

Intersexo. I - Genes envolvidos na determinação do sexo masculino*

Rosália Sá¹, Mário Sousa², Alberto Barros³

RESUMO

Neste artigo actualizamos a embriologia do sistema reprodutor masculino e apresentamos a cascata de genes que controlam a determinação do sexo (sexo gonádico) e a diferenciação sexual (sexo genital). Em artigos subsequentes, explicaremos o mecanismo pelo qual as lesões destes genes condicionam intersexo. Na gónada embrionária bipotente os genes *NR5A1(SF1)* e *WT1(-KTS)* activam o gene *SRY*, enquanto que os genes *WNT4* e *WT1(-KTS)* activam os genes feminizantes *NROB1(DAX1)* e *SOX3*. O *SRY* dispara a determinação da gónada bipotente em testículo ao induzir a diferenciação em células de Sertoli e ao inibir os genes *DAX1* e *SOX3*. A diferenciação do sexo é uma consequência da interacção entre os genes *SOX8*, *SOX9*, *NR5A1*, *GATA4* e *WT1(+KTS)*, após potenciação pelo *SRY*. Neste mecanismo, as células de Sertoli segregam a hormona anti-mulleriana (AMH) e induzem a diferenciação das células de Leydig. A AMH induz a atrofia do canal de Muller, inviabilizando o fenotipo feminino. Sob influência da gonadotrofina coriónica (HCG), as células de Leydig segregam testosterona, a qual é então parcialmente metabolizada em 5-dehidro-testosterona. Sob mediação

do gene *CFTR*, a testosterona promove a diferenciação do canal de Wolff na metade reprodutora (canais eferentes, epidídimos, canais deferentes, vesículas seminais, canais ejaculadores), enquanto que a 5-dehidro-testosterona induz a diferenciação do canal de Wolff na metade urinária (próstata, uretra, pênis, escroto).

Palavras-chave: Embriologia, testículo, determinação do sexo, diferenciação sexual, mecanismos genéticos.

Nascer e Crescer 2005; 14(4): 292-299

1. Embriologia do Sistema Reprodutor Masculino

O intersexo existe quando não se pode estabelecer com total garantia o sexo de um indivíduo por haver falta de concordância entre os critérios: sexo cromossómico ou genotípico (46,XY ou 46,XX), sexo gonádico (formação das gónadas: testículo ou ovário), sexo genital (formação dos canais genitais e dos genitais externos), sexo somático ou fenotípico (características sexuais secundárias), sexo psíquico (conceito de si mesmo), sexo social (atribuído pela sociedade) e sexo civil (genital).⁽¹⁾ O sexo genético é uma consequência da fecundação de um ovócito (23,X) por um espermatozóide (23,Y ou 23,X), que origina um embrião 46,XY ou 46,XX.^(2,3)

A gonadogénese inicia-se pela formação do sistema urogenital a partir da mesoderme intermediária. O sistema urogenital é composto por três segmentos: pronefro (primórdio da suprarrenal), mesonefro (rim embrionário, destinado à regressão espontânea) e

metanefro (primórdio do rim definitivo). O canal de Wolff (canal mesonéfrico) origina-se da mesoderme lateral e percorre o sistema urogenital, enquanto que o canal de Muller (canal paramesonéfrico) deriva de uma invaginação do epitélio superficial do mesonefro e corre paralelo ao canal de Wolff. Nas mulheres, o canal de Wolff regride e o canal de Muller origina o oviducto, o útero e o terço superior da vagina. No sexo masculino, o canal de Muller sofre regressão por acção da hormona anti-mulleriana (AMH; ou substância mulleriana inibidora, MIS), secretada pelas células de Sertoli, e o canal de Wolff diferencia-se no epidídimo, canal deferente e vesícula seminal sob acção da testosterona, secretada pelas células de Leydig (Figs. 1-3).⁽⁴⁻¹⁰⁾

A gónada bipotencial surge na superfície da crista genital. As células germinais primordiais (primordial germ cells, PGC), diferenciadas das células da endoderme da parede do saco vitelino (3ª semana), junto à alantóide, migram, independentemente do sexo cromossómico, ao longo da parede posterior do intestino primitivo. Na 5ª semana chegam à gónada primitiva e invadem-na na 6ª semana de gestação (Fig. 1). Se as PGC não atingirem as gónadas primitivas, não é possível a formação do testículo (nem do ovário). Uma vez na proximidade da gónada primitiva, e sobretudo depois de a invadirem, as PGC segregam factores que induzem a proliferação das células do tecido conjuntivo e das células do epitélio celómico da crista genital. Após a fase de proliferação epitelial, a lâmina basal do epitélio celómico fragmenta-se e as células epiteliais proliferantes invadem o estroma. No sexo masculi-

¹ Bióloga, Aluna de Doutoramento, Lab Biologia Celular, ICBAS-UP

² MD, PhD, Prof Catedrático, Director, Lab Biologia Celular, ICBAS-UP

³ MD, PhD, Prof Catedrático, Director, Centro de Genética da Reprodução Alberto Barros, Porto

* Trabalho financiado pela FCT (POCTI/SAU-MMO/60709/04, 60555/04, 59997/04, UMIB).

