

Lenira Cristina Stella

**ORIGEM EMBRIONÁRIA E ASPECTOS CLÍNICOS DO
HERMAFRODITISMO VERDADEIRO QUIMERA 46,XX/46,XY**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para a obtenção do título de mestre em Ciências.

SÃO PAULO
2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Lenira Cristina Stella

**ORIGEM EMBRIONÁRIA E ASPECTOS CLÍNICOS DO
HERMAFRODITISMO VERDADEIRO QUIMERA 46,XX/46,XY**

Orientadora:

Prof. Dra Ieda Therezinha do Nascimento Verreschi

Co – Orientadora:

Dra Mônica Vannucci Nunes Lipay

Coordenador:

Prof. Dr. Sérgio Atala Dib

SÃO PAULO
2006

Stella, Lenira Cristina

Origem Embrionária E Aspectos Clínicos Do Hermafroditismo Verdadeiro Quimera 46,XX/46,XY / Lenira Cristina Stella – São Paulo, 2006.

IV, 49 páginas

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Título em inglês: Embryonic origin and clinical presentation of True Hermaphroditism Chimera XX/XY

Unitermos: ambigüidade genital, antígenos leucocitários humanos, campo misto, eixo embrionário, fertilização, fenotipagem de grupos sanguíneos, hermafroditismo verdadeiro

“É impossível fazer, de repente, tábua rasa dos conhecimentos usuais. Frente ao real, o que se acredita saber claramente ofusca o que se devia saber. Quando se apresenta ante a cultura científica, o espírito jamais é jovem. É até muito velho, pois tem a idade dos seus preconceitos. Ter acesso à ciência é rejuvenescer espiritualmente, aceitar uma mutação brusca que há de contradizer um passado”.

Bachelard,G., *La formation de l'esprit scientifique*

Dedico...

... àqueles que me apóiam desde sempre e deram condições de chegar ao ponto de iniciar uma tese, Catarina e Jamil, meus pais, e meu irmão Edmilson. Também dedico ao Danilo, que passa a caminhar com a gente.

Agradeço...

... a todos os que participaram direta ou indiretamente desta tese, e a Deus presente em cada um.

INDICE

1- Introdução.....	01
1.1 – Resumo.....	01
1.2 – Hermafroditismo verdadeiro XX/XY	02
1.3 - Da fecundação aos primeiros quinze dias do desenvolvimento humano.....	03
1.4 - Mecanismos de formação de mosaicos e quimeras.....	07
1.5 -Técnicas de reprodução assistida e anormalidades cromossômicas.....	09
1.6 – Conclusão.....	12
1.7 – Bibliografia.....	13
2 - Artigo 1: “Hermafroditismo Verdadeiro quimera como modelo único de padrão hematológico e HLA duplo”	17
<i>“True Hermaphroditism Chimera as a Hematological Unique Pattern and Double HLA Model”</i>	
3- Anexo I – Estudo Genético.....	29
4 -Anexo II: Consentimento Informado.....	31
5-Anexo III: Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa.....	33
6 - Artigo 2: “Hermafroditismo Verdadeiro Quimera 46,XX/46,XY: da origem à relevância clínica”.....	34
<i>“True Hermaphroditism Chimera 46,XX/46,XY: from embryonic origin to clinical relevance”</i>	
7 – Comentário final.....	49

INTRODUÇÃO

1.1 – RESUMO

O Hermafroditismo Verdadeiro, uma condição rara, é indistinguível fenotipicamente de outras anormalidades de intersexualidade. Quimerismo é a presença de células de dois ou mais zigotos no mesmo indivíduo, e tem como principal diagnóstico diferencial o mosaicismo. As quimeras podem ser originadas por singamia ou pela associação de células de diferentes zigotos. A divisão partenogénica e a aneuploidia 47,XXY podem explicar o mecanismo de singamia, o qual apresenta os mesmos polimorfismos haplóides maternos. Na fusão de dois diferentes zigotos, o indivíduo quimera resultante necessariamente apresenta dois genótipos maternos e paternos, na pesquisa de polimorfismos de DNA. A suspeita diagnóstica de quimerismo pode surgir na presença de ambigüidade genital ou a partir da dificuldade na determinação do grupo sanguíneo em quimeras ocultas. A fenotipagem das hemáceas revela campo misto na presença de duas ou mais populações distintas e a determinação do HLA pode revelar mais de dois conjuntos haplóides, a exemplo do caso estudado nesta tese.

As condições de concepção influenciam a expressão gênica, embora por mecanismos ainda pouco determinados. A fertilização normal ocorre nas Trompas de Falópio; o espermatozóide escolhido reconhece a proteína integrina do óvulo, e a fusão de ambos os pronúcleos resulta no zigoto diplóide unicelular. A polaridade do embrião começa imediatamente antes da gastrulação e a disposição das células determina mudanças dinâmicas no padrão de expressão gênica. O primeiro eixo de clivagem, o eixo embriônico-abembriônico, polariza a massa celular interna, e o segundo eixo é orientado pelo corpo polar e estabelece a simetria do embrião. A relação entre o

útero e o embrião orienta a polaridade do embrião e o ambiente da implantação. A fertilização assistida interfere na orientação do polo embrionário e na implantação.

1.2 - HERMAFRODITISMO VERDADEIRO XX/XY

O hermafroditismo verdadeiro (HV), fenômeno incomum, não se distingue fenotipicamente de outras manifestações de estados intersexuais resultantes de alterações na expressão da seqüência de genes que culminam com a diferenciação sexual humana normal.

No HV, a genitália externa varia desde feminina normal a masculina normal, mas usualmente diversos graus de ambigüidade são observados e o desenvolvimento de mamas pode ocorrer na puberdade (1). Quanto à genitália interna, o desenvolvimento de ductos de Wolff ou de Müller depende da capacidade funcional do testículo presente (2). As formações ductais coincidem com a gônada ipsilateral.

Histologicamente evidencia-se a presença de tecido ovariano e testicular no mesmo indivíduo, fato que pode ocorrer numa mesma gônada (ovotestis) ou em gônadas separadas. A combinação das gônadas é variável: ovotestis bilateral, ovotestis unilateral e tecido gonadal específico contralateral, ou ovário de um lado e testículo de outro (3). A forma mais freqüente é ovotestis unilateral com ovário contralateral. Para que o diagnóstico seja firmado, deve-se demonstrar a presença de folículos e a capacidade de ovogênese no tecido ovariano, bem como túbulos seminíferos bem diferenciados no tecido testicular (4).

O cariótipo mais prevalente no HV é 46, XX ocorrendo em 80 a 90 % das vezes; 5 a 10% são 46, XY e 5 a 10% são quimeras ou mosaicos XX/XY (4). Diz-se quimera à presença de células derivadas de dois ou mais zigotos num único indivíduo (5,6). O mosaicismo é o principal

diagnóstico diferencial e difere pela constatação de apenas dois conjuntos haplóides, redistribuídos por erros de divisão celular, em diferentes linhagens de células (6). Dois são os tipos de quimeras humanas, aqueles derivados de singamia e outros pela junção de células oriundas de dois indivíduos diferentes.

A singamia se caracteriza pela presença de mais de dois conjuntos haplóides no mesmo indivíduo, inferindo a participação de, pelo menos, três gametas na formação do indivíduo quimera. Quando se trata de singamia, os marcadores de polimorfismos maternos têm que ser pelo menos complementares, e os paternos, necessariamente independentes. A associação de células de indivíduos diferentes ocorre pela fusão precoce de dois embriões, ou também pela circulação placentária de gêmeos dizigóticos, trocas materno-fetais e enxertos de tecidos ou transfusão sanguínea (6).

As alterações genéticas capazes de originar uma quimera ocorrem numa fase precoce após a concepção, o que exige o estudo cuidadoso deste período na compreensão de sua formação.

1.3–DA FECUNDAÇÃO AOS PRIMEIROS QUINZE DIAS DO DESENVOLVIMENTO HUMANO

O processo da fecundação se dá em várias etapas que serão descritas a seguir. Necessariamente inicia-se com gametas materno e paterno quiescentes, ou seja, o ovócito parado no estágio de metáfase da meiose II e o espermatozóide parado após a conclusão da meiose II (7,8).

Cerca de 2,5 milhões de ovócitos existem no recém nascido do sexo feminino, dos quais apenas 400 chegam a tornar-se maduros no menacme. Do nascimento até a maturidade sexual os ovócitos primários permanecem em prófase I, completando a meiose I na ovulação. Em seguida dá

início à meiose II até o estágio de metáfase, que só se completará se houver fertilização (9). Ao final da meiose I e da meiose II formam-se respectivamente, o primeiro e o segundo corpúsculos polares, que são pequenas células não funcionantes de rápida involução.

O espermatozóide é composto por cabeça, colo e cauda. Recobrimo parte da cabeça encontra-se o acrossoma, que contém várias enzimas como a acrosina e a hialuronidase, como facilitadores da penetração na *corona radiata* e zona pelúcida do óvulo (10). Para tanto, o reconhecimento entre os gametas se faz através da interação da enzima galactosil transferase, presente na cabeça do espermatozóide que transforma quimicamente a glicoproteína ZP3 da zona pelúcida do óvulo. A interação do espermatozóide com as proteínas externas do óvulo terminam por retirar o gameta masculino da quiescência genética (7).

A fertilização ocorre na tuba uterina e, embora inúmeros espermatozoides estejam presentes, uma série de eventos bioquímicos impede a entrada de mais de um espermatozóide no ovócito. O bloqueio à polispermia é desencadeado pelo entrecruzamento de resíduos tirosina catalisados por uma peroxidase dos grânulos corticais do espermatozóide internalizado, levando à proteólise da zona pelúcida cujos peptídeos se redistribuem convertendo-a de cobertura porosa em malha impermeável (7).

Os cromossomos do óvulo e do espermatozóide, cada qual envolto pela membrana nuclear formam os pronúcleos, momento no qual o óvulo sai da quiescência. Na membrana acrossômica do espermatozóide, proteínas conhecidas como *fertilinas* reconhecem suas respectivas ligantes no óvulo, as *integrinas*. A fusão de ambos origina o zigoto diplóide unicelular. A partir do ponto de penetração do espermatozóide ocorre uma hiperpolarização do óvulo e aumento nos níveis intracelulares de cálcio, modificando o citoesqueleto e permitindo a formação de microtúbulos que incluem o pronúcleo masculino (7).

O zigoto sofre subseqüentes clivagens, originando células menores, os blastômeros que, ao atingirem 12 ou mais unidades são reconhecidos como mórula. A partir de então forma-se uma cavidade na mórula, a cavidade blastocística, convertendo-a em blastocisto. No blastocisto, uma massa celular interna origina o embrião e parte dos tecidos embrionários, e uma delgada camada celular externa origina o trofoblasto para as estruturas extra-embrionárias e porção fetal da placenta (10). No estágio subseqüente de disco embrionário tridérmico, diferenciam-se as três camadas germinativas, ectoderma, mesoderma e endoderma (figura 1).

