

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UNICEUB
Faculdade de Ciências da Saúde

**DETERMINAÇÃO DO SEXO GENÉTICO EM PACIENTES
PORTADORES DE AMBIGÜIDADE GENITAL OU DISTÚRBIOS
DE DIFERENCIAÇÃO SEXUAL ATRAVÉS DE CULTURA
TEMPORÁRIA DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS.**

Edna Alves de Santana Esteves

Brasília - 2006



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UNICEUB

Faculdade de Ciências da Saúde

**DETERMINAÇÃO DO SEXO GENÉTICO EM PACIENTES
PORTADORES DE AMBIGÜIDADE GENITAL OU DISTÚRBIOS
DE DIFERENCIAÇÃO SEXUAL ATRAVÉS DE CULTURA
TEMPORÁRIA DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS.**

Edna Alves de Santana Esteves

Relatório Final apresentado à Assessoria
Acadêmica pela Faculdade de Ciências
da Saúde.

Orientadora: Fernanda Vinhaes de Lima

**Brasília
Agosto/2006**

“Há uma verdade superior
Há uma sabedoria incontestável
Em tudo o que o mundo mostra
Porque o mundo é inesgotável...”

Deus e o Homem – Jane M. B. Monteiro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais: Hermínio e Eulina, ao meu marido Marcelo Esteves, e aos meus irmãos, por amá-los incondicionalmente, por todos os afagos e aconchegos, por todos os laços e nós a que nos propomos, e por todas as vitórias que juntos conseguimos alcançar.

Dedico, em especial, à minha orientadora e amiga, Prof^a Dr^a Fernanda Vinhaes, por acreditar em meu potencial, por participar e tornar possível a realização de um sonho. Por seu empenho e carinho, por sua compreensão e companheirismo, por sua orientação e apoio.

Dedico a todos os pacientes e portadores de síndromes, acreditando sempre que o conhecimento pode fazer a diferença e gerar, por consequência, grandes transformações.

Dedico, também, a todos os meus amigos, que compreenderam minha distância, meus humores, minhas inseguranças e minhas alegrias. A todos aqueles que acreditaram no meu sonho e que de alguma forma contribuíram para que ele se tornasse real.

Dedico, ainda e principalmente, à vida, por sua plenitude e seus mistérios, por me aguçar a curiosidade e despertar a minha sede do saber.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, essencialmente, a **Deus** pela possibilidade de sonhar e tornar cada sonho uma realidade.

À minha professora, orientadora e amiga Dra. Fernanda Vinhaes, a quem admiro desde o primeiro dia em que conheci.

A todos os professores que fizeram diferença na minha forma de pensar, acrescentando conhecimento e despertando minha curiosidade, contribuindo para o meu crescimento pessoal e para o sucesso deste trabalho.

À Dra. Terezinha, ao Dr. Masahiko Yoshino, e à Dra. Beatriz Versiani pelo carinho, atenção e receptividade com que me receberam, propiciando condições para este aprendizado e pela oportunidade de desenvolver o presente trabalho.

A toda a equipe do Laboratório de Genética do Hospital de Base do D.F e do Ambulatório do Hospital Regional da Asa Sul.

À C.E.C.S. por permitir a realização deste trabalho.

À Dra. Divanete Souza, por seu profissionalismo e apoio, em todo o trajeto desta conquista.

A toda minha família, pelo amor gratuito e sem regras.

A minha irmã Eliete Santana, por seu colo, seu amor, seu carinho, sua atenção, e por toda a eternidade.

Ao meu esposo, Marcelo Esteves, por suportar ao meu lado as intempéries e por alegrar-se pelas vitórias.

Às minhas amigas Jaqueline Morgado, Priscilla Lamar e Simone Borges, pelo carinho, apoio, auxílio e incentivo à realização deste e de tantos outros trabalhos.

E, finalmente, a todos aqueles que por acreditar, mesmo que distantes, estiveram ao meu lado.

RESUMO

O mecanismo de determinação do sexo tem sido objeto de investigação desde a Antiguidade. O sexo cromossômico e genético é estabelecido na fecundação, e depende do óvulo ter sido fecundado por espermatozóide com cromossomo X ou Y. É este tipo de complexo cromossômico sexual, que vai determinar o tipo de gônada, e conseqüentemente a diferenciação sexual que ocorrerá nos ductos internos e na genitália externa. Em alguns recém-nascidos, a determinação do sexo torna-se difícil devido à presença de ambigüidade genital. Sendo assim, a determinação do cariótipo da criança é essencial para a determinação sexual nestes pacientes. O presente trabalho tem por objetivo principal a determinação do sexo genético em indivíduos portadores de ambigüidade genital ou de distúrbio de diferenciação sexual, através de cultura temporária de linfócitos periféricos. Os pacientes diagnosticados neste estudo são provenientes da rede hospitalar pública do Distrito Federal, atendidos no serviço ambulatorial do Hospital Regional da Asa Sul e do Hospital de Base de Brasília da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. Após a devida anuência dos responsáveis pelo paciente, e seguindo os preceitos recomendados pela Comissão de Ética em Pesquisa, foi realizada a coleta de sangue periférico para a avaliação citogenética segundo o método de cultura temporária de linfócitos periféricos (MOORHEAD *et al.*, 1960). A partir do acompanhamento do serviço realizado no Ambulatório de Genética Clínica do HRAS foi possível contabilizar 16 (dezesseis) pacientes diagnosticados como portadores de ambigüidade genital ou distúrbio de diferenciação sexual entre os meses de Março de 2005 e Junho de 2006, com idades variadas desde os 03 (três) dias de vida até 15 (quinze) anos de idade. Grande maioria dos pacientes (43,8%) foi diagnosticada ainda no primeiro mês de vida, sendo o Hospital Regional da Asa Sul (HRAS) o que mais atendeu os pacientes analisados. Constata-se que 43,8% dos pacientes apresentavam genitália externa com aspecto feminino, enquanto 37,5% tinham aspecto masculino. Em menor percentual (18,8%) não foi possível classificar a genitália externa quanto ao seu aspecto, devido à ambigüidade característica de alguns pacientes portadores destas anomalias em estudo. Com base nos resultados experimentais deste estudo, pode-se concluir que o acompanhamento em ambulatório de genética clínica torna-se essencial para a determinação do sexo de criação dessas crianças, a decisão das condutas terapêuticas referentes ao tratamento clínico e ao tratamento cirúrgico é decorrente da determinação sexual apropriada e o sexo social deve ser avaliado com muito cuidado, por profissionais qualificados em tal abordagem. Além disso, o diagnóstico precoce, o aconselhamento genético e ainda, o acompanhamento psicológico que essas crianças e seus familiares devem receber, determinam o “sucesso” na criação dessa criança.

