avaliadas (MORRIS, et al., 2015).

Em 2014, Zarate e colaboradores reportaram em seu estudo 5 pacientes com duplicação 7q11.23 de tamanhos variados. Um desses casos é de um paciente, do sexo masculino, que possui a duplicação de 1.8 Mb e apresenta alterações geniturinárias como agenesia renal unilateral e agenesia gonadal esquerda. A mãe desse paciente também apresenta alterações como agenesia renal unilateral esquerda, agenesia ovariana esquerda e da tuba uterina esquerda.

A paciente do nosso estudo apresenta alterações do sistema genital que são compatíveis com o quadro de MRKH. Em adição, seu fenótipo facial se assemelha ao de pacientes com a síndrome de microduplicação 7q.

Algumas regiões tais como 1q21.1, 16p11.2, 17q12 e 22q11.21 são encontradas alteradas na frequência de 1 a 6% quando analisadas por *Microarray* em pacientes com MRKH. Contudo,

somente são encontradas microduplicações e microdeleções em cerca de 10% dos pacientes avaliados por array CGH portadores de MRKH (LEDIG; WIEACKER, 2018).

Para a realização de um diagnóstico definitivo de MRKH são necessárias diversas avaliações. Por esse motivo, propomos um fluxograma de avaliação do quadro apresentado por mulheres afetadas pela síndrome, assim como o diagnóstico e classificação de MRKH, que inclui as avaliações complementares dos possíveis sistemas afetados pela síndrome (figura 19).

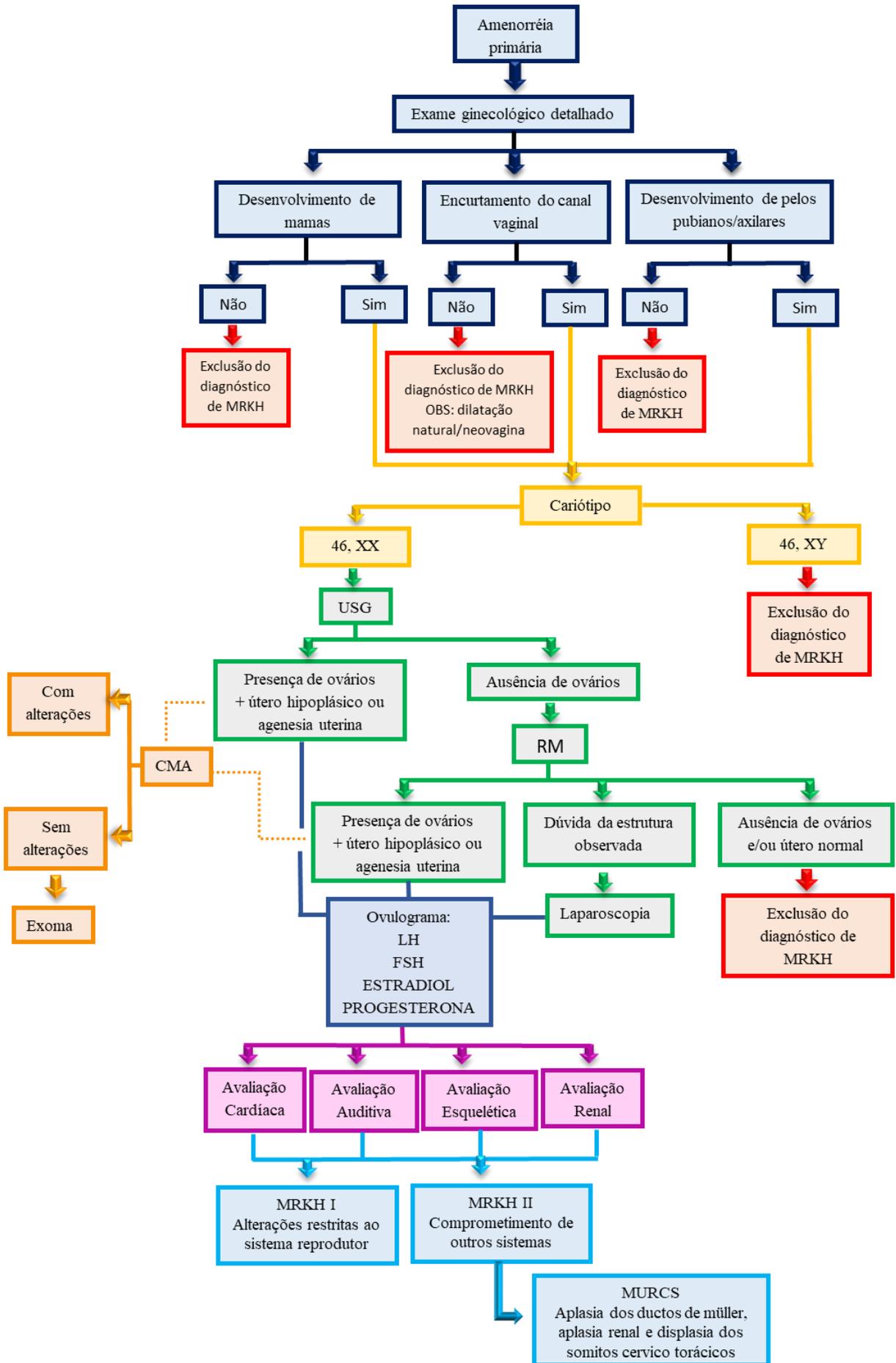


Figura 19: Proposta de fluxograma composto por exames genéticos, hormonais e de imagem para a avaliação, diagnóstico e classificação de MRKH.

13.2 Paciente com anomalia mülleriana

A paciente P11 foi incluída no estudo por apresentar agenesia vaginal, desenvolvimento de mamas e pelos pubianos e axilares. Porém, uma vez realizados os exames de imagem, esta paciente foi reclassificada em outra categoria de anomalia mülleriana. O CMA e a PCR para *SRY* da paciente mostraram resultado normal.

Durante o desenvolvimento embrionário, a porção caudal dos ductos de Müller darão origem ao útero, tubas uterinas, cérvix e a porção superior do canal vaginal (GERVASINI, 2010). As malformações uterinas, que são decorrentes da fusão incorreta desses ductos durante o período intra-embrionário, são divididas em VII classes segundo a Sociedade Americana de Fertilidade (*American Fertility Society*, AFS), sendo que o desenvolvimento do útero septado representa 35%-55% dessas alterações e se enquadra na classe de alterações não degenerativas (ROBBINS, et al., 2014; LOUDEN, et al., 2015).

Com a fusão dos ductos de Müller, ocorre a formação de um septo que une as duas cavidades recém-formadas e que, posteriormente, deverá ser reabsorvido (ANTUNES, 2016). Através da RM realizada em P11, foi possível identificar a presença de útero septado, sendo decorrente da falha na absorção do septo uterino. Em contradição ao que foi observado no USG, a RM visualizou a presença de canal uretral, mas o estudo detalhado do períneo ficou prejudicado devido a recusa do uso do gel pela paciente. Dessa maneira, não foi possível avaliar se o canal vaginal não possui alterações ou se apresenta algum grau de estenose, o que explicaria a queixa de dispareunia.

Segundo a análise radiológica, o quadro apresentado pela paciente P11 parece ser similar ao representado na figura 20C ou 20D. Portanto, além da malformação uterina, a paciente também apresenta malformação da uretra. Defeito no desenvolvimento dessa estrutura está relacionada à falha no desenvolvimento do seio urogenital, que é originado, no embrião, a partir da divisão da cloaca em reto e seio urogenital, por meio do crescimento do septo urorretal (VIEIRA, et al., 2011; CARLSON, 2014).