Estudos a respeito da orientação espacial do embrião indicam que a polarização das células não ocorre aleatoriamente. A polaridade do embrião inicia-se imediatamente antes da gastrulação, e a disposição das células acompanha-se de mudanças dinâmicas nos padrões de expressão gênica (11). Segundo Lewis Wolpert, “Não é o nascimento, casamento ou morte, mas a gastrulação que é o tempo verdadeiramente importante na nossa vida” (12).

Na implantação, a interação do embrião com o útero influencia sua orientação espacial, e assimetrias locais talvez possam alterar a sua polaridade. Alguns genes aparentemente guiam o sentido da polaridade na passagem do formato esférico para cilíndrico do embrião, mas linhas de orientação podem ser traçadas a partir da própria estrutura embrionária. O primeiro, eixo embriônico-abembriônico, torna-se evidente com a formação da cavidade blastocística. Este eixo polariza a massa interna de células em direção ao pólo embrionário, e a cavidade blastocística para o lado oposto, dita região abembriônica. O sítio de penetração do espermatozóide se correlaciona com o local da primeira clivagem na maioria dos zigotos e parece orientar o sentido dos fusos mitóticos de acordo com as mudanças de formato do embrião (13). O segundo eixo passa pelo corpo polar e estabelece a simetria do blastocisto, momento em que sutilmente deixa a forma regularmente esférica e assume a forma achatada e ligeiramente cilíndrica. As células do endoderma visceral próximas ao corpúsculo polar tendem a alocar-se progressivamente em regiões mais distantes do

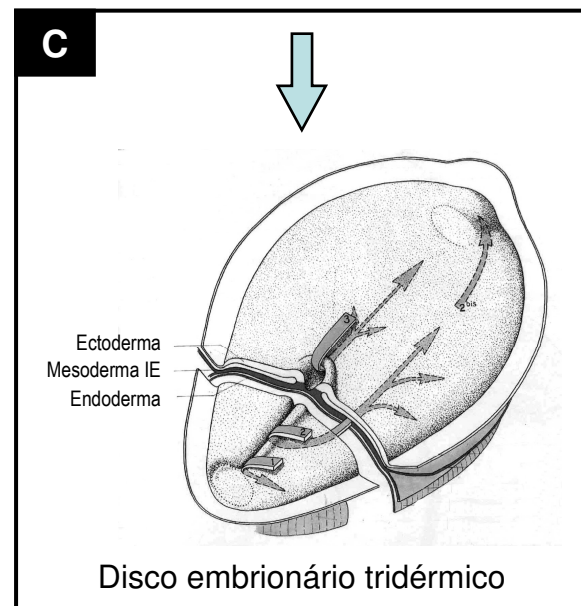
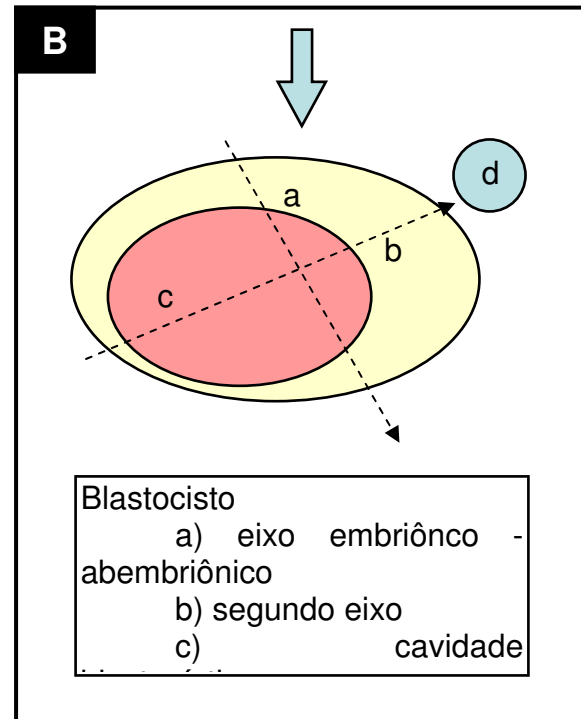
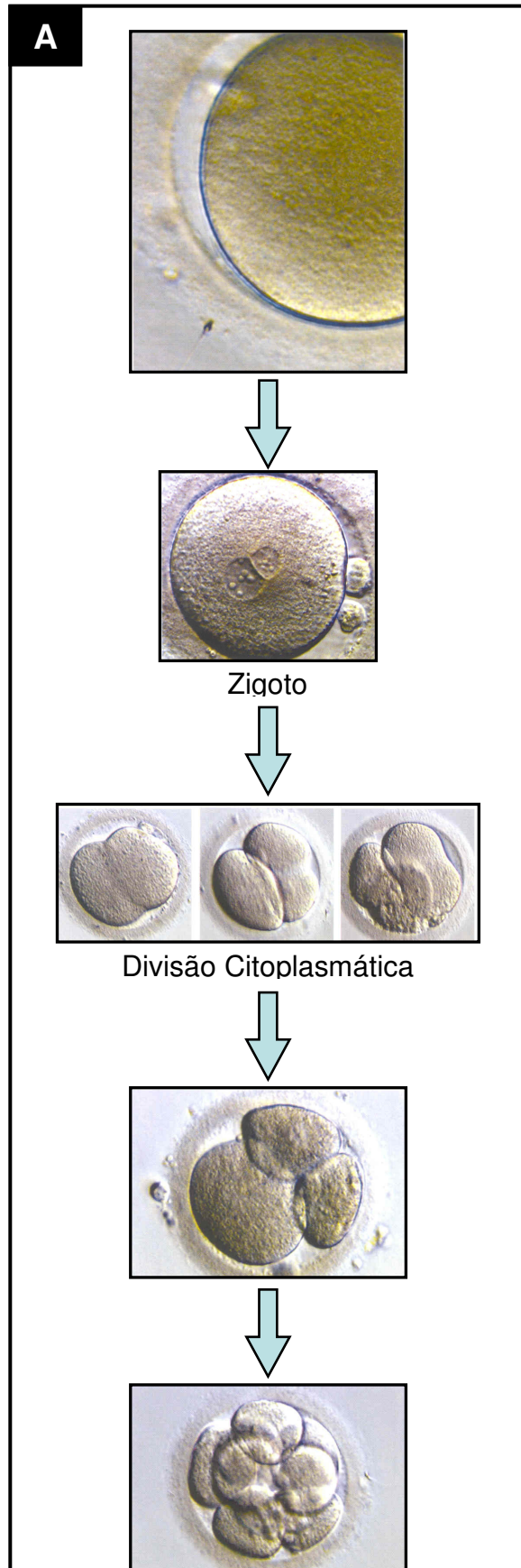


Figura 1: A fecundação e primeiras divisões do embrião (A) após a fertilização, os pronúcleos se unem formando o zigoto unicelular que, ao se dividir passa pelos estágios de 3 células, mórula, blastocisto (B) e disco embrionário tridérmico (C).

embrião cilíndrico, enquanto aquelas originalmente distantes do corpúsculo polar, ocupam posições mais proximais (11). Após concluídas a primeira e a segunda clivagens, apresenta-se uma fase de quatro blastômeros, seguramente não arranjados ao acaso.

1.4- MECANISMOS DE FORMAÇÃO DE MOSAICOS E QUIMERAS

A simples avaliação do fenótipo de um indivíduo quimera ou portador de mosaicismo não permite esclarecer o mecanismo que lhe deu origem. De acordo com o estágio de desenvolvimento em que se instalou o quimerismo ou o mosaicismo, e também da potência das células, o fenótipo do indivíduo resultante pode ser altamente variável. Não há limitação de número de combinações possíveis para embriões mutantes (14).

Pela técnica de FISH (*fluorescence in-situ hybridization*) diferentes anormalidades cromossômicas podem ser detectadas, tais como aneuploidia, haploidia, poliploidia e mosaicismo. As aneuploidias compreendem as monossomias e trissomias, respectivamente na falta de um cromossomo de um determinado par ou na sua presença supranumerária. Diz-se mosaico haplóide para o embrião onde cada cromossomo tem origem diversa da origem do seu par, em cada célula. Poliploidia é a presença de três ou mais cópias do mesmo cromossomo em cada célula, coexistindo ou não com uma linhagem celular normal (15). Entretanto, outros rearranjos estruturais podem ocorrer, sem alterar o conteúdo diplóide da célula, tais como deleção cromossômica parcial ou duplicação por *crossing over* desigual, inversão, translocação e mosaicismo diplóide.

Numa série brasileira de dez casos de HV, o cariótipo 46,XX/46,XY foi encontrado em dois pacientes (16). Habitualmente, o cariótipo 46,XX/46,XY encontrado em hermafroditas verdadeiros é atribuído a quimerismo por fusão de dois embriões (17). Quando se trata de quimerismo por fusão de

diferentes zigotos, ao menos dois haplótipos paternos e dois maternos são demonstrados pela comparação de polimorfismos de DNA (18). Se este tipo de herança não estiver presente, outros mecanismos são possíveis para explicar a formação do zigoto mutante (17,18,19).

O primeiro deles ocorreria pela divisão partenogenética de um óvulo haplóide, originando 2 haplótipos idênticos no mesmo óvulo que, posteriormente sendo fecundado por dois espermatozóides diferentes. As duas células diplóides resultantes da primeira divisão apresentariam os mesmos polimorfismos maternos, com diferentes polimorfismos paternos. A fecundação dupla de um folículo binovular ou dois oócitos envoltos pela mesma zona pelúcida foi descrita em animais e colocada como possível em humanos (20). Ford (6), em 1969, propôs a presença de polimorfismos maternos correlatos com polimorfismos paternos independentes através da fecundação do ovócito e do primeiro ou do segundo corpúsculo polar por diferentes espermatozóides.

O segundo mecanismo proposto também envolve a divisão partenogenética de um óvulo haplóide, originando 2 haplótipos idênticos no mesmo óvulo que, sendo fecundado posteriormente por apenas um espermatozóide, originando uma célula de três haplótipos. Esta célula se reorganizaria agrupando um haplótipo materno com o material genético do espermatozóide, passando o haplótipo materno restante por um processo de diploidização, originando uma célula diplóide com 2 haplótipos idênticos.

O terceiro e o quarto mecanismos partem de uma célula 47,XXY. Pelo terceiro mecanismo proposto, precocemente durante a embriogênese ocorreriam duas não-disjunções seqüenciais: uma originando a célula 47,XXY inicial, e a outra a partir das suas células filhas, originando uma célula poliplóide de 48 cromossomos e uma célula diplóide. Assim, as linhagens possíveis formadas seriam 48, XXXY e 46,XY, ou 46,XX e 48,XXYY de cada célula filha. As células poliplóides tendem a ser confinadas nos tecidos extra-embriônicos e seu número é muito baixo para ser detectado na contagem do cariótipo. Desta maneira, coexistiriam as linhagens 46,XX/46,XY no zigoto.

Por fim, a quarta possibilidade parte de uma célula 47,XXY que, na primeira divisão mitótica origina uma linhagem 46,XX e outra 48,XXYY, esta sofrendo uma segunda não-disjunção seqüencial originando uma linhagem 46,XY e outra linhagem que se perde (figura 2).