Palavras-chave: Citogenética, Diferenciação sexual, Ambigüidade genital.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	12
3. RISCOS E BENEFÍCIOS	15
4. OBJETIVO	15
5. CASUÍSTICA & MÉTODO	15
5.1 Seleção dos pacientes	16
5.1.1 Critérios de inclusão para pacientes portadores de genitália de aparente sexo masculino	17
5.1.2 Critérios de inclusão para pacientes portadores de genitália de aparente sexo feminino	17
5.1.3 Critério de exclusão	18
5.2 Estudo citogenético em cultura temporária de células de sangue periférico	18
5.2.1 Coleta de amostra de células de sangue periférico	18
5.2.2 Critérios de armazenamento e transporte do sangue periférico coletado.	18
5.2.3 Técnica de semeadura de células de sangue periférico	19
5.2.4 Composição do meio de cultura	19
5.2.5 Técnica de cultura de células de sangue periférico	20
5.2.6 Técnica de separação e fixação das células	20
5.2.7 Preparo e coloração das lâminas	21
5.2.8 Análise citogenética	21
6. RESULTADOS	22
6.1 Características gerais dos pacientes	22
6.2 Análise Citogenética	24
7. DISCUSSÃO	26
8. CONCLUSÃO	31
ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	32
ANEXO 2 – ANAMNESE	34
ANEXO 3 – RESOLUÇÕES Nº 196/96 E Nº 340/04 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

“A primeira pergunta que se faz sobre um recém-nascido é: É menino ou menina?”

O mecanismo de determinação do sexo tem sido objeto de investigação desde a Antiguidade. Aristóteles (350 a.C.) propunha que o sexo era determinado pelo calor do parceiro masculino e que as fêmeas seriam machos cujo desenvolvimento foi sustado precocemente porque o frio do útero superou o calor do sêmen paterno (MACIEL-GUERRA & GUERRA JÚNIOR, 2002).

Esta visão foi se alterando e até o início do século XX, acreditava-se que a determinação sexual sofria influência direta do meio ambiente, sendo a temperatura e a nutrição, fatores importantes neste processo. Somente a partir de 1905, com o estudo da determinação do sexo em insetos, é que se estabeleceu uma correlação entre os cromossomos XX e o sexo feminino e os cromossomos XY e o sexo masculino (MACIEL-GUERRA & GUERRA JÚNIOR, 2002).

Foi apenas em meados do século XX que os experimentos do embriologista ALFRED JOST com embriões de coelhos permitiram o esclarecimento dos passos fundamentais da diferenciação sexual humana; logo em seguida surgiu o exame da cromatina X, que permitiu o estudo do sexo nuclear (MACIEL-GUERRA & GUERRA JÚNIOR, 2002). Nas décadas de 1950 e 1960 foi elucidada a biossíntese dos hormônios esteróides. Em 1956, o trabalho de TJO & LEVIN deu início ao estudo do cariótipo humano, porém foram técnicas de bandeamento cromossômico que permitiram uma análise muito mais precisa dos cromossomos humanos (CASPERSSON, 1970).

Em 1959, JACOB E STRONG, bem como FORD E COLABORADORES, conseguiram demonstrar, através da análise citogenética de indivíduos portadores de anomalias de diferenciação sexual (Síndrome de Klinefelter, 47,XY e Síndrome de Turner, 45,X), que é a presença do cromossomo Y que determina o sexo masculino humano, e que sua ausência determina o sexo feminino humano.

Após a fertilização, em que o espermatozóide e o óvulo fusionam seus núcleos, favorecendo a junção dos cromossomos maternos e paternos no núcleo do ovo ou zigoto, seqüências de divisões celulares são desencadeadas, fazendo com o que antes, eram apenas gametas separados e independentes, formem um novo indivíduo (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2001).

O sexo cromossômico e genético é estabelecido na fecundação, e depende do óvulo ter sido fecundado por espermatozóide com cromossomo X ou Y. É este tipo de complexo cromossômico sexual, estabelecido na fertilização que vai determinar o tipo de gônada. E sendo assim, o tipo de gônada vai determinar a diferenciação sexual que ocorrerá nos ductos internos e na genitália externa (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2001).

Até cerca de sete semanas após a fertilização, o embrião humano é potencialmente bissexual, com primórdios gonadais e genitais idênticos nos dois sexos. Nesta fase não é possível fazer a distinção macro ou microscópica entre embrião com predestinação masculina ou feminina. O que existe são rudimentos de gônadas e de genitais externos (bissexuais ou indiferentes), e primórdios dos ductos genitais internos, tanto masculinos quanto femininos (MACIEL-GUERRA & GUERRA JÚNIOR, 2002).

Sabe-se há décadas que as células masculinas e femininas humanas possuem cromossomos sexuais diferentes (Painter, 1921) e que a diferença é visível na intérfase além de na mitose também (Barr e Bertram, 1949). Embora a descoberta, por Painter, dos cromossomos sexuais humanos não pudesse ser explorada clinicamente naquela época porque as técnicas citogenéticas eram inadequadas, a descoberta das massas de cromatina sexual (corpúsculos de Barr) em células na intérfase de mulheres, mas não de homens, foi logo seguida pela criação de uma técnica simples que permitia o exame dos corpúsculos de Barr em esfregaços bucais. Como conseqüência, percebeu-se rapidamente que, embora a maioria das mulheres fosse “positiva para cromatina X” e a maioria dos homens “negativa para cromatina X”, havia exceções (THOMPSON *et al.*, 2002).

A etapa seguinte do conhecimento dos cromossomos sexuais humanos foi a identificação da cromatina sexual em termos da inativação do X (hipótese

de Lyon). A teoria da inativação do X defende a teoria de que nas células somáticas de mulheres normais (mas não de homens normais), um cromossomo X é inativado, desse modo igualando a expressão de genes ligados ao X nos dois sexos. O corpúsculo de Barr representa o cromossomo X inativo de replicação tardia (THOMPSON *et al.*, 2002).

A estrutura do cromossomo Y e seu papel no desenvolvimento sexual foram analisados a nível molecular. Na meiose masculina, os cromossomos X e Y normalmente se pareiam por segmentos nas extremidades dos seus braços curtos e sofrem recombinação nesta área. O segmento de pareamento inclui a região pseudo-autossômica dos cromossomos X e Y, assim denominada porque as cópias desta área ligadas ao X e ao Y são homólogas entre si, como pares de autossomos (THOMPSON *et al.*, 2002).

Em decorrência da recombinação na meiose I, seqüências na região pseudo-autossômica dos cromossomos X e Y são normalmente trocadas. Contudo, em casos raros ocorre recombinação entre os braços curtos do X e Y fora da região pseudo-autossômica, e este mecanismo de troca aberrante pode produzir duas anormalidades raras: homens XX (46,XX) e mulheres XY (46,XY) (THOMPSON *et al.*, 2002).

As anormalidades dos cromossomos sexuais estão entre os distúrbios genéticos humanos mais observados. Os fenótipos associados a estes defeitos cromossômicos são, em geral, menos intensos do que os associados a distúrbios autossômicos comparáveis, porque a inativação do X e o conteúdo aparentemente baixo de genes do cromossomo Y reduzem as conseqüências clínicas do desequilíbrio dos cromossomos sexuais (THOMPSON *et al.*, 2002).