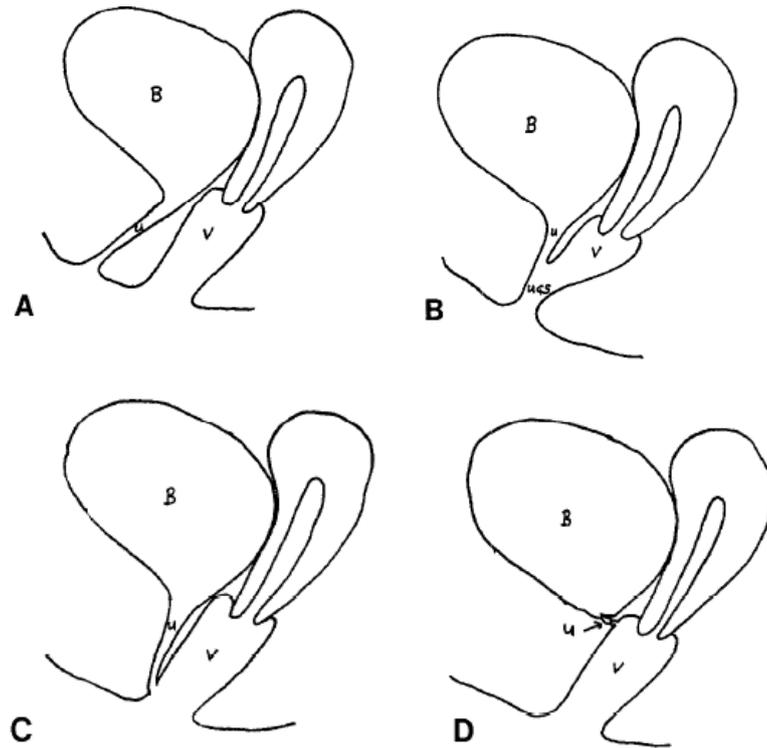


Figura 20: Representação do trato genitourinário feminino normal e alterado. Desenvolvimento normal (A); Seio urogenital (B); Hipospádia distal (C); Hipospádia proximal (D). Vagina (V), bexiga (B), uretra (U), seio urogenital (UGS). Foto de: Knight; Mouriquand., 1995.

Em consequência à malformação da uretra, foi observada incontinência urinária associada à infecção urinária de repetição. Esses achados não são compatíveis com o diagnóstico de MRKH, contudo existe malformação mülleriana. As malformações dos ductos de müller acometem cerca de 0,1 a 3% das mulheres e possui etiologia desconhecida (CHOUDHARY, VERMA, CHOUDHARY, 2011).

A etiologia exata das malformações müllerianas ainda é obscura. 92% das mulheres diagnosticadas com essa condição possuem o cariótipo sem alterações. Em adição, ainda não foi identificada alteração genética específica que possa desencadear o fenótipo observado (ANTUNES, 2016). Apesar da técnica de CMA não ter encontrado alterações que possam justificar o quadro observado em P11, não se pode excluir a possibilidade de alterações gênicas que podem ser identificadas em outras técnicas como sequenciamento de exoma.

13.3 Paciente com distúrbio de diferenciação sexual

A paciente P12 foi diagnosticada clinicamente com MRKH. Porém, o resultado do cariótipo 46, XY, a torna incompatível com os critérios para MRKH.

Apesar do cariótipo 46, XY, a paciente apresenta um fenótipo feminino, com desenvolvimento de mamas e genitália sem alterações. Essa discrepância entre o sexo genético, anatômico e gonadal, é conhecida como distúrbio de diferenciação sexual (DDS) (BURGMEIER; LERICHE, 2016). As DDSs possuem incidência estimada de 1:4500 a 1:5000 e podem ser classificadas em três grupos: (1) 46, XX DDS; (2) 46, XY DDS, que inclui doenças como disgenesia gonadal e síndrome da insensibilidade androgênica; e (3) DDS sexo cromossômico, sendo a síndrome de Turner (45, X) e de Klinefelter (46, XXY) pertencentes a esse grupo (WALIA, et al., 2018; MANNAERTS, et al., 2015). Portanto, após a exclusão do diagnóstico de MRKH juntamente com os achados clínicos observados, classificamos a paciente P12 como pertencente ao grupo 46, XY DDS.

Como é possível observar na tabela 4, não houve alterações no CMA, que é compatível com o genótipo um indivíduo do sexo masculino devido à presença do cromossomo Y. Adicionalmente, a PCR para detecção do gene *SRY* foi positiva (figura 11). A ausência de microdeleções e microduplicações no CMA não excluem a possibilidade de mutações no gene *SRY*, considerado iniciador da cascata de ativação do desenvolvimento masculino, ou de outros genes que atuem nessa via. Mutações de genes responsáveis pelo desenvolvimento masculino poderiam explicar o fenótipo apresentado, porém deve ser confirmado através de técnicas como sequenciamento ou exoma.

O heredograma, montado com base na história clínica familiar da paciente, permitiu a identificação de 11 mulheres com queixa de amenorreia primária. Apesar de não ter sido possível a avaliação destas, acredita-se que apresentem quadro similar ao encontrado em P12.

Com base nesta informação, existem duas hipóteses quanto a segregação do fenótipo:

- 1) Ocorrência de alteração dominante em autossomo que atue na mesma via, porém *upstream* ao gene *SRY*, que seja capaz de comprometer a função de *SRY* quando herdado em conjunto com o cromossomo Y. Dessa maneira, ocorreria o desenvolvimento fenotípico e gonadal feminino visto em P12. Em contrapartida, a paciente apresenta perfil hormonal sem alterações exceto pela presença elevada de testosterona (307,1 ng/dL) o que não poderia ser explicado com a presença bilateral de ovários, conforme encontrado no USG e RM.
- 2) Não se deve descartar a possibilidade de diagnóstico de Síndrome da Insensibilidade Androgênica (AIS). Essa condição é considerada a patologia mais frequente dentre alterações encontradas no grupo 46,XY DDS e é caracterizada por alteração na função do receptor androgênico (AR) (TADOKORO-CUCCARO; HUGHES, 2014).

A AIS possui três formas de apresentação: (1) Síndrome da Insensibilidade Androgênica Completa (CAIS), (2) Síndrome da Insensibilidade Androgênica Parcial (PAIS) e (3) Síndrome da Insensibilidade Androgênica Leve (MAIS) (WALIA, et al., 2018). O fenótipo encontrado em pacientes que são diagnosticados com AIS é bastante amplo, pois depende do nível de disfunção do AR. Usualmente, o fenótipo clínico encontrado na CAIS é caracterizado por fenótipo feminino, presença de amenorreia primária com desenvolvimento de seios, ausência de útero, testosterona elevada e poucos pelos no corpo ou pelos ausentes (MONGAN, et al., 2015). Esse quadro é compatível ao observado em P12.

A CAIS possui herança recessiva ligada ao X, dado que explicaria o heredograma familiar da paciente participante do estudo. Porém, não foi encontrado, em exames de imagem, a presença de testículos, o que impossibilitaria o diagnóstico de CAIS. A RM é considerada uma técnica com sensibilidade elevada para avaliação das gônadas e estruturas internas (ROTHKOPF; JOHN, 2014; ALJURAYYAN, 2013), porém existe a necessidade de exames de imagem serem realizados por um profissional especializado (MENDONCA, 2014). Adicionalmente, para a identificação de algumas alterações, o exame deve ser realizado com parâmetros diferenciados, o que não ocorre na rede pública e privada. Além disso, o resultado do USG depende da qualidade e resolução do equipamento utilizado assim como na experiência do profissional que está realizando a técnica. (BATRAWY, et al., 2013).

Dessa maneira, exames adicionais, como a laparoscopia, são necessários a fim de sanar as dúvidas com relação a natureza da gônada. Caso seja confirmada a presença de testículos, o sequenciamento do gene responsável pela codificação do receptor androgênico pode ser realizado na tentativa de encontrar mutações que possam levar alteração na função deste receptor.

13.4 Pacientes sem diagnóstico determinado

Neste estudo, duas participantes (P4 e P10) tiveram diagnóstico clínico inconclusivo. O CMA de ambas não mostrou alterações assim como a PCR para identificação do gene *SRY* foi negativa.

P4 possui ausência de tecido mamário, mas desenvolvimento normal de pelos pubianos e axilares. A paciente possui útero rudimentar e agenesia de canal vaginal, entretanto, a ausência de telarca exclui o diagnóstico de MRKH. Diante dos achados observados em P4, uma hipótese plausível para explicar o quadro clínico seria a resistência a estrógeno devido a uma mutação no receptor desse hormônio.

Sabe-se que apesar dos tecidos do sistema reprodutor feminino serem alvos da ação do estrogênio, esse hormônio não é necessário na vida intra-embriônica (COUSE; KORACH., 1999). No entanto, o estradiol é responsável por influenciar o desenvolvimento de mamas, que ocorre na adolescência (QUAYNOR, et al., 2013).