O estudo dos polimorfismos genéticos permite avaliar a origem das linhagens presentes, de modo a detectar a contribuição de mais de um gameta paterno e/ou materno.

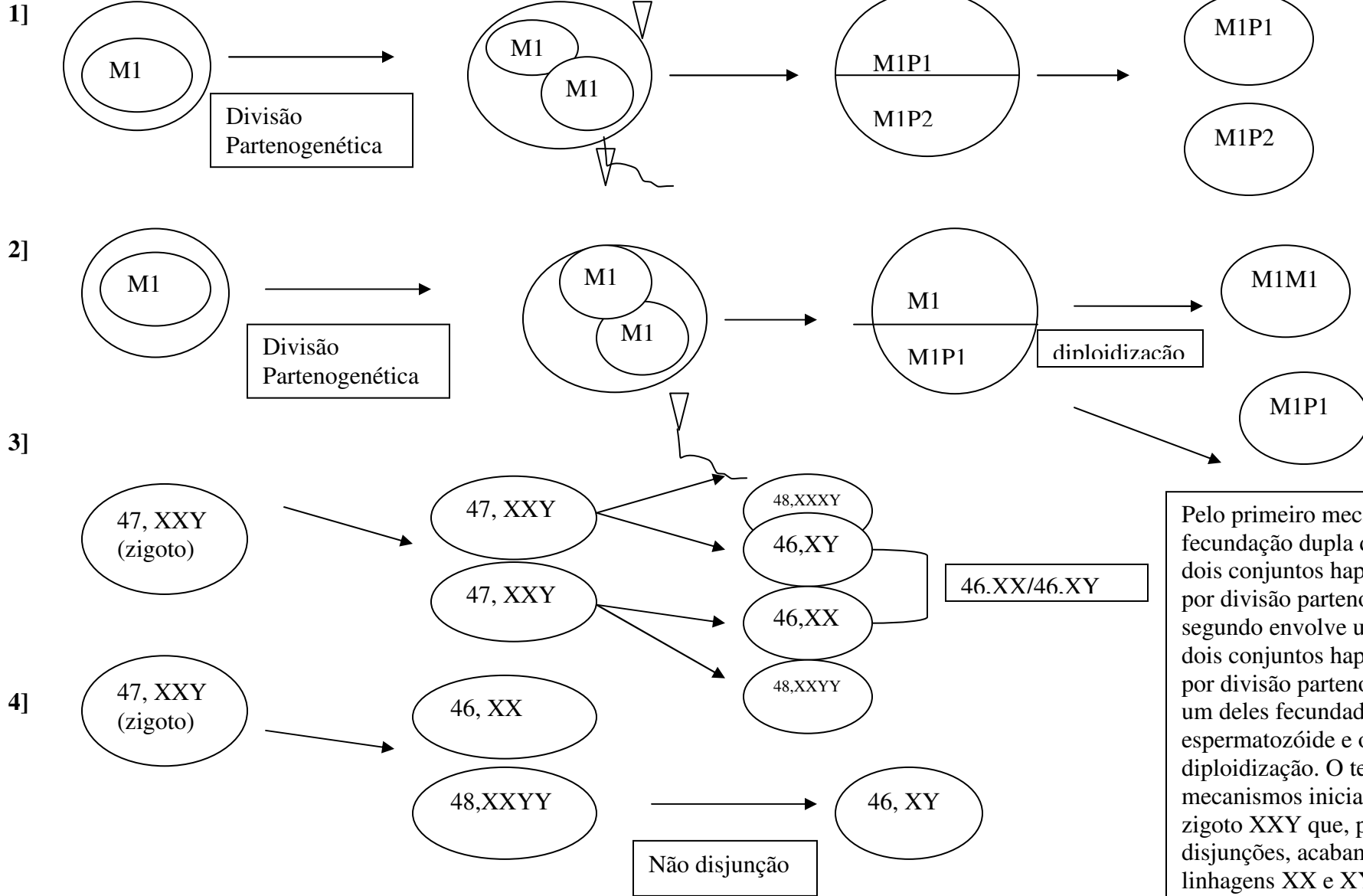
1.5- TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA E ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS

Na reprodução assistida são utilizadas mais freqüentemente duas técnicas: a fertilização *in vitro* (FIV) com a transferência dos embriões e a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (IICE). Ambas partem do óvulo aspirado, sendo que na FIV este é exposto a inúmeros espermatozóides, tal como ocorreria fisiologicamente, enquanto na IICE apenas um espermatozóide é injetado no óvulo (7).

A disseminação das técnicas de reprodução assistida (TRA) como forma de remediar a infertilidade levou ao seu aprimoramento, porém, se por um lado alcançam sucesso em situações extremas, por outro se tornaram mais invasivas e artificiais. A partir da descrição de casos oriundos de TRA (5,21,22), características próprias podem ser atribuídas a estas pessoas, e problemas decorrentes da técnica passam a ser relevantes clinicamente.

Muitos casais que buscam TRA o fazem devido a fatores masculinos de infertilidade. Postula-se que criptorquia, hipospádia, oligospermia e outras patologias que comprometem a fertilidade possam se originar ainda na vida intrauterina, entretanto, a maioria dos recém nascidos com malformações de genitália externa não evidencia defeito cromossômico sugerindo desordens

Figura 2: Esquemas dos possíveis mecanismos para a formação de um HV quimera



Pelo primeiro mecanismo ocorre a fecundação dupla de um óvulo com dois conjuntos haplóides originados por divisão partenogenética. O segundo envolve um óvulo com dois conjuntos haplóides originados por divisão partenogenética, porém um deles fecundado por espermatozóide e o outro passa por diploidização. O terceiro e quarto mecanismos iniciam-se de um zigoto XXY que, por diferentes não disjunções, acabam por originar linhagens XX e XY concomitantes.

M = materno
P = paterno

reprodutivas com origem antenatal sob influências ambientais (23). A exposição paterna a pesticidas constitui-se em risco aumentado de criptorquia, e a presença de hipospádia correlaciona-se com baixo peso ao nascer, status de saúde materno e tabagismo paterno (24). Também, disruptores hormonais como ftalatos interferem no desenvolvimento embrionário causando hipospádias (25).

A presença de oligospermia masculina correlaciona-se com risco aumentado de triploidia por espermatozóide $2n$ não reduzido na meiose (26), ao que se soma o fator feminino, pois quanto mais avançada a idade materna, maior a frequência de aneuploidia no embrião gerado (27). O diagnóstico prenatal, principalmente proveniente de estudos por FISH, têm demonstrado uma frequência maior de aneuploidia, haploidia e poliploidia do que o registrado em recém nascidos. Fato este, possivelmente decorrente da perda dos embriões mosaicos durante o primeiro trimestre da gestação. Dentre várias motivações da busca por TRA, as causas de infertilidade tais como idade materna avançada e oligospermia talvez se constituam mecanismos de defesa naturalmente imposto pelo organismo na tentativa de evitar a geração de um indivíduo portador de cromossomopatia, ainda mais provável pela condição adversa subjacente. O processo natural de fecundação se equipara a um “filtro biológico”, selecionando espermatozoides normais e maduros, explicando a menor viabilidade dos embriões gerados por TRA (7).

A avaliação de 216 embriões originados por TRA (IICE ou FIV) revelou que apenas 29,6% deles portavam cromossomos diplóides, sendo que 70% possuíam aneuploidia (27). Outra série de 245 embriões obtidos por FIV e 136 por IICE mostrou anormalidade cromossômica em 66% e 58%, respectivamente, sendo o mosaicismo a anormalidade cromossômica mais freqüente, prevalente em 40% da amostra a despeito da técnica empregada (6).

Os estudos com embriões produzidos por TRA permitiram compreender as cromossomopatias humanas, até então observadas como abortos em gestações espontâneas. Entretanto, dada a impossibilidade da comparação com gestações naturais, não se pode

numericamente comprovar o aumento destas anormalidades produzidas pelas TRA. Por outro lado, doenças antes consideradas raras, agora relatadas em pessoas nascidas por TRA, sugere fortemente esta associação (5). Parece haver maior prevalência de tumores tal como o risco 3 vezes maior nas crianças nascidas por TRA (22). Estudos têm sugerido que as crianças nascidas por TRA têm risco aumentado para defeitos congênitos, prematuridade, baixo peso, atraso no desenvolvimento neurológico e anormalidades genéticas. Há alguma evidência do maior risco de desordens resultantes de erros de *imprinting* durante a embriogênese precoce tais como a Síndrome de Angelman e Síndrome de Beckwith-Wiedemann (28).

Os dados disponíveis sobre a segurança dos nascidos por TRA são inconclusivos, mas devem ser cuidadosamente considerados.

1.6 - CONCLUSÃO

O HV representa uma causa rara dos distúrbios da diferenciação sexual, e sua formação quimérica, ainda mais incomum, remete ao estudo da embriogênese normal a fim de se compreender os passos do desenvolvimento humano.

O mecanismo normal de preparação do óvulo, a seleção de um único espermatozóide e a fertilização parecem ocorrer sob rigoroso controle, haja visto a orientação espacial do embrião, guiada pelos eixos de orientação da própria estrutura recém formada. Estes eventos não randômicos, finamente programados, exercem influência sobre o produto final em formação.

Muitos dos mecanismos envolvidos ainda faltam ser esclarecidos. A intervenção humana neste processo potencialmente altera o curso natural do desenvolvimento, ainda sem assegurar a ausência de riscos no produto gerado. A orientação espacial do embrião nem sempre é mantida

durante o procedimento de TRA, porém se desconhece as suas consequências. As anormalidades cromossômicas decorrentes das TRA estão sob estudo, mas outras características únicas de quimeras ainda estão por se conhecer.

1.7- BIBLIOGRAFIA

1- Watchel, S.S (1994) *Molecular genetics of sex determination*. 1st edn, Academic Press, London, UK.

2- Jiménez, A.L., Kofman-Alfaro, S., Berumen, J., Hernandez, E., Canto, P., Mendez, J.P., Zenteno, J.C. (2000) Partially deleted SRY gene confined to testicular tissue in a 46 XX true hermaphrodite without SRY in leukocytic DNA. *Am J Med Genet*, 93, 417-420.

3- Levin, H.S. (2000) Tumors of the testis in intersex syndromes. *Urol Clin North Am*, 27, 543-551. 4- Damario, M.A. and Roch, J.A. (1996) Diagnostic approach to ambiguous genitalia in Adashi, E.Y., Rock, J.A., Rosenwak, Z. *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*. 1st edn, Hippincott Raven Press, Philadelphia, USA, pp 896.

5- Strain, L., Dean, J.C.S., Hamilton, M. P.R., Bonthron, D.T. (1998) A true hermaphrodite chimera resulting from embryo amalgamation after in vitro fertilization. *N Engl J Med*, 15, 166-169.

6- Ford, C.E. (1969) Mosaics and chimeras. *Br Med Bull*, 25, 104-109.