Em alguns recém-nascidos, a determinação do sexo é difícil ou impossível porque a genitália é ambígua, com anomalias que tendem a torná-los semelhantes ao sexo cromossômico oposto. Estes problemas não indicam necessariamente uma anormalidade citogenética dos cromossomos sexuais, pois podem advir de defeitos monogênicos ou de causas não genéticas. Contudo a determinação do cariótipo da criança é parte essencial na análise desse pacientes (THOMPSON *et al.*, 2002).

Na década de 1980, iniciaram-se os estudos de biologia molecular que culminaram, no início da década de 1990, com a definição de uma seqüência de 35 KB no braço curto do cromossomo Y, denominada SRY, responsável pela diferenciação da gônada bissexual em testículo. Desde então, o papel do cromossomo Y tem sido considerado vital na determinação testicular, porém não o cromossomo como um todo, mas uma região situada no seu braço curto (Yp – região 1A1, com 35 Kb) a qual contém a seqüência sinalizadora para a gônada indiferenciada seguir a testículo. Esta pequena região passou a ser chamada de SRY (*Sex-determining region on the Y chromosome*) e se constitui num gene com apenas um éxon que codifica uma seqüência conservada de aminoácidos (HMG Box) e tem sua expressão específica nos testículos. O SRY é atualmente o candidato mais aceito a representar o TDF (*testis determining factor*) (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2001).

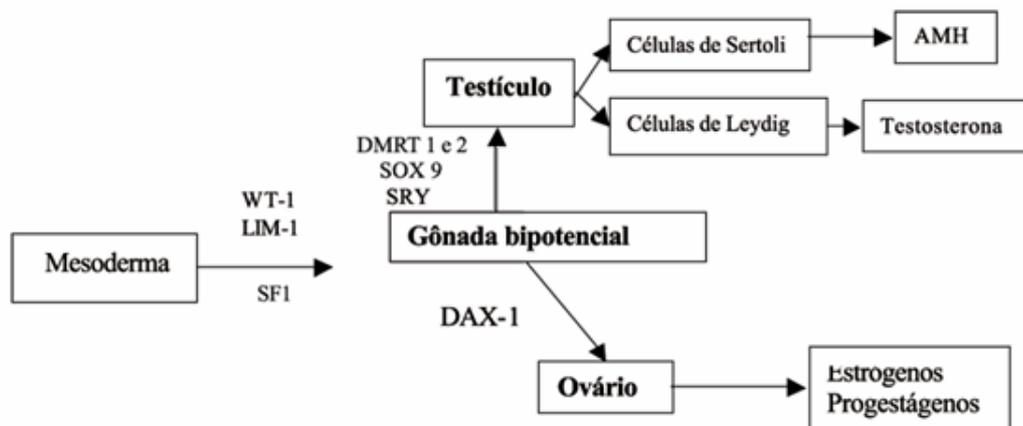


Figura 1. Alguns genes envolvidos na determinação gonadal (Fonte: DAMIANI ET AL, 2001).

No entanto, segundo DAMIANI E COLABORADORES (2001), a caracterização do SRY não esclareceu totalmente o problema da determinação gonadal porque logo ficou aparente que outros genes no cromossomo X (por exemplo; DAX-1), ou em cromossomos autossomos, também deveriam estar implicados nesse processo que foi se revelando muito mais complexo do que imaginado inicialmente. Existe uma tendência “intrínseca” das estruturas, tanto gonadais

quanto dos ductos internos e da genitália externa, a seguir um caminho para sexo feminino. Assim, a diferenciação para o sexo masculino exige a atuação ativa, em momentos decisivos, de fatores envolvidos no processo de diferenciação sexual.

Na presença do SRY, o primeiro evento observável na gônada bissexual é a diferenciação, por volta da sétima semana após a fecundação, de células epiteliais em células de Sertoli, que produzem o chamado hormônio anti-Mülleriano (HAM). HAM é uma glicoproteína de alto peso molecular que induz a regressão dos ductos de Muller. Assim, nos indivíduos do sexo masculino esses ductos são encontrados apenas como resquício embrionário (MACIEL-GUERRA & GUERRA JÚNIOR, 2002).

A ação do HAM tem diversas peculiaridades. Ele não age por via circulatória, e sim por difusão célula a célula, ligando-se ao seu receptor específico, de modo que cada testículo é responsável pela destruição do ducto de Muller de seu lado. Além disso, há uma época específica para a sua produção, já que esses ductos somente são sensíveis ao HAM até a oitava semana (MACIEL-GUERRA & GUERRA JÚNIOR, 2002). A avaliação sérica do hormônio anti-mülleriano (HAM) tornou-se possível há poucos anos, com a comercialização de *kit* de ELISA para diagnóstico específico. Apesar do alto custo, a facilidade da coleta, que não necessita de estímulo com hCG, tem tornado essa avaliação uma opção importante na investigação da ambigüidade genital com cariótipo 46, XY. A avaliação deste hormônio (HAM) apresenta uma estreita correlação com os valores de testosterona, encontrando-se indetectável na síndrome de regressão testicular bilateral, disgenesia gônada e persistência dos ductos de Muller por mutação do gene do HAM. Os valores são elevados (em especial nos primeiros meses de vida) na insensibilidade androgênica, deficiência de síntese de testosterona e persistência dos ductos de Muller por mutação do gene do receptor do HAM (THOMPSON *et al.*, 2002).

A partir da oitava/nona semana, as células de Leydig fetais produzem a testosterona, que estabiliza os ductos de Wolff e permitem sua diferenciação em epidídimo, canal deferente, vesícula seminal e ducto ejaculatório. Na ausência do cromossomo Y, como em uma mulher normal (46,XX), o córtex da

gônada indiferenciada desenvolve-se em ovário. Não há produção de testosterona, nem do hormônio anti-Mülleriano. Os ductos de Muller formam a genitália interna feminina, inclusive a porção superior da vagina, o útero e as tubas uterinas. A genitália externa não se desenvolve como no sexo masculino, evoluindo para a genitália externa feminina normal. Sem os efeitos estimuladores da testosterona, os ductos de Wolff regridem (MACIEL-GUERRA & GUERRA JÚNIOR, 2002).