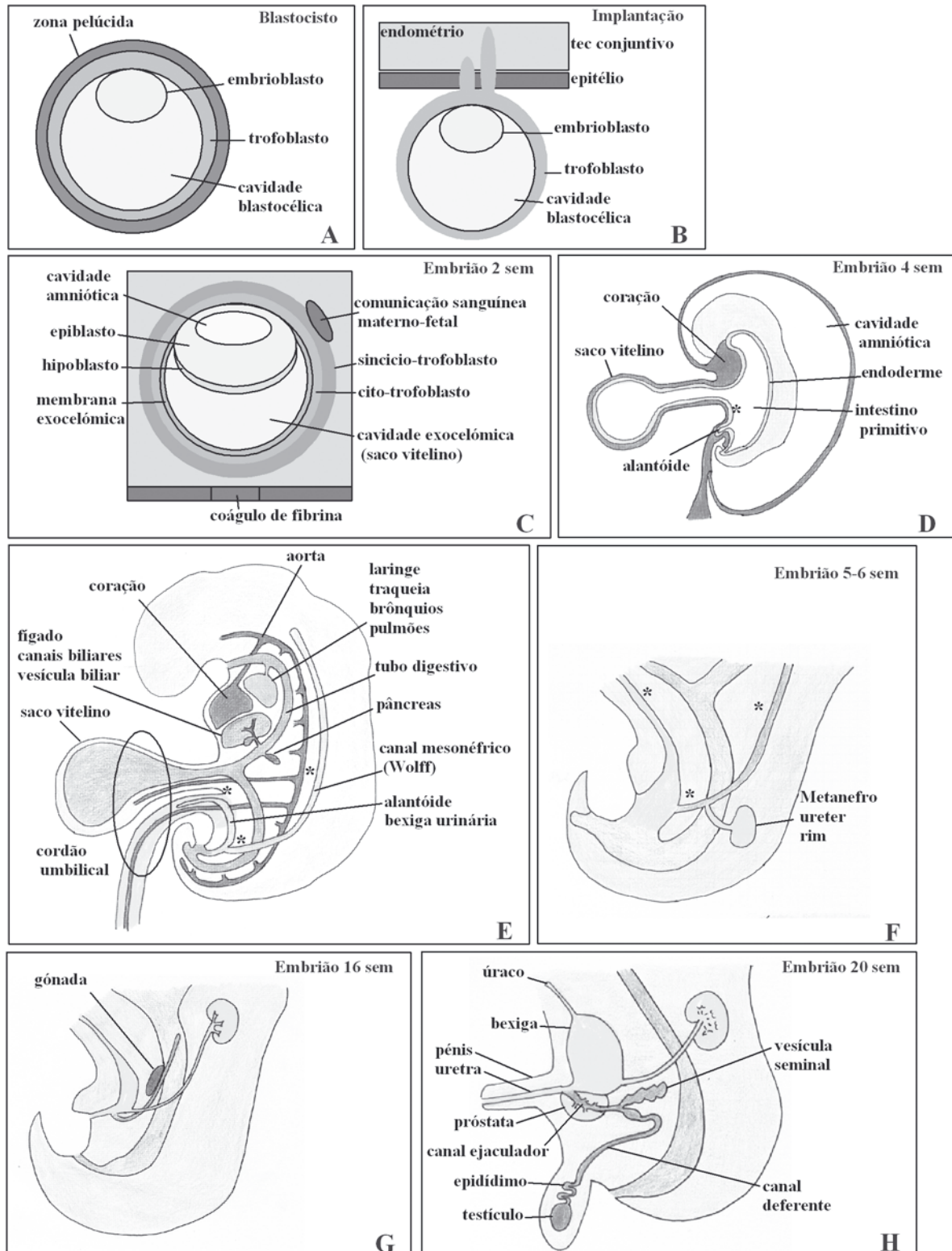


Figura 1. Embriologia do sistema reprodutor masculino. (*) Origem e trajeto de migração das células germinais primordiais.