7- Moratalla, N.L. and Elizalde, M.J.I. (2004) Con la fecundación se constituye el cigoto in *Los quince primeros días de una vida humana*. 1st edn, Eunsa Press, Navarra, Spain, pp. 55-93.

8 - Colombo, R. (2006) The process of fertilization and its stages. From parental gametes to a developing one-cell embryo. Proceedings of the XII Annual General Assembly of Pontifical Academy for Life (Vatican City), in press.

9- Willard, T.M.(1993) *Base Cromossômica da Hereditariedade in Genética Médica*, 5nd edn, Guanabara Koogan Press, Rio de Janeiro, BR, pp. 8-21.

10- Moore, K.L. and Persaud T.V.N. (2000) Início do Desenvolvimento Humano: primeira semana.in *Embriologia Clínica*. 6ªed., Guanabara Koogan Press, Rio de Janeiro, BR, pp. 15-43.

11- Zernicka-Goetz, M. (2002) Patterning of the embryo: the first spatial decisions in the life of a mouse. *Development* 129, 815-829.

12- Wolpert, L in Slack, J.M.W. (1993) In *From Egg to Embryo: Determinative events in early development* , Cambridge: Cambridge University Press APUD Zernicka-Goetz, M.(2002) Patterning of the embryo: the first spatial decisions in the life of a mouse. *Development*, 129, 815-829.

13- Piotrowska-Nitsche, K. and Zernicka-Goetz, M. (2005) Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo. *Mechanisms of Development* , 122, 487-500.

14- Rossant J. and Spence A. (1998) Chimeras and mosaics in mouse mutant analysis. *Trends in Genetics* , 14, 358-363.

15- Munné, S., Márquez, C., Reing, A., Garrisi, J., Alikani, M. (1998) Chromosome abnormalities in embryos obtained after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* , 69, 904-908.

16- Guerra, G. Jr., Mello, M.P., Assumpção, J.G., Morcillo, A.M., Marini, S.H.V.L., Baptist,a M.T.M., Silva, R.B.P.E., Marques-de-Faria, A.P., Maciel-Guerra, A.T. (1998) True

Hermaphrodites in the Southeastern Region of Brazil: A Different Cytogenetic and Gonadal Profile. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 11, 519-524.

17- Niu, D.M., Pan, C.C., Lin, C.Y., Hwang, B.T., Chuang, M. (2002) Mosaic or chimera? Revisiting an old hypothesis about the cause of the 46,XX/46,XY hermaphrodite. *The Journal of Pediatrics* , 140, 732-735.

18- Giltay, J.C., Brunt, T., Beemer, F.A., Wit, J.M., Amstel, H.K.P., Pearson, P.L., Wijmenga, C. (1998) Polymorphic detection of parthenogenetic maternal and double paternal contribution to a 46,XX/46,XY hermaphrodite. *Am J Hum Genet*, 62, 937-940.

19- Strain, L., Warner, J.P., Johnston, T., Bonthron, D.T. (1995) A human parthenogenetic chimera. *Nat Genet* , 11, 164-169.

20- Uehara, S., Nata, M., Nagae, M., Sagisaka, K., Okamura, K., Yajima, A. (1995) Molecular biologic analyses of tetragametic chimerism in a true hermaphrodite with 46,XX/46,XY. *Fertil Steril* , 63, 189-192.

21- Pearson, H. (2002) Dual Identities. *Nature* , 417, 10-11.

22- Odone-Filho, V., Cristofani, L.M., Bonassa, E.A.R.N., Braga, P.E.M.P.H., Eluf-Neto, J. (2002) In vitro fertilization and childhood cancer. *J Pediatr Hematol Oncol*, 24, 421-422.

23- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M. (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction* , 5, 972-978.

24 - Pierik, F.H. ,Burdorf, A., Deddens, J.A., Juttman R.E., Weber, R.F. (2004) Maternal and paternal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a case-control study in newborn boys. *Environmental Health Perspectives* ,112, 1570-1576.25- Vrijheid, M., Armstrong, B., Dolk, H., van Tongeren, M., Botting, B. (2003) Risk of hypospadias in

relation to maternal occupational exposure to potential endocrine disrupting chemicals. *Occup Environ Med* ,60, 543-550.

26- Golubovsky, M.D. (2003) Postzygotic diploidization of triploids as a source of unusual cases of mosaicism, chimerism and twinning. *Human Reproduction* ,18, 236-242.

27- Bielanska, M., Tan, S.L., Ao, A. (2002) Chromosomal mosaicism throughout human pre-implantation *in vitro*: incidence, type and relevance to embryo outcome. *Human Reproduction* , 17, 413-419.

28- Speroff L and Fritz MA. (2005) *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*.7nd edn, Lippincott Williams & Wilkins Press, Philadelphia, USA, pp 1239-1251.

2 - Artigo 1:

TRUE HERMAPHRODITISM CHIMERA AS A HEMATOLOGICAL UNIQUE PATTERN AND
DOUBLE HLA MODEL

HERMAFRODITISMO VERDADEIRO QUIMERA COMO MODELO ÚNICO DE PADRÃO
HEMATOLÓGICO E HLA DUPLO

Lenira Cristina Stella¹, José Orlando Bordin², Maria Gerbase de Lima³, Akemi Kuroda Chiba²,
Mônica V. Nunes Lipay⁴, Ieda T.N. Verreschi¹.

¹Division of Endocrinology, ²Hematology, Department of Medicine, ³Division of Immunogenetics, Department of Pediatrics, ⁴Division of Genetics, Department of Morphology, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brazil

Correspondent author:

Ieda T.N. Verreschi, MD, PhD

Rua Löefgren, 2236

São Paulo – SP- Brazil

Zip Code 04040-004

Fone/fax 55-11-55746502

ABSTRACT-

Independent of its fecundation origin true hermaphroditism chimera derives from a zygote with more than two haploid cellular lines. Its prevalence is increasing with the Assisted Reproductive Technology (ART) dissemination. Hidden chimeras research discloses more frequently chimerism in natural pregnancy twins that could complicate future efforts for tailoring drugs treatment or other therapeutical procedures. Chimerism can be confirmed by haplotype determination that can clarify chimerism origin too. Blood-groups-only chimeras are transfusion/transplantation incompatibility problems prone. An infant, conceived by natural pregnancy with genital ambiguity, karyotype 46,XX(53); 46,XY(44); 47,XX+mar(02); 47,XY+mar(01) is described.

Red cell phenotyping studies showed a mixed field with the anti-C reagent, while the HLA evaluation presented three leucocytes antigen haplotypes.

Despite similar parents pattern, the active chimerism investigation in this case with genital ambiguity disclosed both two blood groups and three leucocytes antigen population unveiling a chimeric person as an unique model of immunity. Diseases susceptibility and erratic response to drugs and treatment must be considered in this case.

Due to the growing prevalence of chimerism, the present data call attention for the use of the same approach in ART born children and twins who may need blood transfusion and/or surgical procedure.

KEY WORDS: Genital ambiguity, true hermaphroditism chimera, mixed field, blood group phenotyping, Human Leukocyte Antigen, MCH

True Hermaphroditism (TH) is an uncommon condition in gonadal differentiation, that occurs about 1,2 to 17 cases/100 million people (1). TH characteristic is the presence of viable ovarian and testicular tissues in the same person (2).

External genitalia may present different grades of ambiguity from normal female to normal male appearance. At puberty some breast development occurs in about 88% of hermaphrodites (3). Wolffian ducts or mullerian ducts development depends on the competence of testicular tissue presence (4). Internal ducts are related to the ipsilateral gonad. Follicle and oocytes are usually present in the ovarian tissue whereas germinal cells or tubules and gonias are present in the testis (5,6).

Gonads presentation can be one ovary and one testis at each side, ovary or testis with contralateral ovotestis or ovotestis at both side (7). Most frequent kariotype is 46,XX in 60% of TH. Others 15% are 46,XY kariotype (2). Chromosomal mosaicism containing a Y-chromosome was present in 20,2 %, mainly as 46, XX/46,XY chimerism (1).

Chimera, fabulous monster, with lion head, goat body and dragon tail (Lat. *Chimaer-ae* from greek *khimaira*) derives from a zygote with more than two haploid cellular lines This makes it diverse from mosaics because mosaics are formed by different lineage cells from the same zygote (8,9,10). Chimerism diagnosis is often difficult to be reach because it can be partial like the bone marrow cells exchange between dizigotic twins (11). Phenotypically normal female or male chimeras may present XX/XX or XY/XY, and sometimes, XX/XY kariotype (12). Red cell phenotyping for uncorrelated purposes could be the first way to diagnose a TH chimera (13,14,15) because the immunohematological tests usually reveal two or more different red cell populations that appear as a mixed field in gel centrifugation test (16). Difficulties in blood group testing leads to chimerism suspicion. Thus, blood group studies are important tools to understand chimeras in general, not only the blood group ones (13).

Additionally, chimerism could be disclosed by the Human Leukocyte Antigen (HLA) system. Microinfectotoxicity and PCR techniques can be used to demonstrate tecidual heterogeneity and test the histocompatibility. The origin of the HLA system is located in a gene sequence in the autossomic chromosome 6 (17).

Besides natural pregnancies, artificial fertilization techniques (ART) seems to be prone to produce chimeras and the dissemination of these procedures increases the prevalence of chimera born infants (18).

The present description, a TH chimera case conceived in a single spontaneous pregnancy, call the attention for the importance of chimerism investigation in ART born children and in both natural or ART born twins.

CASE REPORT

The full-term infant DBM, registered as male, at the age of 8 weeks was referred to the Gonadal and Development outpatient clinic of the Endocrine Unit of the Universidade Federal de São Paulo, Brazil, due to genital ambiguity, and kariotype 46,XX(53); 46,XY(44); 47,XX+mar(02); 47,XY+mar(01), for gender registration revision and orientation. The patient was born with a weight of 3,120g and 48 cm, to non consanguineous parents after forty weeks natural pregnancy by cesarean delivery due to maternal distocia. Apart of episodic bleeding between the 7th and 8th gestational week besides amniotic liquid lost in the 34 and 36 weeks pregnancy was normal and the use of medicines or drugs are denied.

Growth and neuropsychomotor development are being normal during medical follow up. Genital evaluation disclosed a 3cm falus and perineal hipospadic urethra, urogenital sinus, a 2cc scrotal gonad at right and no palpable gonad at left without palpable inguinal hernias at both side.

Biochemical and hormonal evaluation according to age was normal: LH 0,3IU/L, FSH 0,7IU/L and estradiol <110 pmol/L (<30pg/ml). Testosterone was 0,65 nmol/L (19 ng/dl), 0,76 nmol/L (22 ng/dl), 2,01 nmol/L (58 ng/dl), 4,19 nmol/L (121 ng/dl), 5,17 nmol/L (149 ng/dl) before and 4,24,48,72 hours after 3000 UI/m² hCG stimulation test.