A ação estrogênica no organismo é viabilizada através de dois receptores ($ER\alpha$ e $ER\beta$). Esses receptores são codificados por genes diferentes, *ESR1* e *ESR2*, localizados nos cromossomos 6q25.1 e 14q23.2, respectivamente. Enquanto a expressão de $ER\alpha$ está presente no útero, ovário, mamas, rins e fígado, a de $ER\beta$ se encontra, dentre outros tecidos, nos ovários, sistema nervoso central e órgãos reprodutivos masculinos (MATTOS, et al., 2014; JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015).

Em 2013, Asadi e colaboradores descreveram o primeiro relato de mutação no gene responsável pela codificação de $ER\beta$. A paciente desse estudo, que procurou ajuda médica com queixa de amenorreia primária, apresentava características como genitália externa sem alterações, útero hipoplásico e ovários císticos. Neste mesmo ano, foi publicado outro estudo que relatou a presença de resistência a estrogênio em paciente com cariótipo 46, XX, amenorreia primária, dor abdominal intermitente, útero hipoplásico, ovários císticos e ausência de desenvolvimento mamário (QUAYNOR, et al., 2013).

Posteriormente, em 2014, Hamilton e colaboradores utilizaram camundongos nocautes para $ER\alpha$ e para $ER\beta$. Esses animais apresentaram útero hipoplásico, estradiol elevado, testosterona elevada e desenvolvimento de mamas prejudicado. Enquanto que os camundongos que possuíam alteração no $ER\beta$, apresentaram desenvolvimento normal de útero, alterações na resposta ovulatória e desenvolvimento normal de tecido mamário.

Como agravante, P4 iniciou quadro de hipoglicemia sendo sugerido o diagnóstico de deficiência de GH. Essa condição pode ter origem hipotalâmica, hipofisária ou hipotalâmica e hipofisária sendo considerada um acontecimento raro em adultos, com incidência aproximada de 1/100.000 (JALLAD; BRONSTEIN, 2008). Além da influência do estrogênio no desenvolvimento mamário, ele também atua no mecanismo de feedback do eixo hipotalâmico-hipofisário. Dessa maneira, esse hormônio é considerado importante regulador da produção de GH, já que seus receptores são expressos tanto no hipotálamo quanto na hipófise. $ER\alpha$ e $ER\beta$ foram identificados como importantes no processo de controle transcricional de GH nos somatotrofos (AVTANSKI, et al., 2014).

As características observadas nos pacientes descritos na literatura juntamente com os achados encontrados em animais nocautes para $ER\alpha$ e $ER\beta$ sugerem a presença de resistência estrogênica em P4, visto que muitas das alterações descritas também foram identificadas nessa

paciente. Contudo, estudos mais específicos precisam ser conduzidos na tentativa de elucidar essa hipótese.

A paciente P10 apresenta um quadro que engloba diversas alterações e dismorfias. Todavia, o CMA não identificou alterações que possam justificar o fenótipo apresentado.

Dentre as características presentes nessa paciente, foi observado coloboma de retina, anomalias de orelha, pescoço curto, genitália infantil e hipoplasia de lábios menores. Segundo Hsu e colaboradores (2014), o diagnóstico de Síndrome CHARGE (SC) deve ser considerado quando o paciente apresentar um dos seguintes critérios: coloboma de retina, atresia de coana ou canal semicircular hipoplásico.

A SC, é um acrônimo que significa: coloboma de retina (C), defeitos cardíacos (H), atresia de coana (A), atraso no desenvolvimento (R), hipoplasia genital (G) e anomalias de orelha e surdez (E) (LEGENDRE, et al., 2017). Os critérios para o diagnóstico dessa síndrome foram atualizados por Verloes em 2005, que dividiu em três classificações possíveis: (1) CHARGE típica; (2) CHARGE parcial e (3) CHARGE atípica. Posteriormente, Hale, et al., 2016 propôs uma nova atualização dos critérios para o diagnóstico de SC.

Tomando como base os critérios atualizados propostos por Hale, et al., 2016, observa-se que a paciente P10 possui 2 critérios maiores que incluem coloboma e malformação de orelha externa, porém não se sabe se P10 possui hipoplasia de canal semicircular. Em adição, a paciente também apresenta 3 critérios menores que incluem deficiência intelectual, disfunção hipotálamo-hipofisária, anomalias genitais e anomalias renais/esqueléticas.

O fenótipo da SC é usualmente proveniente de mutações no gene *CHD7*, localizado no cromossomo 8q12. Mutações nesse gene estão presentes em 90% dos pacientes, sendo considerada, na maioria dos casos, mutação autossômica dominante *de novo*. Contudo, já foram reportados na literatura casos decorrentes de translocações e rearranjos cromossômicos que envolvam *CHD7* (BLAKE; PRASAD, 2006; HSU, et al., 2014). Esse gene faz parte da família de helicases com cromodomínio de ligação ao DNA (CHD), que possui papel importante no remodelamento da cromatina, afetando diretamente a transcrição (TRIDER, et al., 2017; CLONEY, et al., 2018).

Diante dos achados observados em P10, a hipótese de SC deve ser considerada, sendo o sequenciamento do gene *CHD7* o próximo passo para um diagnóstico genético. Caso negativo, a realização de testes genéticos adicionais como exoma se torna imprescindível para conclusão diagnóstica.

14. CONCLUSÃO

- 28,5% das pacientes que foram incluídas neste estudo com diagnóstico clínico de MRKH, não tinham a síndrome;
- Dentre as 14 pacientes avaliadas nesse estudo, 10 tiveram diagnóstico clínico confirmado de MRKH. Dentre elas 20% foram classificadas com MRKH I, 70% com MRKH II e 10% com MURCS;
- Em duas pacientes foram encontradas alterações pela técnica de *microarray* que não seriam possíveis de ser identificadas através do cariótipo convencional;
- As alterações mais frequentes encontradas nas pacientes diagnosticadas com MRKH foram as esqueléticas, representando 60% das alterações observadas.
- Esse estudo permitiu a avaliação do conjunto de sinais clínicos observados nas pacientes a partir da solicitação de exames complementares necessários para uma investigação completa dos quadros apresentados.
- Para o correto diagnóstico e classificação da MRKH devem ser realizados testes genéticos, hormonais e exames de imagem, conforme sugerido no fluxograma aqui apresentado (figura 19);
- Para o manejo das pacientes com MRKH, é necessária uma equipe multidisciplinar, formada por geneticistas, endocrinologistas, ginecologistas e radiologistas.

15. REFERÊNCIAS

- ABRAMOWICZ, S.; ODEN, S.; JOUTEL, N.; ROMAN, H.; GROMEZ, A.; MARPEAU, L. Plástie vaginale par technique de vecchietti coelioscopique: résultats anatomiques et fonctionnels. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**. v. 41, n. 1, p. 4-9, jan. 2013.
- ALANKARAGE, D.; LAVERY, R.; SVINGEN, T.; KELLY, S.; LUDBROOK, L.; BAGHERI-FAM, S.; KOOPMAN, P.; HARLEY, V.; Sox9 regulates expression of male fertility gene Ets variant factor 5 (ETV5) during mammalian sex development. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 9, p. 41-51, ago. 2016.
- ALJURAYYAN, N. Imaging of disorder of sex development. **Annals of Saudi Medicine**. v. 33, n. 4, p. 363-367. 2013.
- ANTUNES, H. R. P. Malformações uterinas – do diagnóstico ao tratamento. **Dissetação** (Mestrado integrado em Medicina). Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. abr. 2016.
- ASADI, M.; GHAFOURI-FARD, S.; ZARE-ABDOLLAHI, D.; EBRAHIM-HABIBI, A.; MATIN, N. Estrogen receptor mutation in a girl with primary amenorrhea. **Clinical genetics**. v. 83, n. 5, p. 497-498. 2013.
- AVTANSKI, D.; NOVAIRA, H. J.; WU, S.; ROMERO, C, J.; KINEMAN, R.; LUQUE, R. M.; WONDISFORD, F.; RADOVICK, S. Both estrogen receptor α and β stimulate pituitary GH gene expression. **Molecular endocrinology**. v. 28, n. 1, p. 40-52, jan. 2014.
- BATRAWY, S. E.; SOLIMAN, M. A.; SHAKER, M.; MOHAMED, D.; ELDIN, R. K.; ELDIN, L. S. The accuracy of ultrasound and MRI in the assessment of ambiguous genitalia. **Journal of applied Sciences Research**. v. 9, n. 1, p. 726-734. 2013.
- BEAN, E. J.; MAZUR, T.; ROBINSON, A. D. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome: Sexuality, Psychological Effects, and Quality of life. **Journal of Pediatric & Adolescent Gynecology**. p. 339-346, 2009.
- BIASON-LAUBER, A.; FILIPPO, G.; KONRAD, D.; SCARANO, G.; NAZZARO, A.; SCHOENLE, E. J. WNT4 deficiency – a clinical phenotype distinct from the classic Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: A Case Report. **Human Reproduction**. Reino Unido, v. 22, n. 1, p. 224-229, 2007.
- BIASON-LAUBER, A. WNT4, RSP01, and FOXL2 in sex development. **Seminars in Reproductive Medicine**. v. 30, n. 5, p. 387-395, out. 2012.