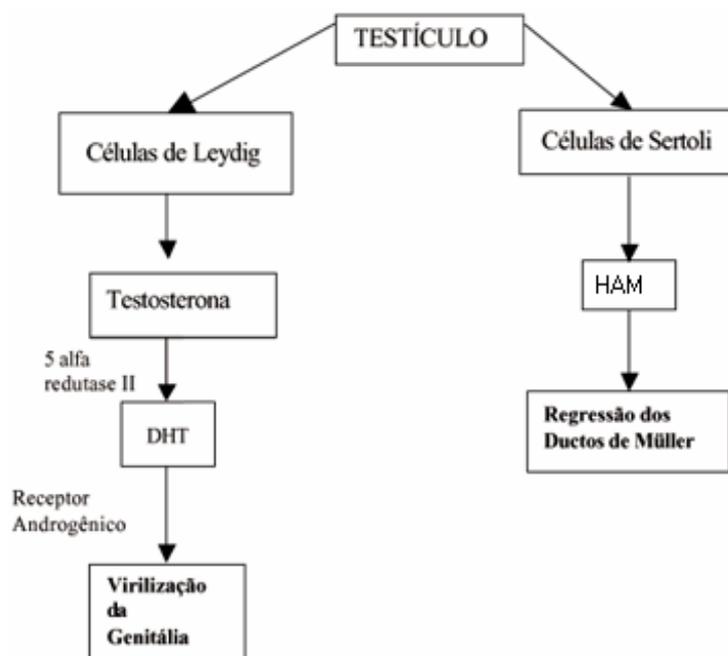


Figura 2. Diferenciação sexual masculina (Fonte: DAMIANI *ET AL.*, 2001).

A diferenciação sexual normal completa-se aproximadamente entre a décima segunda e décima quarta semanas de gestação, embora os testículos não migrem para o escroto até o fim da mesma. Tendo em vista a complexidade de eventos que ocorre entre a sexta e a décima quarta semanas de gestação, não é surpreendente (apesar de não ser o desejável) que várias anormalidades genéticas interfiram em diferentes etapas, podendo muitas

vezes ocasionar ambigüidade sexual ou ambigüidade genital, objeto deste trabalho (MACIEL-GUERRA & GUERRA JÚNIOR, 2002).

Dentre as várias situações que podem configurar uma emergência pediátrica no recém-nascido, as ambigüidades genitais surgem com grande importância, tanto do ponto de vista imediato, já que a origem de algumas doenças coloca a vida da criança em risco; como a longo prazo, em que uma situação de definição de sexo mal resolvida acarretará prejuízos irreparáveis ao bem-estar psicossocial do paciente (MACIEL-GUERRA & GUERRA JÚNIOR, 2002).

Dados de anamnese, exame físico, avaliação hormonal, exames de imagens e uma discussão multidisciplinar vão permitir que se tome a melhor conduta com relação ao sexo de criação de uma criança com ambigüidade genital, tornando-se desnecessário enfatizar a importância de todo esse processo (MACIEL-GUERRA & GUERRA JÚNIOR, 2002).

Os critérios internacionalmente adotados para definição de ambigüidade genital têm sido os elaborados por DANISH (1982), para os quais deve haver um ou mais dos seguintes resultados ao exame clínico:

Em genitália de aparente sexo masculino:

- Gônadas não palpáveis;
- Gônadas pequenas (maior diâmetro inferior a 0,8cm);
- Presença de hipospadia;
- Microfalo (medida longitudinal do falo esticado menor que 2,5 desvios-padrão da média do tamanho normal para a idade);
- Presença de massa inguinal.

Em genitália de aparente sexo feminino:

- Gônada(s) palpável(is);
- Clitoromegalia (diâmetro clitoridiano superior a 0,6cm);
- Algum grau de fusão das saliências labioescrotais;
- Presença de massa inguinal.

De acordo com DANISH (1982), qualquer das alterações mencionadas é suficiente para levantar a suspeita de uma ambigüidade genital. Sem utilizar critérios rígidos, entretanto, uma genitália é ambígua sempre que ofereça

dificuldade para o médico atribuir a determinação do sexo à criança, exigindo assim uma investigação mais completa.

Apesar de ser claro que o sexo genotípico não define isoladamente o sexo de criação, é fundamental a sua realização para o direcionamento da investigação laboratorial. O exame do cariótipo permite a detecção de alterações cromossômicas numéricas ou estruturais em cromossomos sexuais ou autossomos, em cariótipos homogêneos ou em mosaico (presença de mais de uma linhagem de células somáticas em um mesmo indivíduo oriundas de uma mesma fonte genética), ou a presença de quimerismo (presença de mais de uma linhagem de células somáticas em um mesmo indivíduo oriundas de fontes genéticas diferentes). Os exames de cromatina sexual (X e Y) não devem ser os únicos empregados, devido aos erros inerentes à técnica (falsos positivos e negativos) e à dificuldade na interpretação desses exames (THOMPSON *et al.*, 2002).

Distúrbios de Diferenciação Gonadal

Hermafroditismo Verdadeiro (HV)

Um hermafrodita verdadeiro possui tecido testicular e ovariano, e geralmente genitália ambígua. O cariótipo típico é 46,XX mas alguns pacientes (10%) são 46,XY. Uma pequena porcentagem dos hermafroditas verdadeiros são quimeras, cujos tecidos se compõem de uma mistura de células XX e XY. A quimera é composta de células derivadas de zigotos diferentes, podendo ocorrer quando gêmeos dizigóticos permutam células pluripotenciais hematopoéticas *in útero* ou, muito raramente, quando dois zigotos separados se fundem num indivíduo. Se os zigotos originais são de sexos diferentes, pode sobrevir um hermafroditismo verdadeiro (THOMPSON *et al.*, 2002).

O hermafroditismo verdadeiro XX foi estudado em negros no sul da África, onde sua incidência é relativamente alta (RAMSAY, *et al.*, 1988). A condição não tem herança monogênica e, ao contrário dos achados na maioria dos homens XX, os pacientes não possuem material do cromossomo Y detectável. A ausência de seqüências de DNA específicas do Y no paciente

indica que este tipo de hermafroditismo verdadeiro é distinto da forma mais comum de masculinidade 46,XX. Contudo, há relatos de homens XX e hermafroditas verdadeiros XX coexistindo no mesmo heredograma, o que indica uma etiologia comum (DE LA CHAPELLE, 1988). Assim, parece que o hermafroditismo verdadeiro tem mais de uma causa.

O HV é um diagnóstico histopatológico, com a demonstração de tecido testicular (com túbulos seminíferos e/ou espermatozóides) e ovariano (com folículos) presentes num mesmo indivíduo. Nenhuma característica clínica diferencia claramente o hermafrodita verdadeiro das outras causas de ambigüidade genital. Na maioria dos casos relatados existe ambigüidade genital sendo mais freqüente a genitália, predominantemente, masculina. A partir da puberdade, porém, mais de 75% dos pacientes desenvolvem aumento de mamas, e cerca de 50% menstruam (MACIEL-GUERRA & GUERRA JÚNIOR, 2002).

Disgenesia Gonadal Mista

A disgenesia gonadal mista, também chamada de Disgenesia Gonadal Assimétrica, descrita por SOHVAL E COLABORADORES em 1963, constitui um grupo heterogêneo de pacientes com ambigüidade da genitália externa, apresentando um testículo com graus variáveis de disgenesia de um lado e uma gônada em fita (*streak*) do outro. O cariótipo mais freqüente é o mosaicismo 45,X/46,XY. Derivados müllerianos não só do lado do *streak*, mas também do lado do testículo podem estar presentes. Dependendo do grau de função das células de Leydig (produtoras de testosterona) e de Sertoli (produtoras de HAM) há graus maiores ou menores de desenvolvimento dos ductos de Wolff e de Muller (THOMPSON *et al.*, 2002).