Pelvic MNR examination at 6 mo old, disclosed retropubian bladder without female remnants insert with mullerian remnants signals and rudimentary retrovesical testicular canal at right. One gonad was seen in the labioscrotal formation structure at right. A “male-like” elongated urethra was observed by the genital contrasted examination; a uterus with vagina was seen behind the bladder. The vagina was presented in communication with bulbar urethra too.

At laparotomy, a uterus and, at left a Fallopian tube were seen with one ”ovarian-like” gonad which were removed. At right there was a well formed blind-ending *vas* deferens and the topic gonad exposed presented with mixed macroscopic 2/3 smooth-pearled and 1/3 rough rose-colored surface was biopsied on the border disclosing pre-pubertal testis in both fragment biopsied. An ovary with follicles was confirmed histologically at left. After interdisciplinary and parents agreement was decided to maintain the child’s register in the male gender and proceeded clinical and surgical delineation in order to attain a progressive and complete external genitalia virilization.

METHODS

The present approach of one HV chimera was performed in the Endocrine Unit of the Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brazil, Ethics Committee approval (CEP 0809/03) and parents signed consent.

IMMUNOHEMATOLOGICAL STUDIES

ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS and P blood group phenotyping, including mixed field investigation were performed to clarify heredity pattern in a 5 ml sample of peripheral blood from both parents and patient taken in EDTA tubes. The blood tests were done using the DiaMed-ID Micro Typing System at the University Blood Center.

CITOGENETIC AND MOLECULAR STUDY

Fibroblast culture was performed with the tissue proceed from gonadectomy. Cromossomal Y sequences, SRY, ZFY and DYZ3, was studied by polymerase chain reaction (PCR) in peripheral blood and SRY only in material from mucosal smear.

IMMUNOGENETIC STUDY

Human Leukocyte Antigen (HLA) system HLA-A, B e DR analysis from father, mother and patient were made in the laboratory of the Division of Immunogenetics from Universidade Federal de São Paulo using PCR-SSP (Sequence Specific Primer) (One Lambda Inc. Canoga Park, CA). Microlinfocitotoxicity technique (kit *One Lambda*) was used in patient analysis too.

RESULTS

Table 1 summarizes the results of red cell phenotyping studies. The patient was negative for the E, Cw, K, Kpa, M, and S antigens. In concordance with at least one of the parents, the others studied red cell antigens were positive. The gel centrifugation test showed a mixed field with the anti-C reagent only.

Fibroblast culture of gonads disclosed 46, XX predominance in both gonads. SRY was detected in oral smear and SRY, ZFY, DYZ3 results positive in peripheral blood.

HLA phenotyping disclosed three haplotypes in HLA- A from patient, two of them originated from the father and other from the mother. HLA phenotyping results are presented in table 2.

DISCUSSION

This TH chimera case illustrates the chimerism individuality that underlies many diseases as infertility, autism and Alzheimer, usually not considered to non-chimera people. Besides auto-immune reactive and erratic drugs response are others susceptible risks to chimera people (19).

Chimerism in spontaneous human twin pregnancies is being showed more frequent than diagnosed nowadays. Fluorescence techniques can detect 8% blood group chimerism in twin pregnancies and 21% in triple or more (20). With assisted reproduction techniques (ART), twin pregnancies increased significantly between 1980 and 2000, about 55% those with 2 concepts and 400% those with three or more (21,22) and probably an increase in chimerism prevalence. *In vitro* fertilization comprised 98% of ART procedures and 90,000 were made in 1999 in USA (21).

Although TH can occur without genital ambiguity, blood group chimerism and TH are independent events (12). Blood group chimerism may occur without genital ambiguity consequently transfusion problems can occur with major risks when the diagnosis of this particular chimera fails.

Looking forward to the multiple surgical manipulations of genital ambiguity in our patient, blood group chimerism active investigation was performed. Interestingly, the parents have a very similar blood group phenotyping pattern despite absence of consanguinity, and mixed field investigation in the gel test showed positivity only for the C antigen belonging to the Rh blood group system. As far as mother and father are different genetically, the more blood groups show mixed field, like others cases in literature (12,16) The peculiar red cell phenotyping results lead us to examine the HLA system in order to clarify the chimerism occurrence. This investigation disclosed three haplotypes in HLA-A, two of them originated from the father and the other from the mother. Serological “typification” demonstrated that all these genes were expressed. Although these findings clarify the double paternal contribution in this chimera origin it is needed additional investigation in order to differentiate a dispermic or a two embryos amalgamation origin. If two different haplotypes from father and from mother are present, two separate fertilization and consecutive zygote fusion are proposed(16) unlike the present case where only one haplotype from mother was found.

Chimerism detection in the HLA system comprises a complex situation, related to auto and allo-grafts acceptance and/or rejection, which needs an individual immunogenetic approach.

This genital ambiguity case reported illustrates an active investigation of chimerism that disclosed two red cell and three leucocytes antigen haplotypes despite parents similar pattern. These results emphasize the chimeric person as a unique, prone to diseases and non-preventable responder to drugs, transfusion and transplantation. Dissemination of the ART probably lead to an increase in the hidden chimeras prevalence either with or without genital ambiguity. Therefore similar active investigation for blood group phenotyping and human leucocytes antigen system, is suggested for all ART born children and for natural twin pregnancies.

REFERENCES

- 1-Krob B, Braun A, Kunhle U (1994) True Hermaphroditism: geographical distribution, clinical findings, chromosomes and gonadal histology. *Eur J Pediatr* 153:2-10.
- 2-Hunter RHF (1995) Abnormal sexual development in man, 1ST edn. Sex determination, differentiation and intersexuality in placental mammals. Cambridge University Press,
- 3-Van Niekerk WA (1981) The gonads of human true hermaphrodites. *Hum Genet* 58(1): 117-22.
- 4-Jiménez AL, Kofman-Alfaro S, Berumen J, Hernández E, Canto P, Méndez JP, Zenteno JC (2000) Partially deleted SRY gene confined to testicular tissue in a 46 XX true hermaphrodite without SRY in leukocytic DNA. *Am J Med Genet* 93 (5): 417-20.
- 5--Adashi EY, Rock JA, Rosenwak Z. (1996). Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology. Ed Hippincott Raven.
- 6 – Farag TI, Al-Awadi SA, Tippett P, El-Sayed M, Sundareshan TS, Al-Othman SA, El-Badramany MH (1987) Unilateral true hermaphrodite with 46,XX/46,XY dispermic chimerism. *J Med Genet.* 24(12):784-6.
- 7- Guerra G Jr, Mello MP, Assumpção JG, Morcillo AM, Marini SHVL, Baptista MTM, Silva RBPE, Marques-de-Faria AP, Maciel-Guerra AT (1998) True Hermaphrodites in the Southeastern Region of Brazil: A Different Cytogenetic and Gonadal Profile. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 11(4): 519-524.
- 8-Fitzgerald PH, Donald RA, Kirk RL (1979) A true hermaphrodite dispermic chimera with 46,XX and 46,XY karyotypes. *Clin Genet* 15: 89-96.
- 9-Ford CE (1969) Mosaics and chimaeras. *Br Med Bull* 25(1): 104-109.
- 10-Verp MS, Harrison HH, Ober C, Oliveri D, Amarose AP, Lindgren V, Talerman A (1992) Chimerism as the etiology of a 46,XX/46,XY fertile true hermaphrodite. *Fertil Steril* 57: 346-9.

- 11-Green AJ, Barton DE, Jenks P, Pearson J, Yates JR (1994) Chimaerism shown by cytogenetics and DNA polymorphism analysis. *J Med Genet* 31: 816-7.
- 12-Schoenle E, Schmid W, Schinzel A, Mahler M, Ritter M, Schenker T, Metaxas M, Froesch P, Froesch ER (1983) 46,XX/46,XY Chimerism in a phenotypically normal men. *Hum Genet* 64: 86-9.
- 13-Bromilow IM, Duguid J (1989) The Liverpool chimaera. *Vox Sang* 57: 147-9.
- 14-Repas-Humpe LM, Humpe A, Lynen R, Glock B, Dauber EM, Simson G, Mayr WR, Kohler M, Eber S (1999) A dispermic chimerism in a 2-year-old Caucasian boy. *Ann Hematol* 78: 431-434.
- 15-Watkins WM, Yates AD, Greenwell P, Bird GWG, Gibson M, Roy TCF, Wingham J, Loeb W (1981) A human dispermic chimaera first suspected from analyses of the blood group gene-specified glycosyltransferases. *J Immunogenet* 8: 113-128.
- 16-Dewald G, Haymond MW, Spurbeck JL, Moore SB (1980) Origin of chi46,XX/46,XY Chimerism in a Human True Hermaphrodite. *Science* 207(18): 321-3.
- 17- Rios JBM, Carvalho LP, Martins ER, Emersom FE, Tebyriçá JN (1995). Órgãos Linfóides, Processo da fagocitose e Complexo Principal de Histocompatibilidade. In: *Alergia Clínica: Diagnóstico e Tratamento*. Editora Revinter Rio de Janeiro –RJ-Brasil, pp21-30.
- 18-Strain L, Dean JCS, Hamilton MPR, Bonthron DT (1998) A true hermaphrodite chimera resulting from embryo amalgamation after in vitro fertilization. *N Engl J Med* 15:166-9.
- 19- Pearson H (2002) Dual Identities. *Nature* May2; 417(6884): 10-11.
- 20- van Dijk BA, Boosmsma DI, de Man AJM (1996) Blood group chimerism in human múltiple births is not rare. *Am J Med Genet* 61:264-8.
- 21- Hogue CJR (2002) Successful Assisted Reproductive Technology: The Beauty of one. *Obstetrics & Gynecology* 100(5): 1017-9.
- 22- www.dnapolicy.org/genetics/facts.jhtml

Table 1. Results of the red cell phenotyping studies.

BLOOD GROUP SYSTEMS						
ABO	Rh-hr	Kell	Duffy	Kidd	P	MNS

		D	C	E	c	e	Cw	K	k	Kpa	Kpb	Fya	Fyb	Jka	Jkb	PI	M	N	S	s
DBM	O	+	M F	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Father	O	+	+	-	+	+	-	-	+	NT	+	+	-	+	+	+	NT	+	+	+
Mother	O	-	-	-	+	+	-	-	+	NT	+	+	+	+	+	+	NT	+	-	+

MF = mixed field

Table 2: HLA system analysis from patient and parents.

	HLA-A		HLA-B		HLA-DRB1		
Father	01	03	07	08	13	15	HLA A01B08DR13(a)/A03B07DR15(b)
Mother	02	33	07	14	01	15	HLA A02B07DR15(c)/A33B14DR01(d)
patient	01 02 03		07	08	13	15	HLA a/c + b/c

3 - ANEXO I – ESTUDO GENÉTICO (CITOGENÉTICO, CITOGENÉTICO – MOLECULAR E MOLECULAR).

O estudo genético vem sendo conduzido na Disciplina de Genética do Departamento de Morfologia da UNIFESP.