BLAKE, K. D.; PRASAD, C. CHARGE syndrome. **Orphanet Journal of rare Diseases**. v.1, n. 34, p. 1-8, set. 2006.

BORGES, M. A. P.; PIRES, M. L. E.; MONTEIRO, D. L. M.; SANTOS, S. R. Forma atípica da síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser com malformação renal e displasia cervicotorácica (associação de MURCS). **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. Rio de Janeiro, v. 34, n. 3, p. 133-138, mar. 2012.

BUREL, A.; MOUCHEL, T.; ODENT, S.; TIKER, F.; KNEBELMANN, B.; PELLERIN, I.; GUERRIER, D. Role of HOXA13 and PBX1 genes in various forms of MRKH syndrome (congenital absence of uterus and vagina). **Journal of Negative Results in BioMedicine**. Londres, v. 5, n. 4, p. 1-16, mar. 2006.

BURGMEIER, C.; LERICHE, C. Laparoscopy in the surgical treatment of disorders of sexual development. **Journal of laparoendoscopic & advanced surgical techniques**. v. 26, n. 9, p. 1-4, 2016.

CARLSON, B. M. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2014.

CARRARD, C.; MEASSON, M. C.; LUNEL, A.; RAUDRANT, D. Sexuality after sigmoid vaginoplasty in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Fertility and Sterility**, vol. 97, n. 3, p. 691-696, mar. 2012.

CARSON, S. A.; SIMPSON, J. L.; MALINAK, L. R.; ELIAS, S.; GERBIE, A. B.; BUTTRAM, V. C.; SARTO, G. E. Heritable aspects of uterine anomalies. II. Genetic analysis of Müllerian aplasia. **Fertility and Sterility**, Estados Unidos, v. 40, n. 1, p. 86-90, jul. 1983.

CHEROKI, C. Estudo genético-clínico e molecular da síndrome de Rokitansky-Mayer-Küster-Hauser e condições afins. **Tese (Doutorado) – Departamento de Genética e Biologia Evolutiva**. São Paulo, p. 1-176, 2008.

CHEROKI, C.; KREPISCHI-SANTOS, A. C.; ROSENBERG, C.; JEHEE, G. S.; MINGRONI-NETTO, R. C.; FILHO, I. P.; FILHO, S. Z.; KIM, C. A.; BAGNOLI, V. R.; MENDONÇA, B. B.; SZUHAI, K.; OTTO, P. A. Report of a del22q11 in a patient with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) anomaly and exclusion of *WNT-4*, *RAR-gamma*, and *RXR-alpha* as major genes determining MRKH anomaly in a study of 25 affected women. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v. 140A, n. 12, p. 1339-1342, jun. 2006.

CHOUHDARY, R. VERMA, S. CHOUHDARY, G. R. Female hypospadias and congenital uterine müllerian anomaly with proved fertility: a rare case report. **Journal of south Asian Federation of Obstetrics and Gynaecology**. v. 3, n. 3, p. 155-156, set/dec. 2011.

CHOUSSEIN, S.; NASIOUDIS, D.; SCHIZAS, D.; ECONOMOPOULOS, K. P. Mullerian dysgenesis: a critical review of the literature. **Archives of Gynecology and Obstetrics**. v. 295, n. 6, p. 1369-1381, jun. 2017.

CHUAIRE, L.; SÁNCHEZ, M. C. Células germinativas primordiales femininas: origen y migración hacia los primórdios gonadales. **Colombia Médica**. Santiago de Cali, vol. 33, n. 4, p. 171-178, 2002.

CLOUNNEY, K.; STEELE, S. L.; STOYEK, M. R.; CROLL, R. P.; SMITH, F. M.; PRYKHOZHII, S. V.; BROWN, M. M.; MIDGEN, C.; BLAKE, K.; BERMAN, J. N. Etiology and functional validation of gastrointestinal motility dysfunction in zebrafish modelo of CHARGE syndrome. **The FEBS Journal**. p. 1-16, abr. 2018.

COUSE, J. F. KORACH, K. S. Estrogen receptor Null mice: What have we learned and where will they lead us? **Endocrine Reviews**. v. 20, n. 3, p. 358-417. 1999.

COUTINHO, I. M. Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser – Descrição de um caso Clínico. **Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar**. Porto, p. 1-22, 2011.

COUTO, D.; MARQUES, I.; ÁGUAS, F. Associação de MURCS no context de um syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser – a propósito de um caso clínico. **Acta Obstétrica e Ginecológica Portuguesa**. v. 1, n. 2 p. 91-94, 2007.

CRAMER, D. W.; GOLDSTEIN, D. P.; FRAER, C. REICHARDT, J. K. V. Vaginal agenesis (Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome) associated with the N314D mutation of galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT). **Molecular Human Reproduction**. Londres, v. 2, n. 3, p. 145-148, mar. 1996.

DRUMMOND, J. B. Estudo dos genes WNT4 e CTNNB1 na síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser. **Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular**. Belo Horizonte, 2007.

DU, H.; TAYLOR, H. S. Molecular Regulation of Müllerian Development by Hox Genes. **Annals of the New York Academy of Sciences**. Nova Iorque, v. 1034, p. 152-165, dez. 2004.

EDMONDS, D. K. Congenital malformations of the genital tract and their management. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**. v. 17, n. 1, pág. 19-40, 2003.

EDMONDS, D. K.; ROSE, G. L.; LIPTON, M. G.; PSY, D. C.; QUEK, J. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: a review of 245 consecutive cases managed by a multidisciplinary approach with vaginal dilators. **Fertility and sterility**®, Londres. v. 97, n. 3, mar. 2012.

EGGERS, S.; SINCLAIR, A. Mammalian sex determination – insights from humans and mice. **Chromosome Research**. v. 20, n. 1, p. 215-238, jan. 2012.

FOLCH, M; PIGEM, I; KONJE, J. C. Müllerian Agenesis: Etiology, Diagnosis and Management. **Obstetrical and Gynecological Survey**. Washington v. 55, n. 10, p. 644-649, out. 2000.

FONTANA, L.; GENTILIN, B.; FEDELE, L.; GERVASINI, C.; MIOZZO, M. Genetics os Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome. **Clinical Genetics**. v. 91, n. 2, p. 233-246, fev. 2017.

FRANK, R. T. The Formation of an Artificial Vagina without Operation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 35, p. 1053-1055, 1938.

GENE CARDS - HUMAN GENES. Disponível em: <https://www.genecards.org/>.

GENETICS HOME REFERENCE – NIH. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/>.

GERVASINI, C.; GRATI, F. R.; LALATTA, F.; TABANO, S.; GENTILIN, B.; COLAPIETRO, P.; TOFFOL, S.; FRONTINO, G.; MOTTA, F.; MAITZ, S.; BERNARDINI, L.; DALLAPICCOLA, B.; FEDELE, L.; LARIZZA, L.; MIOZZO, M. SHOX duplications found in some cases with type I Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Genetics in Medicine**. Roma, v. 12, n. 10, p. 634-640, oct. 2010.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 8ª ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2006.

GOVINDARAJAN, M. J. et al. Magnetic resonance imaging diagnosis of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Journal of Human Reproductive Sciences**. v. 1, n. 2, p. 83-85, jul-dec. 2008.

GUERRIER, D.; MOUCHEL, T.; PASQUIER, L.; PELLERIN, I. The Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome (congenital absence of uterus and vagina) – phenotypic

manifestations and genetic approaches. **Journal of Negative Results in BioMedicine**. Londres, v. 5, n. 1, p. 1-8, jan. 2006.