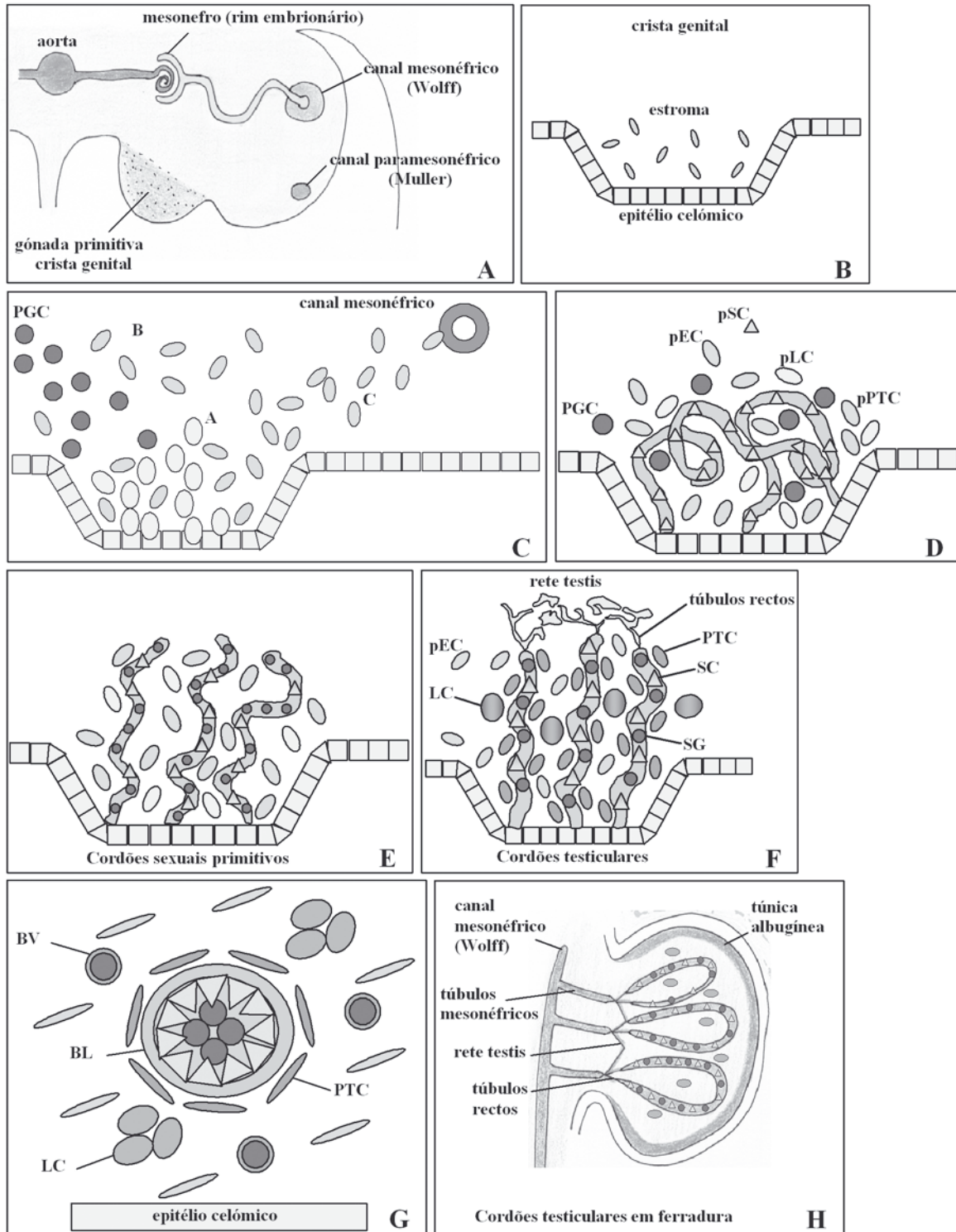


Figura 2. Determinação e diferenciação do testículo. As células germinais primordiais (PGC) evoluem para espermatogónias (SG). Da proliferação do epitélio celômico da crista genital (A) originam-se as células pré-Sertoli (pSC), que depois se transformam em células de Sertoli (SC), e as células pré-Leydig (pLC), que mais tarde se diferenciam em células de Leydig (LC). Da proliferação do estroma da crista genital (B) resultam as células e a matriz de tecido conjuntivo intersticial do testículo. Da proliferação do epitélio do canal de Wolff (C) originam-se as células pré-peritubulares (pPTC), que depois se transformam em células peritubulares (PTC), e as células pré-endoteliais (pEC), que mais tarde originam os vasos sanguíneos (BV) testiculares. As PTC e as SC sintetizam a lâmina basal (BL) que delimita os túbulos seminíferos.