Conforme investigação de rotina, o cariótipo da criança foi realizado a partir de linfócitos de sangue periférico sob bandeamento G. Por ter sido verificado mosaicismos, foram analisadas cem metáfases, revelando o cariótipo 46,XX[54]/46,XY[44]/47,XX+mar[1]/47,XY+mar[1]. Foram realizados também os cariótipos a partir de sangue periférico dos pais, que apresentaram resultado normal.

As culturas de fibroblastos obtidos do material coletado durante a gonadectomia revelaram um predomínio de células 46,XX em ambas as gônadas analisadas.

Para uma melhor caracterização da proporção entre as diferentes linhagens celulares e do cromossomo marcador, além da origem desse marcador, está sendo realizado um amplo estudo por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas centroméricas dos cromossomos X e Y (Citocell[®]), no qual serão analisadas células de sangue periférico, de mucosa oral e de cultura de fibroblastos proveniente de material da gonadectomia de ambas as gônadas. Os resultados preliminares confirmam as diferenças na proporção entre as linhagens feminina e masculina no tecido de ambas as gônadas, bem como a natureza do cromossomo marcador, originário do cromossomo Y em ambas as gônadas.

Paralelamente ao estudo citogenético e citogenético-molecular, foi realizada a investigação de seqüências específicas do cromossomo Y por reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi detectada a presença de seqüências das regiões correspondentes ao SRY, ZFY e DYZ3 no sangue periférico e apenas do SRY em células da mucosa oral da criança.

Foram também investigados dois polimorfismos genéticos do cromossomo X (DXS6810 e DXS1053), porém os resultados não foram informativos. Outras seqüências polimórficas do cromossomo X serão subseqüentemente utilizadas para completar a referida análise, na tentativa de identificação da origem embrionária do quimerismo.

IV – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Hermafroditismo Verdadeiro 46,XX/46,XY (Quimera): Estudo de Caso

Trata-se de um estudo individual planejado para a sua família, ou seja, o seu filho, o pai e a mãe dele.

Seu filho é portador de Hermafroditismo Verdadeiro, cujo esclarecimento precisa da coleta de material biológico dele e dos pais, conforme descrito abaixo.

Serão necessárias amostras de 10 ml de sangue periférico obtidas por punção de veias do braço, através de material descartável, além de células da mucosa bucal obtidas por raspagem da parte interna da bochecha (procedimento delicado feito com espátula de madeira) e de porção suficiente de bulbos pilosos de áreas pré-delimitadas em pernas ou braços, retirados delicadamente, com pinça depilatória.

É assegurado o anonimato do estudo, e a sua não adesão a pesquisa ou a desistência durante seu andamento não acarretará ônus ao tratamento nesta instituição.

Não haverá despesas pessoais e nem compensação financeira pela participação.

A qualquer momento, para dúvidas ou intercorrências, vocês podem reportar-se aos investigadores, quais sejam, a Médica Lenira Cristina Stella (CRM 95.272) e Prof. Dra Ieda Verreschi, da Disciplina de Endocrinologia – Departamento de Medicina da UNIFESP, rua Pedro de Toledo, 781, 13º andar, telefone (11)5574 6502. Caso haja alguma consideração a fazer ou dúvida sobre a

Ética da Pesquisa entrarem contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) –
Rua Botucatu, 572, 1º andar, cj 14 – telefone 5571 1062, FAX 5539 7162.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido/a sobre as informações que li
a respeito do estudo: Hermafroditismo Verdadeiro 46,XX/46XY (quimera): estudo
de caso.

Eu discuti com a Dra Lenira Cristina Stella sobre a nossa decisão de
participar e permitir o estudo acima planejado para o nosso filho. Ficaram claros
para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem
realizados, seus desconfortos e riscos, a garantia de confidencialidade e de
esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a nossa participação é
isenta de despesas e que teremos garantia de acesso a tratamento hospitalar
quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e
poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o
mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possamos
ter adquirido.

Marcos Braga
assinatura do representante legal

Bianca Bianco
assinatura da testemunha (caso de participante menor de 18 anos)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e
Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste
estudo.

Lenira C. Stella
assinatura do responsável pelo estudo

data 29/09/03



São Paulo, 12 de agosto de 2003
CEP Nº 0809/03

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): LENIRA CRISTINA STELLA

Disciplina/Departamento: Endocrinologia/Medicina

Ref.: Projeto de Pesquisa

Hermafroditismo verdadeiro 46,XX46XY (quimera): estudo de caso

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto acima.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em **08/02/2004**

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

6- Artigo 2:

TRUE HERMAPHRODITISM CHIMERA 46,XX/46,XY: from origin to clinical relevance.

ORIGIN AND CLINICAL PRESENTATION OF TH CHIMERA XX/XY

HERMAFRODITISMO VERDADEIRO QUIMERA 46,XX/46,XY: da origem à relevância
clínica.

ORIGEM E APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO HV QUIMERA XX/XY

L. C. Stella ¹

I.T. N. Verreschi ¹

¹ Universidade Federal de São Paulo/ Escola Paulista de Medicina – UNIFESP

Unifesp/EPM – Laboratório de Esteróides

Rua Pedro de Toledo, 781

Vila Clementino – São Paulo – SP

CEP 04039-032

Phone/fax: +55 11 5574-6502

Corresponding author:

Ieda T.N. Verreschi, MD, PhD

Rua Loefgren, 2236

São Paulo – SP- Brazil

CEP 04040-004

Phone/fax: +55 11 5574-6502

ieda@endocrino.epm.br

ABSTRACT

True hermaphroditism (TH), a rare condition, is phenotypically indistinguishable from other intersexuality abnormalities. Chimera is the presence of cells from two or more zygotes in the same individual, and its main differential diagnosis is mosaicism. Chimeras can be originated by syngamy or by association of cells from different embryos. Parthenogenetic division and 47,XXY aneuploidy could explain the mechanism of syngamy, that presents the same maternal haploid polymorphisms. In the merging of two different zygotes, the resultant chimera individual should contain two paternal and two maternal haploid genomes, when DNA polymorphisms are compared. Normal fertilization occurs in the Fallopian tube; the chosen sperm recognizes the integrin protein of the ovum, and the fusion of the two pronuclei results in a unicellular diploid zygote. Embryo polarity starts immediately before gastrulation, and the order of cells determines dynamic changes in patterns of gene expression. The first cleavage axis, the embryonic-abembryonic axis, polarizes the inner cell mass, and the second one is oriented by the polar body and establishes the blastocyst symmetry. The uterus-embryo relationship orients the embryo polarity in the natural implantation environment. Assisted fertilization interferes with the embryonic polar orientation and implantation.

KEY WORDS: assisted reproduction techniques, chimerism, embryo axis, embryo polarity, fertilization, true hermaphroditism chimera, zygote origin.

True hermaphroditism (TH), a rare condition, is phenotypically indistinguishable from other intersexuality abnormalities in the gene expression cascade of normal human sex differentiation. The external genitalia vary from normal female to normal male, frequently presenting different degrees of ambiguity, and breast development can occur at puberty (Watchtel, 1994). The internal genitalia develop Wolff ducts or Muller ducts, depending on the presence of a functional testis (Jiménez *et al*, 2000). Duct development is in accordance with the ipsilateral gonad. Potentially functional ovarian and testicular tissues are present in the same person, either in the same (ovotestis) or in different gonads. Gonadal presentation is variable: bilateral ovotestis, unilateral ovotestis with specific contralateral tissue, or an ovary on one side and a testis on the other (Levin, 2000). Most frequently, there is an ovotestis with a contralateral ovary. To make a diagnosis, both follicular presence and oogenesis in the ovary, as well as differentiated seminiferous tubules in the testis, have to be demonstrated by histopathology (Damario *et al*, 1996).

The most commonly found karyotype is 46,XX, present in 80 to 90 % of the cases; 5 to 10% are 46,XY, and 5 to 10% are XX/XY chimeras or mosaics (Damario *et al*, 1996). A chimera is the presence of cells from two or more zygotes in the same individual (Strain *et al*, 1998; Ford, 1969). Its main differential diagnosis is mosaicism, a condition that is characterized by only two inherited haploid sets, amalgamated by cell division misbalances (Ford, 1969). In humans, two groups of chimeras have been distinguished, one originated by syngamy, the other originated by association of cells from different embryos. Syngamy is the presence of more than two haploid sets in the same individual, indicating the participation of at least three gametes in the formation of the zygote. In this situation, maternal genetic polymorphism markers are supposed to be complementary, and the paternal ones necessarily independent. Association of cells from different individuals occurs by early merging of two embryos or by placental cross-circulation between dizygotic twins, maternal-fetal transplacental exchange, and artificially by transfusion or grafting (Ford, 1969).

FROM FECUNDATION UNTIL HUMAN EMBRYO DEVELOPMENT DAY FIFTEEN

Fecundation is a sequential process that begins with maternal and paternal gametes at rest, i.e., oocyte arrested at the metaphase stage of meiosis II, and sperm arrested after conclusion of meiosis II (Moratalla *et al*, 2004; Colombo, 2006).

About 2.5 million oocytes are present in a female newborn, but only 400 reach maturity and ovulation. From birth to sexual maturity, primary oocytes remain in prophase I, completing meiosis I at ovulation. After that, begins the meiosis II stage until metaphase, which is only completed if fertilization occurs (Willard, 1993). At the end of meiosis I and II, the first and the second polar bodies are eliminated. The polar bodies are small, non-functioning and fast degenerating cells.

A sperm consists of a head, a neck and a tail. Around the head there is the acrosome that contains several enzymes like acrosin and hyaluronidase, which help it penetrate the *corona radiata* and the pellucid zone of the egg (Moore *et al*, 2000). Recognition between gametes occurs by interaction of the enzyme galactosyl transferase, present in the sperm head and responsible for the chemical transformation of the ZP3 glucoprotein of the pellucid zone. The interaction of external sperm and egg proteins eventually end the genetic rest of the male gamete (Moratalla *et al*, 2004). Fertilization occurs in the Fallopian tube, where a number of biochemical events block the entrance of more than one sperm in the egg. The peroxidase of the internalized sperm catalyzes the cross and mix of tyrosine residues, resulting in the proteolysis of the pellucid zone and modifying its coating from pored into impermeable (Moratalla *et al*, 2004).

Inside the egg, the maternal and paternal chromosomes are wrapped by a membrane forming the pronuclei, and that is when the end of the genetic rest of the female gamete occurs. The *fertilin* protein in the acrosome of the sperm recognizes the *integrin* protein of the egg, and their fusion results in a unicellular diploid zygote. An intracellular increase in the calcium rate starting from the

site of sperm penetration leads to a cytoskeleton change that permits the formation of microtubules in the egg cytoplasm which include the male pronucleus (Moratalla *et al*, 2004).