GUTSCHE, R. M.; CHAGAS, L. A.; LEAL, R.; CUNHA, A. L.; DJAHJAH, M. C. R. Síndrome de Mayer-Kokitansky-Küster-Hauser: relato de caso e revisão de literatura. **Revista Radiologia Brasileira**. São Paulo, v. 44, n. 3, p. 192-194, mai/jun. 2011.

HALE, C. L.; NIEDERRITER, A. N.; GREEN, G. E.; MARTIN, D. M. Atypical phenotypes associated with pathogenic CHD7 variants and a proposal for broadening CHARGE syndrome clinical diagnostic criteria. **American Journal of Medical Genetics part A**. v. 170A, n. 2, p. 344-354, fev. 2016.

HAMILTON, K. J.; ARAO, Y.; KORACH, K. S. Estrogen hormone physiology: reproductive findings from estrogen receptor mutante mice. **Reproductive Biology**. v. 14, n. 1, p. 3-8, mar. 2014.

HERLIN, M. BJORN, A. M. B.; RASMUSSEN, M.; TROLLE, B.; PETERSEN, M. B. Prevalence and patient characteristics of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: a nationwide registry-based study. **Human Reproduction**. v. 31, n. 10, p. 1-7, ago. 2016.

HERLIN, M.; HOJLAND, A. T.; PETERSEN, M. B. Familial Occurrence of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome: A case Report and Review of the Literature. **American Journal of Medical Genetics Part A**. Estados Unidos, v. 164, n. 9, p. 2276-2286, set. 2014.

HSU, P.; MA, A.; WILSON, M.; WILLIAMS, G.; CUROTTA, J.; MUNNS, C. F.; MEHR, S. CHARGE syndrome: a review. **Journal of Paediatrics and Child Health**. v. 50, n. 7, p. 504-511, fev. 2014.

INGRAM, J. M. The bicycle seat stool in the treatment of vaginal agenesis and stenosis: A preliminary report. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, Florida. v. 140, n. 8, p. 867-873, ago. 1981.

IRIE, N.; TANG, W. W. C.; SURANI, M. A. Germ cell specification and pluripotency in mammals: a perspective from early embryogenesis. **Reproductive Medicine and Biology**. v. 13, n. 4, p. 193-202, jun. 2014.

IUTAKA, A. S.; MEYER, G. P. C.; DAMASCENO, M. L. Síndrome de Klippel-Feil. nov. 2011.

IYER, A. K.; McCABE, E. R. B. Molecular mechanisms of DAX1 action. **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 83, n. 1-2, p. 60-73, set/out. 2004.

JALLAD, R. S.; BRONSTEIN, M. D. Deficiência de GH na vida adulta: Como diagnosticar e quando tratar? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 52, n. 5, p. 861-871, jun. 2008.

JIA, M.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; GUSTAFSSON, J. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 29, n. 4, p. 557-568, ago. 2015.

KASTNER, P.; MARK, M.; GHYSELINCK, N.; KREZEL, W.; DUPÉ, V.; GRONDONA, J. M.; CHAMBON, P. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. **Development**. v. 124, n. 2, p. 313-326, jan. 1997.

KIERSZENBAUM, A. L.; **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2007.

KLEIN, M. T.; DUKAT, M.; GLENNON, R. A.; TEITLER, M. Toward selective drug development for the human 5-hydroxytryptamine 1E receptor: a comparison of 5-hydroxytryptamine 1E and 1F receptor structure-affinity relationships. **The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**. USA, v. 337, n. 8 p.869-867, mar. 2011.

KLIPSTEIN, S.; BHAGAVATH, B.; TOPIPAT, C.; SASUR, L.; REINDOLLAR, R. H.; GRAY, M. R. The N314D polymorphism of the GALT gene is not associated with congenital absence of the uterus and vagina. **Molecular Human Reproduction**. Londres, v. 9, n. 3, p. 171-174, mar. 2003.

KNIGHT, H. M. L.; PHILLIPS, N. J.; MOURIQUAND, P. D. E. Female Hypospadias: A case report. **Journal of Pediatric Surgery**. v. 30, n. 12, p. 1738-1740, dez. 1995.

KOBAYASHI, A.; SHAWLOT, W.; KANIA, A.; BEHRINGER, R. R. Requirement of Lim1 for female reproductive tract development. **Development**. v. 131, n. 3, p. 539-549, fev. 2004.

KRUPP, K.; FLIEGNER, M.; BRUNNER, F.; SARA BRUCKER, S.; RALL, K.; RICHTER-APPELT, H. Quality of Life and Psychological Distress in Women with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome and Individuals with Complete Androgen Insensitivity Syndrome. **Open Journal of Medical Psychology**, vol.3, n. 3, p. 212-221, abr. 2014.

LAYMAN, L. L. The genetics of müllerian aplasia. **Expert Review of Endocrinology & Metabolism**. v. 9, n. 4, p. 411-419, mai. 2014.

LEDIG, S.; BRUCKER, S.; BARRESI, G.; SCHOMBURG, J.; RALL, K.; WIEACKER, P. Frame shift mutation of *LHX1* is associated with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome. **Human Reproduction**. Reino Unido, v. 27, n. 9, p. 2872-2875, jun. 2012.

LEDIG, S.; SCHIPPERT, C.; STRICK, R.; MATTHIAS, W. B.; OPPELT, P.; WIEACKER, P. Recurrent aberrations identified by array-CGH in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Fertility and Sterility®**. v. 95, n. 5, p. 1589-1594, abr. 2011.

LEDIG, S.; WIEACKER, P. Clinical and genetic aspects of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Medizinische Genetik**. v. 30, n. 3, p. 3-11. 2018.

LEGENDRE, M.; ABADIE, V.; ATTIE-BITACH, T.; PHILIO, N.; BUSA, T.; BONNEAU, D. et al. Phenotype and genotype analysis of a French cohort of 119 patients with CHARGE syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part C**. p. 417-430, nov. 2017.

LONDRA, L.; TOBLER, K.; WY, J.; KOLP, L. Case Report - Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome Associated with severe inferior vena cava stenosis. **Case Reports in Obstetrics and Gynecology**. v. 2014, p. 1-3, jul. 2014.

LOUDEN, E. D.; AWONUGA, A. O.; GAGO, L. A.; SINGH, M. Rare müllerian anomaly: complete septate uterus with simultaneous longitudinal and transverse vaginal septa. **American Society for Pediatric and Adolescent Gynecology**. v. 28, n. 6, p. 189-191, dez. 2015.

MAGAZINE MÉDICA. Disponível em: <http://magazinemedica.com.br/produtos/dilatadora-vaginal-absoloo/> Acesso em: maio de 2018.

MANIGLIO, P. RICCIARDI, E.; LAGANÀ, A. S.; Epigenetic modifications of primordial reproductive tract: A common etiologic pathway for Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome and endometriosis. **Medical Hypotheses**. v. 90, p. 4-5, mai. 2016.

MANNAERTS, D.; MUYS, J.; BLAUMEISER, B.; JACQUEMYN, Y. A rare cause of primary amenorrhoea, the XY female with gonadal dysgenesis. **BMJ Case Reports**. v. 2015, p. 2014-2016, jan. 2015.

MASSÉ, J.; WATRIN, T.; LAURENT, AUDREY, L.; DESCHAMPS, S.; GUERRIER, D.; PELLERIN, I. The developing female genital tract: from genetics to epigenetics. **The international journal of developmental biology**. v. 53, n. 2-3, p. 411-424, fev. 2009.

MATTOS, C. S.; TREVISAN, C. M.; PELUSO, C.; ADAMI, F.; CORDTS, E. B.; CHRISTOFOLINI, D. M.; BARBOSA, C. P.; BIANCO, B. ESR1 and ESR2 gene polymorphisms are associated with human reproduction outcomes in Brazilian women. **Journal of Ovarian Research**. v. 7, n. 114, p. 1-9. 2014.

McALLISTER, G.; CHARLESWORTH, A.; SNODIN, C.; BEER, M. S.; NOBLE, A. J.; MIDDLEMISS, D. N.; IVERSEN, L. L.; WHITING, P. Molecular cloning of a serotonin receptor from human brain (5HT1E): A fifth 5HT1-like subtype. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v. 89, p. 5517-5521, jun. 1992.

MELLO, M. P.; ASSUMPCÃO, J. G.; HACKEL C. Genes involved in sex determination and differentiation. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. Botucatu, v. 49, n. 1, p. 14-25, fev. 2005.