Homem XX

Neste caso, em um indivíduo com sexo genético 46,XX desenvolvem-se testículos com capacidade de produção de testosterona e de virilização da genitália externa. Na verdade, cerca de 1/5 desses pacientes apresentam ambigüidade genital, o que permite que o diagnóstico seja feito na faixa etária

pediátrica. De outra forma, como todos são inférteis, seus diagnósticos acabam sendo realizados quando da procura de clínicas de infertilidade. Em cerca de 80% desses pacientes detecta-se a presença do SRY. Como os genes responsáveis pela espermatogênese encontram-se no braço longo do Y, o qual esses pacientes não apresentam, todos são inférteis. Este detalhe, ou seja, a incapacidade dos testículos produzirem espermatozoides justifica a colocação desses pacientes no grupo das disgenesias gonadais ou dos “distúrbios de diferenciação gonadal”. De outra forma, ao menos nos casos em que a genitália externa é ambígua, poderiam ser classificados como uma forma de pseudo-hermafroditismo masculino (THOMPSON *et al.*, 2002).

Pseudo-hermafroditismo

Pseudo-hermafroditas são “pseudo” porque, diferentemente dos hermafroditas verdadeiros, possuem tecido gonadal de apenas um sexo. Os pseudo-hermafroditas masculinos têm um cariótipo 46,XY ou são mosaicos com linhagem celular XY, e os pseudo-hermafroditas femininos são 46, XX. Em ambos os casos, a genitália externa é ambígua ou típica do sexo cromossômico oposto (THOMPSON *et al.*, 2002).

As causas de **pseudo-hermafroditismo masculino (PHM)** incluem disgenesia das gônadas durante o desenvolvimento embrionário, anormalidades das gonadotropinas, erros inatos da biossíntese de testosterona e anormalidades das células-alvo dos androgênios (Síndrome de Insensibilidade aos Androgênios). O PMH é caracterizado por indivíduo com ambigüidade de genitália externa, presença de testículos e cariótipo 46,XY (THOMPSON *et al.*, 2002).

O **pseudo-hermafroditismo feminino (PHF)** deve-se geralmente à hiperplasia supra-renal congênita, distúrbio autossômico recessivo da biossíntese de cortisol, que nas formas perdedoras de sal, constituem uma situação de risco de vida. A genitália externa de fetos femininos é ambígua, com a presença de ovários e de cariótipo 46,XX. Mas também, a genitália externa pode tornar-se masculinizada se a circulação fetal contiver quantidades

excessivas de hormônios sexuais masculinos ou femininos, os quais podem originar-se no feto, como na hiperplasia supra-renal congênita, ou na mãe (THOMPSON *et al.*, 2002).

Síndrome de Insensibilidade aos Androgênios (Feminização Testicular) – (PHM)

Neste distúrbio, antigamente designado Feminização Testicular, as pessoas afetadas parecem mulheres normais, mas pertencem ao sexo cromossômico masculino (cariótipo 46,XY), têm gônadas masculinas, com órgãos genitais externos femininos aparentemente normais, mas têm uma vagina em fundo de saco e não têm útero nem tubas uterinas. Testículos estão presentes dentro do abdome, nos grandes lábios ou no canal inguinal, onde às vezes são confundidos com hérnias em lactentes que, nos demais aspectos, parecem ser meninas normais, e podem apresentar um número normal ou mesmo aumentado de células de Leydig, produtoras de hormônio masculino. Embora os testículos secretem androgênio normalmente, não há resposta dos órgãos-alvo aos androgênios, resultante da ausência de receptores específicos no citosol das células-alvo apropriadas (WILKINS, 1950; MORRIS, 1953; VOGEL & MOTULSKY, 2000).

Diversas variantes da insensibilidade aos androgênios, algumas com expressão mais leve, podem ser alélicas da forma clássica (PINSKY & KAUFMAN, 1987).

Hiperplasia Supra-renal Congênita (HSC) – (PHF)

A hiperplasia supra-renal congênita é um grupo de distúrbios autossômicos recessivos que se originam de defeitos nas enzimas do córtex supra-renal essenciais a biossíntese de cortisol, e resultam na virilização de lactentes do sexo feminino. Embora qualquer uma das várias etapas enzimáticas possa ser defeituosa na HSC, sem dúvida o defeito mais comum é a deficiência de 21-hidroxilase, pois obstrui a via biossintética normal, causando superprodução dos precursores, que são então, desviados para a via de biossíntese de androgênios, o que acarreta níveis anormalmente altos de

androgênios. As meninas homozigóticas para a deficiência de 21-hidroxilase nascem com genitália ambígua, muitas vezes exigindo correção cirúrgica. Os meninos afetados apresentam órgãos genitais externos normais e podem passar despercebidos no início da lactância. Numa época posterior da infância, em ambos os sexos o excesso de androgênio leva a um rápido crescimento e maturação esquelética acelerada (THOMPSON *et al.*, 2002).

O locus da 21-hidroxilase situa-se no braço curto do cromossomo 6, dentro do complexo de histocompatibilidade principal HLA. Não apenas o gene é geneticamente ligado ao HLA, mas formas diversas de HSC mostram associações com haplótipos do HLA diferentes, sugerindo que as mutações variadas originaram-se em meiose de haplótipos específicos. Esta informação pode ter utilidade no diagnóstico pré-natal da HSC, com métodos de DNA e análise de ligações genéticas (THOMPSON *et al.*, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

A expectativa gerada em torno do nascimento de uma criança envolve diversos fatores, mas em geral, o que se deseja é que ela nasça “normal”, sem problemas ou deficiências.

Quando a criança nasce com alguma anormalidade e/ou distúrbio graves, os pais certamente se questionam sobre o porquê deste acontecimento.

Distúrbios que afetam a determinação e a diferenciação sexuais, tais como ambigüidade genital, em geral, acometem conflitos diversos e envolvem não somente questões médicas complexas e urgentes, como problemas psicológicos extremamente sérios. Embora a sociedade tenha se tornado muito mais esclarecida, os problemas que afetam a diferenciação sexual ainda estão cercados de preconceitos.

Os distúrbios de determinação e diferenciação sexuais apresentam-se tipicamente no recém-nascido, sob a forma de ambigüidade da genitália externa, objeto deste trabalho, ou então no adolescente, especialmente sob a

forma de atraso puberal, mas também sob a forma de características puberais heterossexuais. O resultado, freqüentemente, é um grande impacto psicológico para as famílias, e certamente, para os próprios indivíduos diretamente afetados.

Não são todos os distúrbios da diferenciação sexual que se manifestam por ambigüidade genital no recém-nascido; alguns somente serão avaliados na época da puberdade, por se apresentarem como atraso no aparecimento das características sexuais secundárias, ou ainda, essas mesmas características com padrão heterossexual no adolescente. Contudo, o ideal é a tentativa de identificação desses casos ainda no período neonatal, devendo-se nessa época iniciar-se uma pronta investigação.