Zygote cleavage then originates smaller cells, called blastomeres, which, upon reaching the stage of 12 or more cells, are recognized as morula. A cavity is then formed inside the morula, the blastocystic cavity, and from then on the zygote is called blastocyst. In the blastocyst, an inner cell mass originates the embryo and part of the embryonic tissues, and a thin outer layer of cells originates the trophoblast for the extra-embryonic structures and the fetal side of the placenta (Moore *et al*, 2000). During the next step, the tridermic embryonic disk stage, the three germ layers, ectoderm, mesoderm and endoderm, can be differentiated (figure 1). Studies about first spatial decisions of the embryo suggest that cell polarization does not occur randomly. Embryo polarity begins immediately before gastrulation, and the order of cells determines dynamic changes in the patterns of gene expression (Zernicka-Goetz, 2002). According to Lewis Wolpert (Wolpert, 1993), “It is not birth, marriage, or death, but gastrulation, which is truly the most important time in our life.

Upon implantation, the interaction of the embryo with the uterus modifies its spatial orientation, and local asymmetries may be able to change the polarity. Some genes seem to guide the polarity orientation as the embryo changes its shape from a sphere into a cylinder, but the axis can be established from the embryonic structure itself. The first axis, the embryonic–abembryonic axis, becomes clearly evident with the formation of the blastocyst cavity. This axis polarizes the inner cell mass towards the embryonic pole and the blastocyst cavity towards the opposite end, called the abembryonic region. In the majority of zygotes, the sperm penetration site correlates with the site of first cleavage and appears to direct the mitotic spindles according to the changes in the shape of the embryo (Piotrowska-Nitsche *et al*, 2005). The second cleavage axis is oriented by the polar body and establishes the symmetry of the blastocyst when it is slightly flattened. The visceral endoderm cells near the polar body tend to progressively become more distally located as the embryonic cylinder

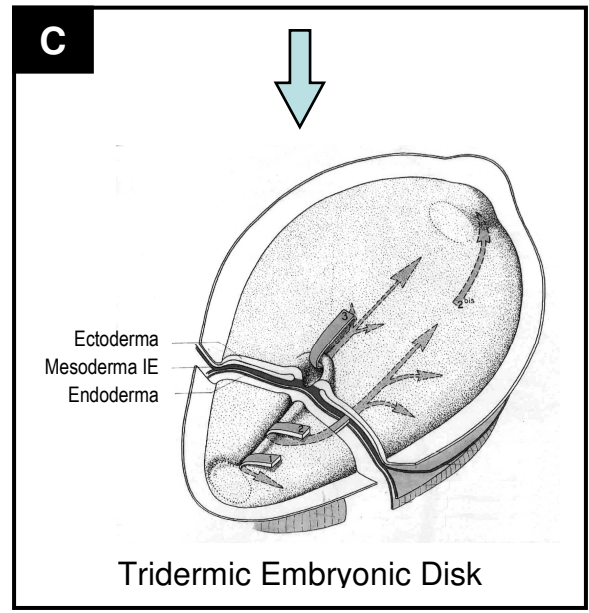
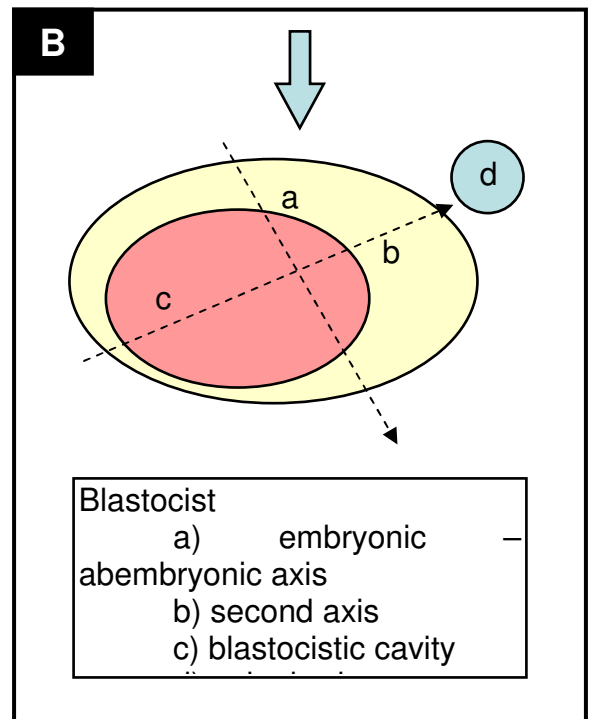
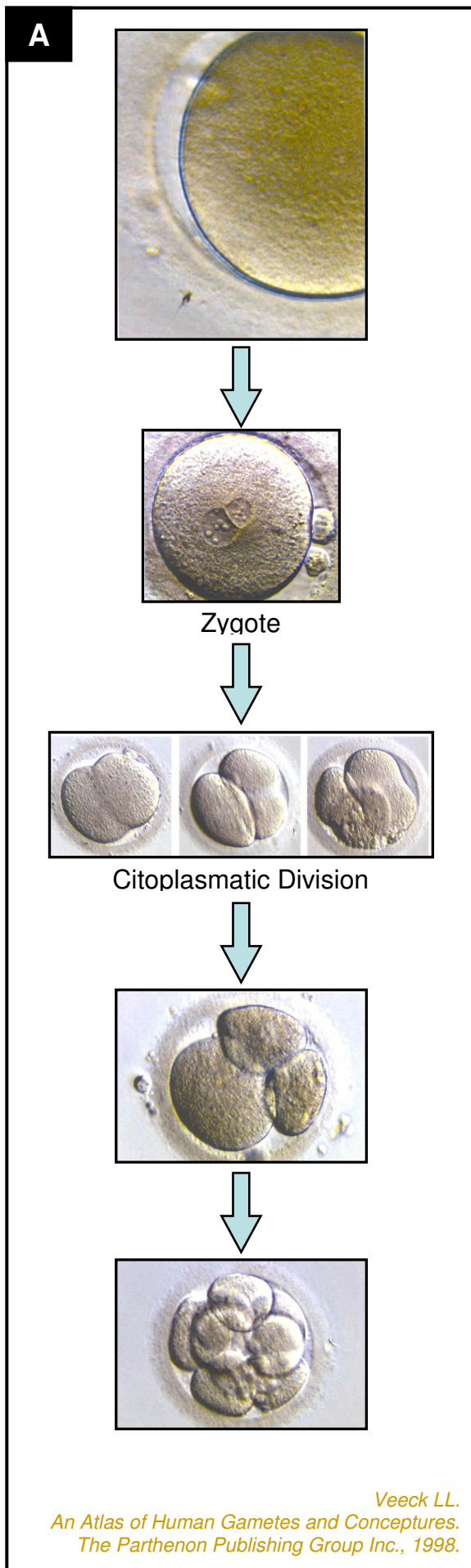


Figure 1: The process of fecundation and former embryonic divisions. A: after the fertilization, the pronuclei convergence and zygote formation; B: blastocist stage; C: tridermic embryonic disk.

grows, while those originally more distant from the polar body tend to occupy more proximal positions (Zernicka-Goetz, 2002). Once the first and second cleavages are complete, there is four blastomere with a certainly non-random arrangement.

FORMATION MECHANISMS OF MOSAICS AND CHIMERAS

Mere examination of the phenotype of a chimera or mosaic person is not always sufficient to identify the primary defect in its mechanism of origin. According to the stage of development in which the chimerism or mosaicism arose, and also to the potency of the cells, the resulting phenotype can be highly variable. There is no limit to the number of possible combinations for mutant embryos (Rossant *et al*, 1998).

By FISH (fluorescence *in situ* hybridization), a number of chromosome abnormalities can be detected, such as aneuploidy, haploidy, polyploidy and mosaicism. Aneuploid embryos may be monosomic or trisomic, depending on whether there is one chromosome of a pair missing or in excess in the cells, respectively. An embryo is classified as a haploid mosaic if, on average, each diploid cell had one haplotype of each origin. Polyploid embryos have three or more copies of each chromosome in each cell, with or without a coexisting normal cell line (Munné *et al*, 1998). Other structural abnormalities may be present without changes in the diploid cell content, such as partial chromosome deletions or duplications from misbalanced crossing-over, inversion, translocation and diploid mosaicism.

In a Brazilian series of ten TH cases, a 46,XX/46,XY karyotype was found in two patients (Guerra *et al*, 1998). In most reports, persons known to carry a 46,XX/46,XY karyotype are considered as the result of chimerism by fusion of two embryos (Niu *et al*, 2002). When chimerism results from the fusion of two different zygotes, at least two paternal and two maternal haploid

genomes are demonstrated by the comparison of DNA polymorphisms (Giltay *et al*, 1998). If this pattern of inheritance cannot be demonstrated, there are other possible mechanisms to explain the mutant zygote (Niu *et al*, 2002; Giltay *et al*, 1998; Strain *et al*, 1995).

The first mechanism is thought to occur by parthenogenetic division of a haploid egg, originating two identical haploid sets inside the same egg, which would then be fecundated by two different sperms. The two diploid cells resulting from the first division have the same maternal polymorphisms, but different paternal polymorphisms. Double fecundation of a binovular follicle or of two oocytes involved by the same *zona pellucida* has been described in animals and is considered as a possibility in humans (Uehara *et al*, 1995). In 1969, Ford (Ford, 1969) suggested that the presence of correlated maternal polymorphisms and independent paternal polymorphisms could originate by fecundation of the oocyte and of the first or second polar body by different sperms.

The second mechanism proposed also involves parthenogenetic division of a haploid egg, originating two identical haploid sets inside the same egg, which would then be fecundated by a single sperm, giving rise to a cell with three haplotypes. This cell would reorganize, grouping one maternal haplotype together with the paternal haplotype from the sperm, and the additional maternal haplotype would undergo a process of diploidization, originating a diploid cell with two identical haplotypes.

The third and fourth mechanisms start from a 47,XXY cell. By the third mechanism, at an early stage of embryogenesis, two successive nondisjunctions would occur, the first one originating the initial 47,XXY cell, and the second one giving rise to one 48-chromosome polyploid cell and one diploid cell. Thus, the possible cell lines from each daughter cell would be 48,XXXXY and 46,XY, or 46,XX and 48,XXYY. The aneuploid cells would then be confined to extra-embryonic tissues, or there would be too few of them to be detected by karyotype analysis. The 46,XX/46,XY lines would coexist in the zygote.

Finally, the fourth mechanism would also start from a 47,XXY cell, but originating two cell lines, one 46,XX and the other 48,XXYY. Then, a second nondisjunction event in the 48,XXYY line would originate a 46,XY cell line and another one, that would be lost.

The study of genetic polymorphisms permits to assess the origin of the cell lines found, thus detecting the contribution of more than one gamete from each parent in the formation of the zygote.

ASSISTED REPRODUCTION TECHNIQUES AND CHROMOSOME ANOMALIES

Two techniques are currently used in most cases: *in vitro* fertilization (IVF) with embryo transfer, and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Both start with a suctioned egg that is exposed to innumerable sperms in IVF, as it occurs in the physiological mechanism, while in ICSI a single sperm is injected into the egg, if the infertility is the result of a male factor (Moratalla *et al*, 2004).

The dissemination of assisted reproduction techniques (ART) as a solution for infertility has resulted in an improvement of the techniques, granting success in extreme situations, but, on the other hand, becoming increasingly invasive and artificial. In view of certain cases originated by ART which have been described (Strain, L. *et al*, 1998; Pearson, 2002; Odone-Filho *et al*, 2002), an evaluation of problems resulting from ART is mandatory.