MENDELSON, C.; LOHNES, D.; DÉCIMO, D.; LUFKIN, T.; LEMEURE, M.; CHAMBON, P.; MARK, M. 1994. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. (II) Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. **Development**. v. 120, n. 10, p. 2749–2771, 1994.

MENDONÇA, B. B. Gender assignment in patients with disorder of sex development. **Reproductive endocrinology**. v. 21, n. 6, p. 511-514, dez. 2014.

MERVIS, C. B.; KLEIN-TASMAN, B. P.; HUFFMAN, M. J.; VELLEMAN, S. L.; PITTS, C. H.; HENDERSON, D. R.; WOODFRUDD-BORDEN, J. MORRIS, C. A. OSBORNE, L. R. Children with 7q11.23 Duplication Syndrome: Psychological Characteristics. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v. 167, n. 7, p.1436–1450, jul. 2015.

MITCHELL, B.; SHARMA, R. **Embryology: an illustrated colour text**. 2ª edição, Elsevier, 2009.

MOEN, M. H. Vaginal agenesis treated by coital dilatation in 20 patients. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**. v. 125, n. 3, p. 282-283, fev. 2014.

MONGAN, N. P.; TADOKORO-CUCCARO, R.; BUNCH, T.; HUGHES, A. Androgen insensitivity syndrome. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 29, n. 4, p. 569-580, ago. 2015.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **Embriologia Clínica**. 9ª.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

MORCEL, K.; CAMBORIEUX, L.; GUERRIER, D. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. Reino Unido, v. 2, n. 13, p. 1-9, mar. 2007.

MORCEL, K.; GUERRIER, D.; WATRIN, T.; PELLERIN, I.; LEVÊQUE, J. The Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome: clinical description and genetics. **Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction**. v. 37, n. 6, p. 539–546, 2008.

MORCEL, K.; WATRIN, T.; PASQUIER, L.; ROCHARD, L.; CAIGNEC, C.; DUBOURG, C.; LOGET, P.; PANIEL, B.; ODENT, S.; DAVID, V.; PELLERIN, I.; BENDAVID, C.; GUERRIER, D. Utero-vaginal aplasia (Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome) associated with deletions in known DiGeorge or DiGeorge-like loci. **Orphanet Journal of Rare Disease**. v. 6, n. 9, p. 1-10, mar. 2011.

MORRIS, C. A.; MERVIS, C. B.; PACIORKOWSKI, A. P.; ABDUL-RAHMAN, O.; DUGAN, S. L.; ROPE, A. F.; BADER, P.; HENDON, L. G.; VALLEMAN, S. L.; LEINTASMAN, B. P.; OSBORNE, L. 7q11.23 Duplication Syndrome: Physical Characteristics and Natural History. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v. 167. n. 12, p. 2916–2935, dez. 2015.

NAVARRO, M. A.; CARRANCO, E. C.; ESTRADA, A. I. H.; OSETE, X. A. Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser. Reporte de un caso y revisión de la bibliografía relacionada con su tratamiento. **Ginecología y Obstetricia de México**, v. 80, n. 7, p. 473-479, mai. 2012.

NIK-ZAINAL, S.; STRICK, R.; STORER, M.; HUANG, N.; RAD, R.; WILLATT, L.; FITZGERALD, T.; MARTIN, V.; SANDFORD, R.; CARTER, N. P.; JANECKE, A. R.; RENNER, S. P.; OPPELT, P. G.; OPPELT, P.; SCHULZE, C.; BRUCKER, S.; HURLES, M.; BECKMANN, M. W.; STRISSEL, P. L.; SHAW-SMITH, C. High incidence of recurrent copy number variants in patients with isolated and syndromic müllerian aplasia. **Journal of Medical Genetics**. v.48, n. 3, p. 197-204, mar. 2011.

OHNESORG, T. ; VILAIN, E. ; SINCLAIR, A. The genetics of disorders of sex development in humans. **Sexual development**, v. 8, n. 5, p. 262-272, jan. 2014.

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN – OMIM. Disponível em: <https://www.omim.org/>.

OPPELT, P. G. LERMANN, J. ; STRICK, R. ; DITTRICH, R. ; STRISSEL, P. ; RETTIG, I.; SCHULZE, C. ; RENNER, S. P. ; BECKMANN, M. W. ; BRUCKER, S. ; RALL, K.; MUELLER, A. Malformations in a cohort of 284 woman with Mayer-Kokitansky-Küster-

Hauser syndrome (MRKH). **Reproductive Biology and Endocrinology**. Germany, v. 10, n. 57, p. 1-7, ago. 2012.

OPPELT, P.; RENNER, S. P.; KELLERMANN, A.; BRUCKER, S.; HAUSER, G. A.; LUDWIG, K. S.; STRISSEL, P. L.; STRICK, R.; WALLWIENER, D.; BECKMANN, M. W. Clinical aspects of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: recommendations for clinical diagnosis and staging. **Human Reproduction**. Inglaterra, v. 21, n. 3, p. 792-797, mar. 2006.

PARROT, A.; JAMES, J.; GOLDENBERG, P.; HINTON, R. B.; MILLER, E.; SHIKANY, A.; AYLSWORTH, A. S.; KAISER-ROGERS, K.; FERNS, S. J.; LALANI, S. R.; WARE, S. M. Aortopathy in the 7q11.23 Microduplication Syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v. 167, n. 2, p. 363-370, 2014.

PATIL, S. J.; SALIAN, S.; BHAT, V.; GIRISHA, K. M.; SHRIVASTAVA, Y.; VS, K.; SAPARE, A. Familial 7q11.23 Duplication with Variable Phenotype. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v.167, n.11, p.2727–2730, jun. 2015.

PETROZZA, J. C.; GRAY, M. R.; DAVIS, A. J.; REINDOLLAR, R. H. Congenital Absence of the uterus and vagina is not commonly transmitted as a dominant genetic trait: outcomes of surrogate pregnancies. **Fertility and Sterility**, Estados Unidos, v. 67, n. 2, p. 387- 389, fev. 1997.

PIAZZA, M. J. Neovaginoplastias: uma revisão dos diversos métodos de tratamento. **Revista Feminina**, v. 42, n. 3, p. mai/jun. 2014.

PITTOCK, S. T.; VUKSANOVIC, D. B.; LTEIF, A. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Anomaly and its associated malformations. **American Journal of Medical Genetics**. Estados Unidos, v. 135A, n. 3, p. 314-316, jun. 2005.

PIZZO, A.; LAGANÀ, A. S.; STURLESE, E.; RETTO, G.; RETTO, A.; DOMONICI, R.; PUZZOLO, D. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome: Embryology, Genetics and Clinical and Surgical Treatment. **International Scholarly Research Notices: Obstetrics and Gynecology**. v. 2013, p. 1-10, 2013.

POBER, B. R. Williams-Beuren Syndrome. **The New England Journal of Medicine**. v. 362, n. 3, p. 239-252, jan. 2010.

QUAYNOR, S. D.; STRADTMAN, E. W.; KIM, H.; SHEN, Y.; CHORICH, L. P.; SCHREIHOFER, D. A.; LAYMAN, L. C. Delayed puberty and estrogen resistance in a woman with estrogen receptor α variant. **New England Journal of Medicine**. v. 369, n. 2, p. 164-171, jul. 2013.

RALL, K.; BARRESI, G.; WALTER, M.; POTHS, S.; HAEBIG, K.; SCHAEFERHOFF, K.; SCHOENFISCH, B.; RIESS, O.; WALLWIENER, D.; BONIN, M.; BRUCKER, S. A combination of transcriptome and methylation analyses reveals embryologically-relevant candidate genes in MRKH patients. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. v. 6, n. 32, p. 1-12. mai. 2011.

REZENDE, D. F.; FILHO, A. V. R.; OLIVEIRA, G. N.; MOURÃO, H. A.; NETO, J. M. P.; SAMPAIO, P. R. L. Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser: uma revisão da literatura. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**. Brasília, v. 2, n. 2, p. 90-99, 2013.

ROBBINS, J. B.; BROADWELL, C.; CHOW, L. C.; PARRY, J. P.; SADOWSKI, E. A. Müllerian duct anomalies: embryological development, classification and MRI assessment. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**. v. 41, n. 1, p. 1-12, 2014.