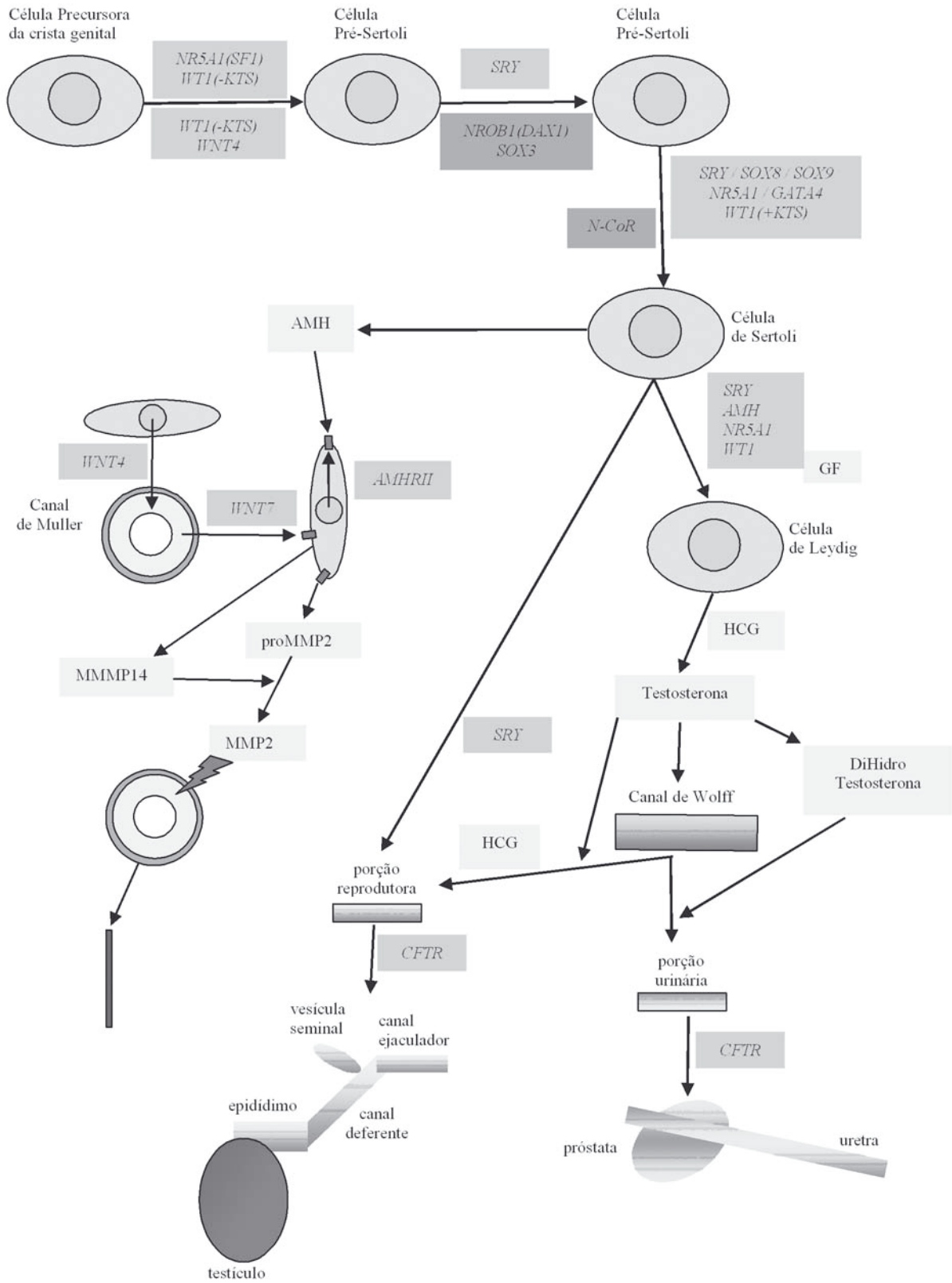


Figura 3. Sequência de activação de genes envolvidos na determinação do sexo (testículo) e na diferenciação sexual (genitais) masculina. Genes estimuladores e genes inibidores . Proteínas .

no, devido à presença do cromossoma Y (e independentemente do número de cromossomas X), estas células irão originar as células de Sertoli, as células de Leydig e as células intersticiais do tecido conjuntivo do testículo. No sexo feminino, irão originar as células da granulosa (células foliculares). Em simultâneo, sob a acção do FGF9 (fibroblast growth factor 9), as células do epitélio do canal mesonéfrico também proliferam, destacam-se e migram para a crista genital, dando origem às células peritubulares (mioepiteliais) e às células endoteliais dos vasos sanguíneos do testículo (Fig. 2). Neste processo, o gene *FGF9* promove a prostaglandina-D-sintase que leva à síntese de prostaglandina-D2 (PGD2).^(8,9)

Até à 5-6ª semanas de gestação, a gónada embrionária é bipotencial, não havendo diferenças entre os sexos (cromossómicos). Nas cristas genitais do sexo masculino, as PGC diferenciam-se em pro-espermatogónias-M e depois em pro-espermatogónias-T (espermatogónias fetais). Numa primeira fase, as células pré-Sertoli (células de Sertoli fetais) proliferam para, de seguida, sob a acção do gene *SRY* (localizado no braço curto do cromossoma Y, Yp), se agregarem em volta das pro-espermatogónias-T. As células pré-Sertoli são depois rodeadas pelas células peritubulares, formando-se uma lâmina basal entre ambas. Deste conjunto, formam-se então os cordões sexuais primitivos, sólidos, de forma irregular, que permanecem ligados ao epitélio celómico (Fig. 2). Nestes cordões, as células pré-Sertoli inibem a proliferação e a entrada em meiose das pro-espermatogónias-T, causando uma paragem em mitose na fase G1/G0. Uma vez diferenciadas em células de Sertoli, inicia-se a secreção da AMH que provoca a atrofia do canal de Muller, assim inviabilizando a diferenciação dos genitais femininos. A activação em células de Sertoli também condiciona a diferenciação das células de Leydig fetais a partir das células epiteliais presentes no estroma da crista genital (Fig. 3). Sob influência da gonadotrofina coriónica (HCG, human coriogona-

dotrophin) secretada pela placenta, as células de Leydig fetais passam então a produzir testosterona e dehidro-testosterona (início: 8 semanas; máximo: 12-14 semanas). A testosterona induz o desenvolvimento dos genitais masculinos internos a partir da estabilização do canal de Wolff, diferenciando-o nos canais eferentes, epidídimos, canais deferentes, vesículas seminais e canais ejaculadores. A 5-dehidro-testosterona, produto de acção da enzima sobre a testosterona, induz a formação da próstata, da uretra e dos genitais externos (pénis e escroto). Nas mulheres, as células germinais primordiais permanecem no córtex da crista genital, entram em meiose e param em diacinese da profase I, sendo elas a influenciar a diferenciação das células da granulosa. Enquanto que a diferenciação em testículo se inicia pela 8ª semana, a indução ovárica decorre a partir das 12 semanas de gestação.⁽⁴⁻¹⁰⁾