A detecção da ambigüidade genital será tanto mais fácil quanto mais grave for sua apresentação. Portanto, quando as alterações são discretas, é maior a chance de que não seja feito um diagnóstico precoce de grande importância (MACIEL-GUERRA & GUERRA JÚNIOR, 2002).

Freqüentemente um indivíduo ou casal fica chocado quando toma conhecimento, pela primeira vez de um diagnóstico genético. Todavia, é clara a necessidade de envolvimento de vários profissionais da área da saúde para alcançar tal objetivo: pediatras, geneticistas, endocrinologistas, ginecologistas, psicólogos e/ou psiquiatras. A união do conhecimento destas diversas áreas permitirá não somente a rapidez do diagnóstico, como também a uniformização das informações à família, e conseqüente confiança da família na equipe médica como um todo.

No Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC – Unicamp) foi criado, em 1988, o GIEDDS – Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo, com objetivos de dinamizar o atendimento de pacientes (nascidos no HC – Unicamp ou encaminhados a essa instituição) com alterações na determinação ou diferenciação do sexo; padronizar condutas gerais e específicas para as diversas patologias da área; dar orientações médica e psicológica, bem como assessoria médico-legal aos pacientes e às respectivas famílias; desenvolver pesquisas na área, dentre outros. Hoje, os objetivos do GIEDDS vêm sendo cumpridos integralmente,

aliando a assistência ao ensino e à pesquisa e fazendo com que estes últimos se revertam constantemente em benefício da primeira, num círculo virtuoso que é um reflexo da dedicação de todos.

A Rede Pública de Saúde do Distrito Federal dispõe, hoje, de quadro de profissionais insuficiente, que possibilite a avaliação de cariótipos neonatais para o diagnóstico e tratamento precoce de crianças com apresentação de ambigüidade genital, e fornecimento de apoio e aconselhamento genético necessários às famílias, antes que sofram as conseqüências sociais e psicológicas da presença destas características em um dos membros familiares.

Este quadro pode ser modificado a partir do desenvolvimento de projetos que demonstrem a necessidade e os benefícios adquiridos com o diagnóstico precoce de anomalias e a correta indicação de tratamento, tendo em vista que saúde deve ser sempre tratada de forma preventiva e não “imediatista”. Afinal, tratamentos preventivos são menos onerosos, dolorosos e mais duradouros.

Nos casos de crianças com ambigüidade genital, é fundamental que o diagnóstico correto seja realizado antes que haja uma definição do sexo social e, principalmente, psicológico. Portanto, o ideal é a identificação desses casos ainda no período neonatal, devendo-se iniciar nessa época uma pronta investigação. Essa avaliação deverá acontecer o mais precoce possível, evitando algumas possíveis situações de risco de vida para o paciente, como no caso da hiperplasia congênita das supra-renais na forma perdedora de sal, e minimizando os problemas psicológicos e sociais da família em relação à incerteza sobre o sexo do seu filho.

Apesar do trabalho de investigação etiológica ser, em muitos casos, difícil e exigir um especialista, faz-se necessário detectar o problema e fazer o primeiro contato com a família, preparando-a para os passos seguintes a serem desenvolvidos, o que ajuda imensamente no lidar com a família, evitando verdadeiras tragédias que, infelizmente, encontram-se no dia-a-dia de tais pacientes.

3. RISCOS E BENEFÍCIOS

Para a realização desse projeto foi necessária a coleta de 5mL de sangue de cada paciente, a qual será realizada pela própria equipe hospitalar responsável por esse menor. O procedimento de coleta de sangue foi realizado com seringa e agulha descartáveis, da forma convencional, como acontece em laboratórios de patologia clínica na realização de exames de rotina (hemograma, glicemia, entre outros). Ressalte-se que a realização deste exame não compromete a saúde do paciente e não traz riscos ao mesmo.

Como já dito anteriormente, nos casos de crianças com ambigüidade genital, é fundamental que o diagnóstico seja realizado precocemente, antes que haja uma definição do sexo social e, principalmente, psicológico. O diagnóstico precoce permite a correta indicação de tratamento, quando necessário, além de minimizar problemas psicológicos e sociais da família em relação à incerteza sobre o sexo do seu filho.

4. OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo principal a determinação do sexo genético em indivíduos portadores de ambigüidade genital ou de distúrbio de diferenciação sexual, através de cultura temporária de linfócitos periféricos.

5. CASUÍSTICA & MÉTODO

Os procedimentos laboratoriais deste estudo foram realizados no Laboratório Multidisciplinar da Faculdade de Ciências da Saúde, no Centro Universitário de Brasília - LaboCien. Os pacientes estudados são provenientes da rede hospitalar pública do Distrito Federal, atendidos no serviço ambulatorial do Hospital Regional da Asa Sul e Hospital de Base de Brasília da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal.

Esse projeto de pesquisa faz parte do programa de bolsas de iniciação científica oferecido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), em Convênio com a instituição de ensino superior UniCEUB – Centro Universitário de Brasília. O período de vigência da bolsa foi de 12 meses, sendo prorrogável por mais 12 meses. Ressalte-se que para renovação do projeto é necessário reavaliação pelo Comitê de Análise de Projetos de Iniciação Científica, tanto quanto ao mérito científico quanto aos resultados apresentados até o pedido de renovação da bolsa.

Durante o período de realização da pesquisa, o responsável pela criança poderia solicitar a qualquer momento informações sobre os procedimentos adotados para a realização da mesma, além do resultado do exame, tendo o direito de abandonar a pesquisa a qualquer momento, se assim desejasse, bastando para isso comunicar sua decisão à líder do projeto, de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) elaborado com base na Resolução nº 340/04 do Conselho Nacional de Saúde (a qual incorpora a Resolução nº 196/96 - CNS, dentre outras), que foi previamente lido e assinado pelo responsável da criança (Anexo 1).

Cabe ressaltar que todos os participantes têm garantida a não-utilização de seus dados por nenhum outro projeto de pesquisa. Além disso, não havia previsão de ressarcimento aos participantes desse projeto, pois todos os procedimentos ocorreram enquanto a criança estava sendo atendida no hospital com algum acompanhante ou responsável.

5.1 Seleção dos pacientes

Após diagnóstico clínico realizado pelos médicos responsáveis foram incluídos no presente projeto os pacientes atendidos no Hospital Regional da Asa Sul e no Hospital de Base de Brasília da Rede Pública do Distrito Federal, portadores de ambigüidade genital e distúrbio de diferenciação sexual (durante o período de vigência da bolsa).

Para cada paciente foi realizada anamnese (Anexo 2) através de questionário preenchido sob responsabilidade da professora orientadora do projeto com base em informações cedidas pelo responsável da criança, ou

acompanhante no momento da consulta, ou durante o período de internação se necessário, em casos de tratamentos cirúrgicos. O questionário citado incluiu dados de identificação, antecedentes familiares patológicos e principalmente, fatos relevantes referentes à gestação da criança, como o contato da mãe com fatores químicos, físicos e/ou biológicos, além do uso de hormônios durante a gestação.