ROBERTS, C. P.; HABER, M. J.; ROCK, J. A. Vaginal Creation for müllerian agenesis. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 185, n. 6, p. 1349- 1353, dez. 2001.

ROTHKOPF, A. C.; JOHN, R. M. Understanding disorders of sexual development. **Journal of Pediatric Nursing**. v. 29, n. 5, p. 23-34, set/out. 2014.

ROUSSET, P.; RAUDRANT, D.; PEYRON, N.; BUY, J. N.; VALETTE, P. J.; HOEFFEL, C. Ultrasonography and MRI features of the Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Clinical Radiology**. v. 68, n. 9, p. 945-952, set. 2013.

SADLER, T. W. **Embriologia Médica**. 13^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2006.

SANDBACKA, M.; LAIVUORI, H.; FREITAS, E.; HALTTUNEN, M.; JOKIMAA, V.; MORIN-PAPUNEN, L.; ROSENBERG, C.; AITTOMÄKI, K. *TBX6*, *LHX1* and copy number variations in the complex genetics of müllerian aplasia. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. v. 8, n. 125, p.1-13, ago. 2013.

SANTOS, C. C. C. Ação de agonistas da via Wnt/ β catenina em células T CD4⁺ murinas. **Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo – Faculdade de medicina**. São Paulo, p. 1-98, 2015.

SCHIMKE, R. N.; KING, C. R. Hereditary Urogenital Adysplasia. **Clinical Genetics**. v. 18, n. 6, p. 417-420, dez. 1980.

SCHOENWOLF, G. C.; BLEYL, S. B.; BRAUER, P. R.; FRANCIS-WEST, P. H. Larsen's Human Embryology. 4^a ed. Filadélfia: Elsevier, 2009.

SILVA, R. B. Distúrbio do desenvolvimento sexual 46, XX testicular *SRY* negativo sindrômico devido à mutação missense no gene *RSPO1*: estudo clínico, molecular e histológico de grande família consanguínea brasileira. **Tese (Doutorado em Ciências)**. p. 1-135. São Paulo, 2015.

SOMERVILLE, M. J.; MERVIS, C. B.; YOUNG, E. J.; SEO, E.; CAMPO, M.; BAMFORTH, S.; PEREGRINE, E.; LOO, W.; LILLEY, M.; PÉREZ-JURADO, L. A.; MORRIS, C. A.; SCHERER, S. W.; PSBORNE, L. R. Severe Expressive-Language Delay Related to Duplication of the Williams-Beuren Locus. **New England Journal of Medicine**. v. 353, n. 16, p.1694-1701, out. 2005.

SOUSA, S.; SILVA, C.; RODRIGUES, C.; LEITE, H.; GERALDES, F. ÁGUAS, F. Abordagem diagnóstica e terapêutica na síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hausner. **Acta Obstetrica e Ginecologica Portuguesa**. Coimbra, v. 8, n. 1, p. 8-13. 2014.

STEINKAMPF, M. P.; DHARIA, S. P. DICKERSON, R. D. Monozygotic twins discordant for vaginal agenesis and bilateral tibial longitudinal deficiency. **Fertility and Sterility**, Estados Unidos, v. 80, n. 3, p. 643-645, set. 2003.

SULTAN, C.; BIASON-LAUBER, A.; PHILIBERT, P. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hausner syndrome: Recent clinical and genetic findings. **Gynecological Endocrinology**, v. 25, n. 1, p. 8-11, jan. 2009.

SUNTHARALINGHAM, J. P.; BUONOCORE, F.; DUNCAN, A. J.; ACHERMANN, J. C. DAX1 (NROB1) and steroidogenic fator-1 (SF-1, NR5A1) in human disease. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 29, n. 4, p. 607-619, ago. 2015.

TADOKORO-CUCCARO, R.; HUGHES, A. Androgen insensitivity syndrome. **Reproductive endocrinology**, v. 21, n. 6, p. 499-503, dez. 2014.

TAJOURI, A.; GAIED, D. B.; HIZEM, S.; BOUJELBEN, S.; MAAZOUL, F.; M'RAD, R.; POULAT, F.; KHARRAT, M. Functional analysis of mutations at codon 127 of the *SRY* gene associated with 46, XY complete gonadal dysgenesis. **Sexual Development**, v.11, n. 4, p. 203-209, ago. 2017.

THAPAR, A.; COOPER, M. Copy number variation: what is it and what has it told us about child psychiatric disorders? **Journal of the american academy of child & adolescent psychiatry**. v. 52, n. 8, p. 772-774, ago. 2013.

TIMMERECK, L. S.; GRAY, M. R.; HANDELIN, B.; ALLITO, B.; ROHFS, E.; DAVIS, A. J.; GIDWANI, G.; REINDOLLAR, R. H. Analysis of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Mutations in Patients with Congenital Absence of the Uterus and Vagina. **American Journal of Medical Genetics**, Estados Unidos, v. 120A, n. 1, p. 72-76, jul. 2003.

TRIDER, C.; ARRA-ROBAR, A.; REVENSWAAIJ-ARTS, C. V.; BLAKE, K. Developing a CHARGE syndrome checklist: health supervision across the lifespan (from head to toe). **American Journal of Medical Genetics part A**. v. 173A, p. 684-691, 2017.

VELLEMAN, S. L.; MERVIS, C. B. Children with 7q11.23 Duplication Syndrome: Speech, Language, Cognitive, and Behavioral Characteristics and their Implications for Intervention. **Perspect Lang Learn Educ**. v. 18, n. 3, p. 108-116, out. 2011.

VERLOES, A. Update diagnostic criteria for CHARGE syndrome: a proposal. **American Journal of Medical Genetics**. v. 133A, p. 306-308, 2005.

VIEIRA, M. P.; COSTA-MATOS, A.; TOLEDO, L. G.; MARON, P. E. G.; ASSAKAWA, M. A. G.; JÚNIOR, R. W. M.; PEREZ, M. D. C. Incontinência urinária por agenesia de uretra feminina: relato de caso. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**. v. 56, n. 1, p. 32-35, 2011.

WALIA, R.; SIGLA, M.; VAIPHEI, K.; KUMAR, S.; BHANSALI, A. Disorders of sex development: a study of 194 cases. **Endocrine Connections**. v.7, n. 2, p. 364-371, 2018.

WANG, Y.; LU, J.; ZHU, L.; SUN, Z.; JIANG, B.; FENG, F.; JIN, Z. Evaluation of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome with magnetic resonance imaging: Three patterns of uterine remnants and related anatomical features and clinical settings. **European Society of Radiology**, v. 27, n. 12, p. 5215-5224, jul. 2017.

WATANABE, K.; KOBAYASHI, Y.; BANNO, K.; MATOBA, Y.; KUNITOMI, H.; NAKAMURA, K.; ADACHI, M.; UMENE, K.; KISU, I.; TOMINAGA, E.; AOKI, D. Recent advances in the molecular mechanisms of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome (Review). **Biomedical Reports**. v. 7, n. 2, p. 123-127, mai. 2017.

WILLIAMS, L. S.; EKSI, D. D.; SHEN, Y.; LOSSIE, A. C.; CHORICH, L. P.; SULLIVAN, M. E.; PJILLIPS, J. A.; ERMAN, M.; KIM, H. K.; ALPER, O. A.; LAYMAN, L. C. Genetic analysis of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome in a large cohort of families. **Fertility and Sterility**. v.108, n. 1, p. 145-151, jun. 2017.

WILLIAMS, L. S.; KIM, H.; KALSCHEUER, V. M.; TUCK, M.; CHORICH, L. P.; SULLIVAN, M.; FALKENSTROM, A.; REINDOLLAR, R. H.; LAYMAN, L. C. A balanced chromosomal translocation involving chromosomes 3 and 16 in a patient with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome reveals new candidate genes at 3p22.3 and 16p13.3. **Molecular Cytogenetics**. v. 9, n. 57, p. 1-7, 2016.

WITCHEL, S. F. Disorders of Sex Development. **Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology**. v. 48, p. 90-102, abr. 2018.

ZARATE, Y. A.; LEPARD, T.; SELLARS, E.; KAYLOR, J. A.; ALFARO, M. P.; SAILEY, C.; SCHAEFER, G. B.; COLLINS, R. T. Cardiovascular and Genitourinary Anomalies in Patients With Duplications Within the Williams Syndrome Critical Region: Phenotypic Expansion and Review of the Literature. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v. 164, n. 8, p. 1998-2002, abr. 2014.