Os cordões sexuais primitivos continuam a proliferar em direcção ao hilo da glândula, transformando-se em cordões testiculares. Na região hilar, as extremidades distais dos cordões testiculares tornam-se finas, ramificam-se e fragmentam-se para formar uma rede que mais tarde se diferencia nos túbulos da rete testis. Do tecido conjuntivo que envolve os cordões testiculares, diferenciam-se as células de Leydig (equivalentes às células da teca), as quais começam a segregar testosterona desde a 8ª semana de gestação. Por esta altura, a região mais superficial do estroma diferencia-se numa camada fibrosa, a túnica albugínea, que então separa definitivamente os cordões testiculares do epitélio superficial. A partir da 16ª semana, os cordões testiculares adquirem a forma de ferradura e as suas extremidades distais, mais finas, fundem-se com os túbulos da rete testis. Por sua vez, os túbulos da rete testis ligam-se aos túbulos excretorios do canal mesonéfrico (Fig. 2). Os cordões testiculares permanecem sólidos até à puberdade, altura em que adquirem um lúmen e se transformam em túbulos seminíferos. Uma vez canalizados, as extremidades distais for-

mam os túbulos rectos, que se abrem na rete testis. Os túbulos excretorios do canal mesonéfrico transformam-se nos canais eferentes e na porção cefálica do epidídimo (Fig. 2). À medida que o testículo desce para o escroto, a inserção do canal mesonéfrico vai também descendo até se tornar contíguo com a uretra prostática (Fig. 1). Do canal mesonéfrico derivam, por isso, o canal ejaculador, a vesícula seminal, o canal deferente, e o corpo e cauda do epidídimo. Pelo contrário, a próstata diferencia-se da invaginação da uretra. Os genitais externos formam-se a partir do tubérculo, das pregas e das protusões genitais. A fusão e o alongamento das pregas genitais origina a uretra e o pénis, e da fusão das protusões genitais resulta o escroto (Fig. 1).⁽⁴⁻¹⁰⁾

Depois do nascimento, os túbulos seminíferos apresentam células de Sertoli, pro-espermatogónias e espermatogónias-A (de dois tipos: Ap, de núcleo claro e Ad, de núcleo denso). Por volta dos quatro anos de idade, já não se observam pro-espermatogónias, havendo apenas espermatogónias-A, espermatogónias-B e espermatócitos primários. Antes da puberdade existem dois momentos em que o testículo tenta iniciar a espermatogénese, por volta dos 3-4 anos e dos 8-9 anos de idade. Porém, só raramente os espermatócitos primários terminam a meiose e originam espermatídeos redondos. Por volta dos 13 anos, observa-se um aumento drástico do número de espermatócitos, e a espermatogénese finalmente é completada com a meiose e a espermiogénese (diferenciação dos espermatídeos redondos a espermatozóides). Em simultâneo, verifica-se um aumento do volume testicular por proliferação das células de Sertoli e das células germinais. O tempo que medeia entre as espermatogónias Ap a espermatozóide é de cerca de 60-64 dias, e de espermatídeo redondo a espermatozóide cerca de 14-21 dias. Nesta fase da puberdade, as células de Sertoli terminam a sua diferenciação e deixam de se dividir. Estabelecem-se entre elas junções ocludentes que originam a barreira hemato-testicular e

que divide o epitélio germinal em duas regiões distintas. A região basal contém as espermatogónias-A, as espermatogónias-B e os estadios iniciais de espermatócito primário (pré-leptóteno e leptóteno: replicação do DNA, células germinais diplóides, 2N4C). A região apical contém os espermatócitos primários em meiose I (emparelhamento dos homólogos e crossing over: zigóteno e paquíteno), espermatócitos secundários (produto da primeira divisão meiótica: segregação dos homólogos, células germinais diplóides, 1N2C), os espermatídeos redondos (produto da 2ª divisão meiótica: células germinais haplóides, 1N1C), os espermatídeos em alongamento, os espermatídeos alongados e os espermatozóides.⁽²⁻¹⁰⁾

2. Bases Genéticas da Determinação do Sexo Masculino

Em termos filogenéticos, o cromossoma X surgiu a partir da perda de material genético oriundo dos cromossomas autossómicos. Mais tarde, da perda de material genético do cromossoma X formou-se o cromossoma Y. Assim sendo, a determinação da gónada masculina, em termos evolutivos e genéticos, é uma luta contra a diferenciação natural e espontânea (constitucional) da gónada feminina. Devido a inversões múltiplas, o cromossoma Y foi perdendo a capacidade de se emparelhar com o cromossoma X e, actualmente, o emparelhamento entre ambos praticamente só ocorre nas regiões pseudoautossómicas (PAR) dos telómeros (extremidades) dos braços curtos. Por este motivo, enquanto o cromossoma X se manteve relativamente conservado devido à presença de outro cromossoma X no sexo feminino, com o qual emparelha, o cromossoma Y foi variando a sua estrutura, complicando-a com múltiplos pseudogenes e cópias de genes numa tentativa de proteger contra as mutações os genes determinantes do sexo (*SRY*) e da espermatogénese (região AZF em Yq11.2).⁽¹¹⁻¹⁴⁾ A determinação do sexo gonádico depende de uma cascata de activação e interacção entre genes contidos nos cromossomas X e nos cromossomas

autossómicos. O gene *SRY* actua como agente de decisão nessa cascata. O gene *SOX3* (no braço longo do cromossoma X, Xq) tornou-se a origem do gene *SRY* ao ser translocado para o cromossoma Y, apesar da função do *SRY* ter sido efectuada ainda mais ancestralmente pelo gene *SOX9*.⁽¹⁵⁾