Many couples which seek ART face male factors of infertility. It is postulated that cryptorchidism, hypospadias, low sperm count and other pathologies affecting fertility can start during the intrauterine life; however, most of the newborns with abnormal external genitalia do not exhibit any chromosomal disorders suggesting antenatal reproductive disorders of environmental origin (Skakkebaek *et al*, 2001). Paternal pesticide exposure has been associated with cryptorchidism, and hypospadias is correlated with low birth weight, maternal health status and

smoking fathers (Pierik *et al*, 2004). Hormonal disruptors such as phthalates can interfere with the embryonic development causing hypospadias (Vrijheid *et al*, 2003).

A low sperm count is correlated with a greater risk of triploidy resulting from a 2n sperm produced by inefficient meiosis (Golubovsky, 2003), further increased by maternal age, which is also a cause of embryo aneuploidy (Bielanska *et al*, 2002). Prenatal diagnosis by FISH in pregnancies in general has demonstrated that embryos with aneuploidy, haploidy and polyploidy are much more frequent than clinically observed, probably because mosaic embryos are lost during the first trimester. In couples seeking ART, maternal age and low sperm count are among the causes of infertility, which may be a natural defense mechanism to prevent the birth of persons with chromosome abnormalities, an event with a higher risk considering the condition that causes the parental infertility. The natural process of fecundation can be compared to a “biological filter” that selects mature and normal spermatozoa, which explains the reduced viability of embryos obtained by ART (Moratalla *et al*, 2004).

An evaluation of 216 embryos obtained by ART (ICSI or IVF technique) showed that 29.6% of them had a normal diploid chromosome set, while 70% were aneuploid (Bielanska *et al*, 2002). In another series of 245 embryos from IVF and 136 from ICSI, chromosomal anomalies were found in 66% and 58%, respectively, mosaicism being the most prevalent anomaly found, present in 40% of the embryos, independently of the employed technique (Ford, 1969).

The studies with embryos produced by ART brought a better understanding of human chromosomopathies which had previously been observed only in miscarriages of natural pregnancies. However, given the impossibility to compare them with natural pregnancies, the increase of chromosomal anomalies in ART-born children cannot be proven numerically, but the rare diseases which have appeared in these children strongly suggest this association (Strain *et al*, 1998). A threefold increase in tumor prevalence has been suggested in ART-born children (Odone-

Filho *et al*, 2002). Several studies have raised concerns that ART-born children may be at increased risk for birth defects, prematurity, low birth weight, delayed neurological development and genetic abnormalities. There is some evidence to suggest an increased risk for disorders resulting from imprinting errors during early embryogenesis, such as the Angelman and the Beckwith-Wiedemann Syndromes (Speroff *et al*, 2005).

The available data concerning the safety of ART offspring are inconclusive, but should be carefully considered.

CONCLUSION

TH is a rare cause of sexual differentiation disorders, and its chimera presentation is even rarer, leading to the investigation of normal embryogenesis in order to understand the steps of human prenatal development. The normal mechanism of egg preparation, sperm selection and fertilization seems to occur under strict control, considering the spatial orientation of the embryo, guided by the orientation axes of the newly formed structure itself. These nonrandom and rigorously programmed events have an influence on the final result.

Many things are still to be discovered in this field. Human intervention in this process may alter the natural course of development, so far without being able to ensure its safety. The spatial orientation of an embryo probably does not subsist after an ART procedure, but to what extent the final product is altered has not been established yet. Chromosome anomalies resulting from ART are being studied, but other peculiar characteristics of chimeras are still to be disclosed.

REFERENCES

- Bielanska, M., Tan, S.L., Ao, A. (2002) Chromosomal mosaicism throughout human pre-implantation *in vitro*: incidence, type and relevance to embryo outcome. *Human Reproduction* , 17, 413-419.
- Colombo, R. (2006) The process of fertilization and its stages. From parental gametes to a developing one-cell embryo. Proceedings of the XII Annual General Assembly of Pontifical Academy for Life (Vatican City), in press.
- Damario, M.A. and Roch, J.A. (1996) Diagnostic approach to ambiguous genitalia in Adashi, E.Y., Rock, J.A., Rosenwak, Z. *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*. 1st edn, Hippincott Raven Press, Philadelphia, USA, pp 896.
- Ford, C.E. (1969) Mosaics and chimeras. *Br Med Bull* ,25, 104-109.
- Giltay, J.C., Brunt, T., Beemer, F.A., Wit, J.M., Amstel, H.K.P., Pearson, P.L., Wijmenga, C. (1998) Polymorphic detection of parthenogenetic maternal and double paternal contribution to a 46,XX/46,XY hermaphrodite. *Am J Hum Genet*, 62, 937-940.
- Golubovsky, M.D. (2003) Postzygotic diploidization of triploids as a source of unusual cases of mosaicism, chimerism and twinning. *Human Reproduction* ,18, 236-242.
- Guerra, G. Jr., Mello, M.P., Assumpção, J.G., Morcillo, A.M., Marini, S.H.V.L., Baptist,a M.T.M., Silva, R.B.P.E., Marques-de-Faria, A.P., Maciel-Guerra, A.T. (1998) True Hermaphrodites in the Southeastern Region of Brazil: A Different Cytogenetic and Gonadal Profile. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 11, 519-524.
- Jiménez, A.L., Kofman-Alfaro, S., Berumen, J., Hernandez, E., Canto, P., Mendez, J.P., Zenteno, J.C. (2000) Partially deleted SRY gene confined to testicular tissue in a 46 XX true hermaphrodite without SRY in leukocytic DNA. *Am J Med Genet*, 93, 417-420.

Levin, H.S. (2000) Tumors of the testis in intersex syndromes. *Urol Clin North Am*, 27, 543-551.

Moore, K.L. and Persaud T.V.N. (2000) Início do Desenvolvimento Humano: primeira semana.in *Embriologia Clínica*. 6nd edn, Guanabara Koogan Press, Rio de Janeiro, BR, pp. 15-43.

Moratalla, N.L. and Elizalde, M.J.I.(2004) Con la fecundación se constituye el cigoto in *Los quince primeros días de una vida humana*. 1st edn, Eunsa Press, Navarra, Spain, pp. 55-93.

Munné, S., Márquez, C., Reing, A., Garrisi, J., Alikani, M. (1998) Chromosome abnormalities in embryos obtained after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* , 69, 904-908.

Niu, D.M., Pan, C.C., Lin, C.Y., Hwang, B.T., Chuang, M. (2002) Mosaic or chimera? Revisiting an old hypothesis about the cause of the 46,XX/46,XY hermaphrodite. *The Journal of Pediatrics* , 140, 732-735.

Odone-Filho, V., Cristofani, L.M., Bonassa, E.A.R.N., Braga, P.E.M.P.H., Eluf-Neto, J. (2002) In vitro fertilization and childhood cancer. *J Pediatr Hematol Oncol*, 24, 421-422.

Pearson, H. (2002) Dual Identities. *Nature* , 417, 10-11.

Pierik, F.H. ,Burdorf, A., Deddens, J.A., Juttman R.E., Weber, R.F. (2004) Maternal and paternal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a case-control study in newborn boys. *Environmental Health Perspectives* ,112, 1570-1576.

Piotrowska-Nitsche, K. and Zernicka-Goetz, M. (2005) Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo. *Mechanisms of Development* , 122, 487-500.

Rossant J. and Spence A. (1998) Chimeras and mosaics in mouse mutant analysis. *Trends in Genetics* , 14, 358-363.

Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M. (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction* , 5, 972-978.

Speroff L and Fritz MA. (2005) *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 7th edn, Lippincott Williams & Wilkins Press, Philadelphia, USA, pp 1239-1251.

Strain, L., Dean, J.C.S., Hamilton, M. P.R., Bonthron, D.T. (1998) A true hermaphrodite chimera resulting from embryo amalgamation after in vitro fertilization. *N Engl J Med*, 15, 166-169.

Strain, L., Warner, J.P., Johnston, T., Bonthron, D.T. (1995) A human parthenogenetic chimera. *Nat Genet* , 11, 164-169.

Uehara, S., Nata, M., Nagae, M., Sagisaka, K., Okamura, K., Yajima, A. (1995) Molecular biologic analyses of tetragametic chimerism in a true hermaphrodite with 46,XX/46,XY. *Fertil Steril* , 63, 189-192.

Vrijheid, M., Armstrong, B., Dolk, H., van Tongeren, M., Botting, B. (2003) Risk of hypospadias in relation to maternal occupational exposure to potential endocrine disrupting chemicals. *Occup Environ Med* ,60, 543-550.

Watchtel, S.S (1994) *Molecular genetics of sex determination*. 1st edn, Academic Press, London, UK.

Willard, T.M.(1993) *Base Cromossômica da Hereditariedade in Genética Médica*, 5nd edn, Guanabara Koogan Press, Rio de Janeiro, BR, pp. 8-21.

Wolpert, L in Slack, J.M.W. (1993) In *From Egg to Embryo: Determinative events in early development*, Cambridge: Cambridge University Press APUD Zernicka-Goetz,

M.(2002) Patterning of the embryo: the first spatial decisions in the life of a mouse. *Development*, 129, 815-829.

Zernicka-Goetz, M. (2002) Patterning of the embryo: the first spatial decisions in the life of a mouse. *Development* 129, 815-829.

7.0 – COMENTÁRIO FINAL

O Hermafroditismo Verdadeiro é uma causa rara de ambigüidade genital, mas deve ser lembrado durante a sua investigação, sobretudo pela possibilidade de quimerismo oculto.

A formação de uma quimera por singamia ou a fusão de embriões diferentes são eventos raros, mas que se tornaram mais freqüentes com a disseminação das técnicas de reprodução assistida, Embora estes eventos venham a ser contornados pela superação futura destas técnicas.

A intervenção humana no tratamento da infertilidade não reproduz com exatidão os primeiros momentos da concepção, por não serem completamente conhecidos, a exemplo da polaridade assumida pelo embrião e a determinação de expressões gênicas decorrentes.

Diante de paciente portador de genitália ambígua diagnosticado como hermafrodita verdadeiro ou mesmo de pacientes concebidos por técnicas artificiais, a investigação de quimerismo é imperativa, mesmo sem sinais clínicos dentro ou fora da esfera genital, pois pode tratar-se de quimera oculta.

A fenotipagem eritrocitária, a determinação do HLA ou a pesquisa de polimorfismos genéticos são capazes de detectar a formação quimérica do indivíduo, e a investigação de cada paciente deve prosseguir no sentido de dimensionar quais os tecidos acometidos.

Um indivíduo quimera possui aspectos imunológicos peculiares, no tocante a transplantes e enxertos, transfusões, tolerância de oncogenes, além da resposta a drogas pela modulação genética.

O estudo do quimerismo possibilitará o entendimento da concepção e os primeiros dias da vida, como os detalhes que os envolvem, e também o grau da influência genética na susceptibilidade individual a auto-imunidades e na resposta farmacogenética.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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