A professora Dr^a. Fernanda Costa Vinhaes de Lima, orientadora do projeto, é a responsável pela manutenção e guarda desses dados da pesquisa em arquivos sigilosos. Além da professora responsável, apenas a aluna orientada, Edna Alves de Santana Esteves, terá acesso a esses dados, para futuras análises e interpretação dos mesmos, objetivando apenas o crescimento acadêmico.

Os pacientes foram selecionados segundo os critérios internacionalmente adotados para definição de ambigüidade genital (DANISH, 1982), para os quais deve haver um ou mais dos seguintes resultados ao exame clínico:

5.1.1 Critérios de inclusão para pacientes portadores de genitália de aparente sexo masculino

Os critérios de inclusão para esse grupo são: (1) gônadas não palpáveis, (2) gônadas pequenas (maior diâmetro inferior a 0,8cm), (3) presença de hipospádia, (4) microfalo (medida longitudinal do falo esticado menor que 2,5 desvios-padrão da média do tamanho normal para a idade), (5) presença de massa inguinal.

5.1.2 Critérios de inclusão para pacientes portadores de genitália de aparente sexo feminino

Os critérios de inclusão para esse grupo são: (1) gônada(s) palpável(is), (2) clitoromegalia (diâmetro clitoridiano superior a 0,6cm), (3) algum grau de fusão das saliências labioescrotais, (4) presença de massa inguinal.

5.1.3 Critério de exclusão

O critério de exclusão para este projeto de pesquisa é a ausência de qualquer uma das alterações mencionadas. Sendo assim, para esse projeto de pesquisa, foram excluídos os pacientes que não ofereceram dificuldade para o médico na determinação do seu sexo genético, tornando-se desnecessária investigação citogenética.

5.2 Estudo citogenético em cultura temporária de células de sangue periférico

O material dos pacientes foi submetido à avaliação microscópica do cariótipo e das alterações numéricas e/ou estruturais, utilizando-se do método de cultura temporária de linfócitos periféricos, conforme a técnica modificada de MOORHEAD *et al.* (1960).

5.2.1 Coleta de amostra de células de sangue periférico

Após a devida anuência dos responsáveis pelo paciente, e seguindo os preceitos recomendados pela Comissão de Ética em Pesquisa (Anexo 1), foi realizada a coleta de 5mL de sangue periférico, por técnico competente da rede hospitalar, nos pacientes deste projeto, mediante punção venosa em membro superior, utilizando-se de seringas e de agulhas descartáveis estéreis. A superfície interna da seringa foi previamente umedecida com uma solução de heparina sódica (Liquemine "Roche"®, Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos S/A, Rio de Janeiro, RJ), frasco-ampola de 5000 U/mL, com desprezo de todo o excesso da solução anticoagulante contida no interior da seringa.

5.2.2 Critérios de armazenamento e transporte do sangue periférico coletado.

O tempo ideal para o transporte da maioria dos materiais biológicos ao laboratório é de 60 minutos, visando garantir a qualidade do material transportado. Salienta-se que o acondicionamento e preparo da amostra, para

transporte, permite seu deslocamento sem comprometer a qualidade da análise.

O sistema de transporte e o processo de identificação da amostra dos pacientes são fatores fundamentais para a liberação de dados confiáveis. O transporte do material foi feito por meio de caixa climatizada (temperatura ambiente, 20 a 25°C) protegido da exposição direta à luz com controle de temperatura e dispositivo de segurança. O acondicionamento das amostras foi feito em frascos *vacutaine*, ou nas próprias seringas onde o material foi coletado, devidamente lacrada para evitar vazamento e mistura das amostras. Após a coleta, cada frasco ou seringa foi colocado em saco plástico, individualizando a amostra, devidamente identificada com etiquetas contendo: data e horário de coleta, nome do paciente e responsável, além de um código alfanumérico fornecido para este projeto de pesquisa. Cada paciente recebeu um único código que foi mantido mesmo nos casos em que foi necessária a repetição do exame.

5.2.3 Técnica de semeadura de células de sangue periférico

O sangue colhido foi introduzido em tubo de ensaio estéril juntamente com meio de cultura RPMI-1640, com glutamina e sem bicarbonato de sódio. A seguir, procedeu-se a semeadura em dois frascos contendo meio de cultura completo. O processo de semeadura consiste na adição de 0,5 mL do concentrado linfocitário, utilizando-se de pipeta graduada estéril, em cada frasco contendo 4,5 mL do meio de cultura, resultando no volume final de 5 mL. Todas as amostras foram semeadas no mesmo dia de sua respectiva obtenção, com observação rigorosa dos princípios de assepsia, e sob câmara de fluxo laminar.

5.2.4 Composição do meio de cultura

O meio modificado RPMI-1640, enriquecido com HEPES, com glutamina e sem bicarbonato de sódio (Life Technologies – GIBCO), contendo 10,42g sob a forma de pó, dissolvido em 1000 mL de água destilada e deionizada.

Ao meio de cultura RPMI-1640, procedeu-se à suplementação dos seguintes componentes: (1) Soro bovino fetal (Life Technologies – GIBCO) utilizado na proporção de 15% do volume total da cultura; (2) Garamicina 20 µL - Sulfato de gentamicina (Genérico); (3) Heparina sódica, frasco-ampola de 5000 U/mL, (Liquemine "Roche"®, Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos S/A, Rio de Janeiro, RJ).

5.2.5 Técnica de cultura de células de sangue periférico

Após a semeadura, os frascos contendo o meio de cultura e o concentrado linfocitário dos pacientes, serão colocados em estufa de CO₂ úmida, sob temperatura de 37°C durante o período de 72 horas. Foram realizadas para cada paciente, culturas em duplicatas. Todas estas culturas tratadas com colchicina "alkaloid" (Karyomax – Life Technologies – GIBCO) para bloquear a divisão celular em metáfase. A cada frasco de cultura foi adicionado 0,05 mL da solução de colchicina, uma hora antes de completar o período de incubação; isto é, após 71 horas de incubação.

5.2.6 Técnica de separação e fixação das células

Após o período de incubação, procedeu-se à transferência do conteúdo de cada frasco de cultura para o seu respectivo tubo de centrífuga de fundo cônico, previamente identificado. Os tubos cônicos serão colocados na centrífuga (Centrífuga International, modelo K, tamanho 2, rotor nº 250, não refrigerada) durante o período de 10 minutos, a 1000 rotações por minuto. A seguir, o sobrenadante resultante da centrifugação será desprezado. Ao resíduo contendo as células acrescenta-se 8 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio 0,075 M (Merck S/A Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ), previamente aquecida sob temperatura de 37°C, seguida da agitação em Vortex.