Nas células precursoras da crista genital indiferenciada (gónada embrionária bipotente) são activos os genes *NR5A1* (9q33.3: nuclear receptor subfamily type 5, group A, member 1 gene, ou *NR5A1*; a proteína do *NR5A1* é denominada steroidogenic factor 1, ou SF1; o SF1 é um receptor nuclear órfão que se liga ao promotor dos genes das hidroxilases esteróides), *WT1* (11p13: Wilms Tumor suppressor gene 1), *GATA4*, *FOG2*, *SOX9* (17q24.3-q25.1), *DMRT1* e *DMRT2* (SRA; 9p24.3), *SRA* (10q), *ATRX* (Xq13), *SLOS* (7q32, 9p24-pter, 10q25-pter), ? (1p) e *FGF9* (Fig. 3). A activação destes genes induz a proliferação do epitélio celómico mesodérmico, o destacar das células desse epitélio, a sua invasão para o estroma e a sua diferenciação em células pré-Sertoli. Nesse momento, as células pré-Sertoli são ainda bipotentes, ie, também têm a capacidade de se diferenciarem em células foliculares, pelo que, na realidade, são células pré-Sertoli / células pré-granulosa.^(11,12,15)

Nas células pré-Sertoli, os genes *NR5A1*(*SF1*) e *WT1* (isoforma -KTS do mRNA do *WT1*, derivado de splicing alternativo do exão 9, com perda dos aminoácidos lisina-treonina-serina, ou KTS) activam o gene *SRY*, enquanto que o gene *WNT4* (1p) activa os genes *NROB1*(*DAX1*) (*DSS*, *AHC*, *X*-linked, gene 1 em Xp21.3: *D*osage *S*ensitive *S*ex reversal locus-*A*drenal *H*ypoplasia *C*ongenital-critical region on the *X* chromosome; o nome actual do gene é *NROB1*, *N*uclear *R*eceptor subfamily *O*, group *B*, member 1) e *SOX3* (Xq26-27). Os genes *DAX1* e *SOX3* recrutam o repressor N-CoR que silencia o *NR5A1*, pelo que são genes que tendem a impedir a determinação do testículo na gónada bipotente e a favorecer a determinação em ovário (Fig. 3). Porém, o gene *SRY* consegue contrariar

totalmente a acção feminizante dos genes *NROB1* e *SOX3*.^(11,12)

A activação do gene *SRY* nas células pré-Sertoli leva à potenciação dos genes *SOX8*, *SOX9* (que mimetizam o *SRY*), *NR5A1* e *WT1*. Nesta fase, o gene *NR5A1* actua sinergicamente com o gene *WT1* e interage com os genes *SOX9*, *SOX8* e *GATA4*. Por seu lado, o gene *WT1* transcreve a isoforma +KTS (mRNA de splicing alternativo do exão 9, com os aminoácidos KTS). Destas acções, resulta a transformação das células pré-Sertoli em células de Sertoli.^(11,12,15)

Nas células de Sertoli, o *NR5A1* em conjunto com o *GATA4* e *SOX8* activam a transcrição do gene *AMH* e dos genes envolvidos na síntese das hormonas esteróides (gonadotrofinas, testosterona, aromatase/estrogénios). Uma vez secretada pelas células de Sertoli, a proteína AMH liga-se ao receptor de tipo II (AMHRII) presente nas células mesenquimatosas que envolvem o canal de Muller. Esta ligação desencadeia a expressão da metaloproteinase proMMP2. O gene *WNT7*, expresso no epitélio do canal de Muller, induz a expressão do receptor AMHRII e da metaloproteinase MMP14 nas células mesenquimatosas que envolvem o canal de Muller. Por seu lado, o epitélio do canal de Muller é mantido pela acção do gene *WNT4*, expresso nas células mesenquimatosas. Neste esquema, a regressão do canal mesonéfrico é induzido pela AMH, uma vez que as metaloproteinases secretadas pelas células mesenquimatosas digerem a lâmina basal e induzem a apoptose das células epiteliais do canal de Muller (Fig. 3).⁽⁸⁾

A célula de Sertoli também induz, directa ou indirectamente por via de factores de crescimento (GF, growth factors), a diferenciação das células de Leydig. Uma vez diferenciadas, as células de Leydig sintetizam testosterona numa sequência de cinco passos enzimáticos, cujas enzimas são controladas por genes autossómicos. Depois de secretada, a testosterona é convertida pela 5 α -redutase-2 (gene *SRDA5A2* no cromossoma 2) a dehidro-

testosterona. Ambas as hormonas se ligam ao receptor de androgénios (gene *AR* em Xq11-q12). Para além da sua acção no desenvolvimento do testículo e na espermatogénese, ambas as hormonas actuam sobre o canal de Wolff, originando a sua diferenciação em duas metades distintas, reprodutora, por acção da testosterona, e urinária, por acção da dehidrotestosterona (Fig. 3).⁽¹¹⁻¹⁵⁾