ZARREI, M. MacDONALD, J. R.; MERICO, D.; SCHERER, S. W. A copy number variation map of the human genome. **Nature Reviews Genetics**. v. 16, n. 3, p. 172-183, mar. 2015.

16. ANEXOS

ANEXO A – AVALIAÇÃO HORMONAL DAS PACIENTES PARTICIPANTES DO ESTUDO

PACIENTES	LH (mIU/mL)	FSH (mIU/mL)	PROLACTINA (ng/mL)	ESTRADIOL (pg/mL)	TESTOSTERONA (ng/dL)	PROGESTERONA (ng/mL)
P1	28,88	5,69	19,65	249,5	43,54	0,903
P2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P3	6,8	3,7	24,3	97,6	32,9	5,9
P4	22,18	7,4	7,7	225,5	73,8	NA
P5	9,34	13,6	7,2	56,1	32,5	1,50
P6	NA	4,1	5,7	41,57	NA	Inferior a 0,15
P7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P8	4,21	4,85	13,4	74	36,2	1,28
P9	5,72	3,59	NA	261	51	7,12
P10	<0,07	<0,3	5,7	19,9	39,3	0,51
P11	3,52	3,33	17,73	90,12	<2,50	19,95
P12	12,27	7,61	NA	43,53	307,1	0,648
P13	6,99	6,21	19,8	47	NA	NA
P14	9,93	4,22	NA	152,5	0,34	13,62

Avaliação hormonal das pacientes participantes do estudo. Não avaliado (NA).

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNB

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise Cromossômica por Microarray (CMA) em pacientes com Síndrome de Rokitansky

Pesquisador: Aline Pic

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 60695716.1.0000.5558

Instituição Proponente: Instituto de Biologia da Universidade de Brasília

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.868.615

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa sob orientação da Professora Dra Aline Pic. Para esse estudo serão selecionadas 30 pacientes diagnosticadas clinicamente com síndrome de Rokitansky, atendidas no Hospital Universitário de Brasília. Essas pacientes serão submetidas à avaliação ginecológica detalhada, permitindo classificá-los em três subtipos da síndrome. Serão coletados 4 a 8 ml de sangue periférico em tubos contendo EDTA e em tubos com heparina. A extração de DNA será realizada conforme protocolo de rotina do laboratório.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar regiões genômicas e/ou genes que contribuem para a etiologia da síndrome de Rokitansky.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A coleta de sangue será realizada com material estéril, descartável e por profissional habilitado. Devido à punção venosa, poderá ocorrer leve dor no local e formação de hematoma.

Quanto aos benefícios, a doença ainda não possui etiologia conhecida e a identificação de alterações submicroscópicas que estejam associadas a esse quadro clínico poderá contribuir para o seu entendimento, além de ajudar na compreensão do desenvolvimento do aparelho reprodutor.

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

**UNB - FACULDADE DE
MEDICINA**



Continuação do Parecer: 1.868.615

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante para a sociedade e não apresenta riscos às participantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão adequados. O termo de consentimento livre e esclarecido está claro. O orçamento está descrito adequadamente, e o cronograma de atividades está condizente com a proposta do projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após a apreciação do projeto de pesquisa sou de parecer favorável à aprovação da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto apreciado na 11ª Reunião Ordinária do CEP-FM-UnB. Após apresentação do parecer do (a) Relator (a), aberta a discussão para os membros do Colegiado. O projeto foi Aprovado por unanimidade.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_710165.pdf	22/09/2016 09:24:18		Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	22/09/2016 09:23:44	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_de_assentimento_13_a_17_anos.pdf	22/09/2016 09:22:57	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Outros	carta_de_encaminhamento_rokitansky.pdf	29/08/2016 20:45:28	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_rokitansky.pdf	29/08/2016 20:27:38	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Outros	Lattes_Vanessa_Sodre_de_Souza.pdf	07/08/2016 21:43:09	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Outros	Lattes_Rosenelle_Oliveira_Araujo_Benicio.pdf	07/08/2016 21:42:48	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Outros	Lattes_Silviene_Fabiana_de_Oliveira.pdf	07/08/2016 21:42:20	Gabriela Corassa Rodrigues da	Aceito

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1918 E-mail: fmd@unb.br

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O (A) Senhor (a) está sendo convidado a participar do projeto: “Análise cromossômica por microarrays (CMA) em pacientes com Síndrome de Rokitansky”. O objetivo desta pesquisa é identificar regiões genômicas e/ou genes que contribuem para a etiologia da síndrome.

O (A) Senhor (a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa, sendo mantido o mais rigoroso sigilo de sua identidade através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo (a). Sua participação ocorrerá por meio do fornecimento de amostra biológica (sangue) para a realização de exames laboratoriais por meio do DNA extraído. O procedimento de coleta de sangue por punção venosa será feito com material estéril descartável de boa qualidade por profissional habilitado, podendo ocasionar um pouco de dor e formação de hematoma no local.

Os resultados obtidos neste projeto podem beneficiar o participante, através da identificação de genes relacionados a sua condição, o que pode permitir precisão no seu acompanhamento e de seus familiares, desde que consentido pelo senhor (a). Os dados do trabalho serão divulgados na Universidade de Brasília, podendo ser publicados posteriormente.

Informamos que o Senhor (a) poderá se recusar a responder questões ou participar de algum procedimento que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa no momento em que desejar sem nenhum prejuízo e comprometimento em seu acompanhamento médico.

A participação na pesquisa é voluntária, isto é, não há qualquer tipo de pagamento por sua colaboração. Caso solicite, o participante poderá ser ressarcido pelos gastos com deslocamento e alimentação devido à participação nessa pesquisa. O ressarcimento só poderá ocorrer mediante comprovação. Além disso, será garantido atendimento imediato e /ou indenização diante de eventuais danos **comprovadamente** decorrentes dessa pesquisa, vistas as medidas administrativas e judiciais cabíveis.

Solicitamos também sua autorização para armazenamento da amostra biológica de sangue em biorrepositório no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília para possíveis estudos futuros. O material coletado terá uma codificação alfanumérica e só poderá ser manuseada pelos indivíduos diretamente relacionados com o projeto.

Se o (a) Senhor (a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Dra. Aline Pic Taylor, na Universidade de Brasília, telefone: (61) 3107-3083, em horário comercial ou Gabriela Corassa R. da Cunha, telefone: (61) 9977-0862 em horário comercial.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1918.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

- Estou assinando em meu nome.
- Estou assinando em nome do meu dependente legal.

Se você estiver de acordo, por favor:

Nome / assinatura do voluntário ou responsável legal

Aline Pic Taylor

ANEXO D – TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO DE IMAGEM PARA FINS DE PESQUISA

Eu, _____,
autorizo a utilização da minha imagem e/ou da imagem do meu dependente, na qualidade de participante no projeto de pesquisa intitulado “**Análise cromossômica por microarrays (CMA) em pacientes com Síndrome de Rokitansky**” sob responsabilidade da Dra. Profa. Aline Pic Taylor vinculada a Universidade de Brasília.

Essa autorização implica que minha imagem poderá ser utilizada apenas para publicações científicas, incluindo artigos em revistas especializadas, livros e/ou capítulos de livros, dissertações, teses e relatórios, assim como para aulas, palestras e apresentações para profissionais da saúde.

Tenho conhecimento de que o pesquisador irá tomar providências que assegurem a confidencialidade e privacidade das minhas imagens e de que não haverá divulgação da mesma por qualquer meio de comunicação, exceto nas atividades vinculadas ao ensino e a pesquisa explicitadas acima. Estou ciente também de que, de acordo com a natureza das publicações científicas, é possível que minha imagem fique disponível na internet para os pesquisadores que tiverem interesse no meu caso, porém sempre mantendo o meu anonimato. Por exemplo, se for realizada uma pesquisa na internet utilizando o meu nome, as imagens não serão acessadas. A guarda e demais procedimentos de segurança com relação às imagens são de responsabilidade do(a) pesquisador(a) responsável.

Deste modo, declaro que autorizo, livre e espontaneamente, o uso para fins de pesquisa, nos termos acima descritos, da minha imagem e/ou a do meu dependente.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o(a) pesquisador(a) responsável e a outra com o(a) participante.

Assinatura do (a) participante

Aline Pic Taylor

Brasília, ____ de _____ de _____