De seguida, o gene *CFTR* (7q32) medeia a diferenciação da metade reprodutora do canal de Wolff nos canais genitais excretorios masculinos (canais eferentes, epidídimos, canais deferentes, vesículas seminais, canal ejaculador). Pensa-se que o *CFTR* também controla a diferenciação da metade urinária (próstata, uretra, pénis, escroto) (Fig. 3). A diferenciação do canal de Wolff também depende de outros genes, como o *DMPK* (19q13.3) para a metade reprodutora, e *BBS* (*BBS1* em 11q13, *BBS2* em 16q21, *BBS3* em 3p12, *BBS4* em 15q22.3-q23) para a metade urinária.^(8,11,16-18)

A secreção de testosterona pela célula de Leydig é inicialmente independente das gonadotrofinas mas encontra-se na dependência da HCG. Após o nascimento e na puberdade, a proliferação e maturação das células de Leydig depende da LH (*LHβ* em 19q13.32) e do seu receptor (*LHR* em 2p21). Nessa fase, a proliferação e a diferenciação das células de Sertoli e das células germinais também são controladas pelas gonadotrofinas (*GnRH* em Xp22; *KALX* e *KAL1* em Xp22.3).⁽¹¹⁾

Existem duas etapas na migração do testículo da cavidade abdominal para o escroto, transabdominal e inguino-escrotal. Em ambas as etapas, o processo parece ser comandado pelo mesentério genital que liga as gónadas e os canais genitais excretorios à parede abdominal. Neste processo, o ligamento genital caudal (gubernaculum) sofre uma intensa diferenciação enquanto que o ligamento suspensório cranial regride progressivamente. O primeiro estadio da etapa transabdominal ocorre entre as 10-15 semanas de gestação, ficando os testículos na

região inguinal. A fase inguino-escrotal termina com o nascimento. Durante esta etapa, os testículos migram para o escroto, ao mesmo tempo que o cordão do gubernaculum encurta, o bolbo do gubernaculum expande e o músculo cremaster se everte. A descida testicular é controlada hormonalmente. Neste processo, a testosterona inibe o crescimento do ligamento suspensório cranial (via *SRDA5A2*). O gene *GRE-AT* (13q12-13) controla a diferenciação do gubernaculum e o seu produto é um receptor ao qual se liga a relaxina, o produto do gene *ILF3*. Vários outros genes têm sido implicados nesta descida, como o *BBS* (11q, 16q, 3p, 15q), *NS* (12q22qter), *FDG1* (Xp11.21) e *P57* (11p15.5).^(8,11)

Finalmente, a espermatogénese é controlada por inúmeras hormonas, factores de crescimento e interleucinas,^(19,20) bem como por inúmeros factores que controlam o ciclo celular,⁽²¹⁻²³⁾ o ciclo mitocondrial e a apoptose.⁽²⁴⁾ No entanto, é na região AZF (Yq11.2) do cromosoma Y que se posicionam as sequências de maior importância no controle do epitélio germinativo. Sabe-se que a deleção da região AZFa provoca a ausência de células germinais nos túbulos seminíferos (originando o síndrome de células de Sertoli),⁽²⁵⁾ a deleção da região AZFb provoca paragem em meiose, e as deleções da região AZFc ou as microdeleções das cópias 1+2 do gene *DAZ*, situado em AZFc, destroem a espermiogénese, originando hipo-espermatogénese ou oligozoospermia severa.^(26,27)

INTERSEX. I. GENES INVOLVED IN MALE SEX DETERMINATION

ABSTRACT

In this article we update the embryology of the male reproductive system and present the genes that control sex determination (gonadal sex) and sex differentiation (genital sex). In the embryonic bipotent gonad, the *NR5A1*(*SF1*) and *WT1*(-KTS) genes interact to activate the *SRY* gene, whereas the interaction between the

WNT4 and *WT1*(-KTS) genes activate the feminizing genes *NROB1*(*DAX1*) and *SOX3*. *SRY* then causes the determination of the bipotent gonad into the testicle, by inducing Sertoli cell differentiation and by inhibiting *DAX1*/*SOX3*. Sex differentiation is thereafter a consequence of *SOX8*, *SOX9*, *NR5A1*, *GATA4* and *WT1*(+KTS) gene interaction under *SRY* potentiation. In this mechanism, Sertoli cells secrete the anti-mullerian hormone (AMH) and cause Leydig cell differentiation. AMH declanches the atrophy of the Muller ducts and therein impedes development of the female phenotype. Under the control of corionic gonadotrofin (HCG), Leydig cells secrete testosterone, which is then partially metabolized into 5-dihydro-testosterone. Under the control of the *CFTR* gene, testosterone promotes the differentiation of the Wolff ducts into a reproductive half (efferent ducts, epididymis, vasa deferens, seminal vesicles, ejaculatory ducts), whereas 5-dihydro-testosterone induces the differentiation of the Wolff ducts into a urinary half (prostate, uretra, penis, scrotum).

Key-words: Embryology, testicle, sex determination, sexual differentiation, genetic mechanisms.

Nascer e Crescer 2005; 14(4): 292-299

BIBLIOGRAFIA

1. Ballesta F. Estados intersexuales. In: Egozcue J et al, editors. Genética Medica. Barcelona: Editorial Espaxs; 1978. p. 313-23.
2. Sousa M. Fertilização Animal. In: Azevedo C, editor. Biologia Celular e Molecular. Porto: Edições Técnicas Lidel; 2005. p. 447-60.
3. Sousa M, Barros A. Aspectos biológicos da fecundação humana. Rev Ginecol Med Reprod 2001; 25:7-22.
4. Brookes M, Zietman A. Clinical Embryology. Boca Raton: CRC Press; 1998.
5. Czyba JC, Montella A. Biologie de la Reproduction Humaine. Montpellier: Sauramps Médical; 1993.

6. David G, Haegel P. Embryologie. I. Embryogenèse. Paris: Masson & Compagnie; 1975.
7. Junqueira LCU, Zago D. Fundamentos de Embriologia Humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1977.
8. Sadler TW. Langman Medical Embryology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer Company; 2000.
9. Sousa M, Fernandes S, Barros A. Os genes e o homem infértil. In: Moreira A, editor. Andrologia Clínica. Porto: Sociedade Portuguesa de Andrologia; 2000. p. 195-222.
10. Tuchmann-Duplessis H, Haegel P. Embryologie. II. Organogenèse. Paris: Masson & Compagnie; 1974.
11. Fauser BCJM. Reproductive Medicine. Boca Raton: Parthenon Publishing Group, CRC Press Company; 2003; 539-666.
12. Kucinkas L, Just W. Human male sex determination and sexual differentiation: pathways, molecular interactions and genetic disorders. Medicina (Kaunas) 2005; 41:633-40.
13. Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BR. Principles and Practice of Medical Genetics. Vols I and II. London: Churchill Livingstone; 2002.
14. Vogel F, Motulsky AG. Human Genetics. Berlin: Springer; 1996.
15. Kanai Y, Hiramatsu R, Matoba S, Kidokoro T. From SRY to SOX9: mammalian testis differentiation. J Biochem 2005; 138:13-9.
16. Grangeia A, Niel F, Ardalan A, Carvalho F, Fernandes S, Girodon E, Silva J, Sousa M, Barros A. Characterization of *CFTR* mutations and IVS8-T variants in Portuguese patients with CAVD. Hum Reprod 2004; 19:2502-8.
17. Grangeia A, Carvalho F, Fernandes S, Silva J, Sousa M, Barros A. A novel missense mutation P1290S at exon 20 of the *CFTR* gene in a portuguese patient with congenital bilateral absence of the vas deferens. Fertil Steril 2005; 83:448-51.
18. Grangeia A, Carvalho F, Fernandes S, Silva J, Sousa M, Barros A. P1290S missense mutation at *CFTR* gene in a portuguese patient with congenital bilateral absence of the vas deferens. Urol Rev 2005; 3:62-5.
19. Sousa M, Cremades C, Alves C, Silva J, Barros A. Developmental potential of human spermatogenic cells cocultured with Sertoli cells. Hum Reprod 2002; 17:161-72.
20. Sousa M, Cremades N, Silva J, Oliveira C, Teixeira da Silva J, Viana P, Ferrás L, Barros A. Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. Hum Reprod 2002; 17:1800-10.
21. Alves C, Carvalho F, Cremades N, Sousa M, Barros A. Unique (Y;13) translocation in a male with oligozoospermia. Cytogenetic and molecular studies. Eur J Hum Genet 2002; 10:467-74.
22. Pinho MJ, Neves R, Costa P, Ferrás C, Sousa M, Alves C, Almeida C, Fernandes S, Silva J, Ferrás L, Barros A. Unique (Yq12;1q12) translocation with loss of the heterochromatic region of chromosome 1 in a male with azoospermia due to meiotic arrest. Hum Reprod 2005; 20:689-96.
23. Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Altered genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. Lancet 2004; 363:1700-2.
24. Almeida C, Cardoso M, Sousa M, Viana P, Gonçalves A, Silva J, Barros A. Quantitative study of case-3 activity in the ejaculate and swim-up regarding semen quality. Hum Reprod 2005; 20:1307-13.
25. Kamp C, Huellen K, Fernandes S, Sousa M, Schlegel PN, Mielnik A, Kleiman S, Yavetz H, Krause W, Kupker W, Johannisson R, Schulze W, Weidner W, Barros A, Vogt PH. High deletion frequency of the complete AZFa sequence occurs only in men with Sertoli-cell-only-syndrome. Mol. Hum Reprod 2001; 7:987-94.
26. Fernandes S, Huellen K, Gonçalves J, Dukal H, Zeisler J, de Meyts ER, Skakkebaek NE, Habermann B, Krause W, Sousa M, Barros A, Vogt PH. High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. Mol Hum Reprod 2002; 8:286-98.
27. Ferrás C, Fernandes S, Marques CJ, Carvalho F, Alves C, Silva J, Sousa M, Barros A. AZF and DAZ gene copy specific deletion analysis in maturation arrest and Sertoli cell only syndrome. Mol Hum Reprod 2004; 10:755-61.

CORRESPONDÊNCIA

Mário Sousa
Laboratório de Biologia Celular
Instituto de Ciências Biomédicas de
Abel Salazar
Universidade do Porto
Largo do Prof. Abel Salazar 2
4099-003 PORTO, Portugal
Tel: 222 062 217
Fax: 222 062 232
msousa@icbas.up.pt