Após completa homogeneização, os tubos ficarão em estufa, sob temperatura de 37°C, por quinze minutos. Em seguida, os tubos serão submetidos à nova centrifugação, durante o período de oito minutos, a 1000 rotações por minuto. O sobrenadante será novamente desprezado,

adicionando-se ao resíduo 5mL de solução fixadora recém-preparada, constituída de metanol (Álcool metílico P.A., Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ) e ácido acético (Ácido acético glacial P.A., Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ), na proporção de 3 para 1. A homogeneização no Vortex, será repetida, seguida da centrifugação a 1000 rotações por minuto, por oito minutos. Esse último procedimento com acréscimo da solução fixadora será repetido por pelo menos, mais três vezes. À última fixação acrescenta-se apenas 1mL da solução fixadora sobre o resíduo de células, com a finalidade de se obter a diluição apropriada para o preparo das lâminas.

5.2.7 Preparo e coloração das lâminas

As lâminas de vidro utilizadas na preparação citológica foram adequadamente limpas e mantidas em água destilada, dentro de geladeira, sob temperatura de 4° a 6°C. No momento do uso, as lâminas, já fora da geladeira, foram posicionadas de modo ligeiramente inclinado e, sobre sua superfície ainda úmida, depositada uma gota do resíduo de células.

Após a devida secagem das lâminas, estas passaram pelo processo de bandeamento G, utilizando-se enzima tripsina. As lâminas, assim preparadas, foram introduzidas em solução de Giemsa (Grupo Química, Penha, RJ) diluída em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8 (Fosfato dibásico de sódio Na₂HPO₄, Fosfato monobásico de potássio – KH₂PO₄, Merck S/A Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ), na proporção de 1 para 30, durante o período de cinco minutos. Cada lâmina devidamente identificada e corada foi reservada para avaliação citogenética.

5.2.8 Análise citogenética

A análise citogenética foi realizada com objetiva de imersão para ampliação de 100 X e ocular de 10X, com um aumento final da imagem de 1000X. Para o diagnóstico citogenético foram analisadas pelo menos 60 metáfases de cada paciente, para descartar qualquer possibilidade de mosaicismos celulares.

6. RESULTADOS

6.1 Características gerais dos pacientes

A partir do acompanhamento do serviço realizado no Ambulatório de Genética Clínica do HRAS foi possível contabilizar 16 (dezesesseis) pacientes diagnosticados como portadores de ambigüidade genital ou distúrbio de diferenciação sexual entre os meses de Março de 2005 e Junho de 2006, com idades variadas desde os 03 (três) dias de vida até 15 (quinze) anos de idade, conforme demonstrado na Tabela 1. Verifica-se que a grande maioria dos pacientes (43,8%) foi diagnosticada ainda no primeiro mês de vida, sendo o Hospital Regional da Asa Sul (HRAS) o que mais atendeu os pacientes analisados (Figura 3).

Tabela 1: Faixa etária dos pacientes portadores de ambigüidade genital ou distúrbio de diferenciação sexual ao diagnóstico.

Idade (meses)	Nº	%
0 - 1	7	43,8
1 - 6	2	12,5
6 - 12	1	6,3
12 - 36	1	6,3
36 - 60	1	6,3
> 60	4	25,0
Total	16	100,0

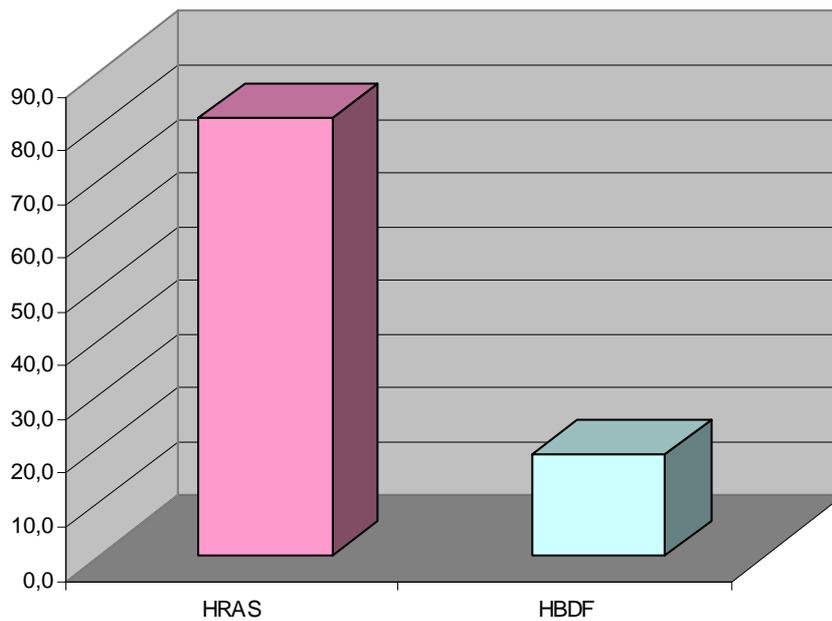


Figura 3: Percentual de pacientes portadores de ambigüidade genital ou distúrbio de diferenciação sexual atendidos no HRAS e no HBDF entre os meses de Março/ 2005 e Junho/2006.

A tabela 2 descreve os pacientes estudados quanto à aparência da genitália externa. Consta-se que 43,8% dos pacientes apresentavam genitália externa com aspecto feminino, enquanto 37,5% tinham aspecto masculino. Em menor percentual (18,8%) não foi possível classificar a genitália externa quanto ao seu aspecto, devido à ambigüidade característica de alguns pacientes portadores destas anomalias em estudo.

Tabela 2: Aparência física da genitália dos pacientes diagnosticados como portadores de ambigüidade genital ou distúrbio de diferenciação sexual.

Aparência genitália	Nº	%
Feminina	7	43,8
Masculina	6	37,5
Não identificada	3	18,8
Total	16	100,0

Além das características já mencionadas, foram também questionados dados como consangüinidade entre os pais dos pacientes e a idade dos mesmos. Em 50% dos pacientes não existe nenhum tipo de parentesco entre seus pais. Quando os informantes não sabiam responder a esta questão com certeza definitiva, esse dado não era considerado (tabela 3). A idade dos pais apresentou distribuição aleatória entre 16 e 41 anos de idade, faixa etária correspondente à fase reprodutiva da espécie humana, não sendo, portanto um dado que demonstre qualquer relevância científica.

Tabela 3: Relação percentual dos pacientes portadores de ambigüidade genital ou distúrbio de diferenciação sexual em função da consangüinidade dos pais.

Consangüinidade	Nº	%
Não	8	50,0
Sim	1	6,3
Não relatado	7	43,8
Total	16	100,0

6.2 Análise Citogenética

A coleta de sangue para análise citogenética foi realizada em todos os pacientes, entretanto não foi possível concluir a análise em 31,3% dos pacientes, devido à data de coleta deste material. Esse material continua em análise e seu resultado será publicado posteriormente. O resultado da análise citogenética destes pacientes encontra-se na figura 4. Na tentativa de melhor descrever os resultados obtidos foi realizado um estudo comparativo entre o diagnóstico citogenético final e o aspecto da genitália externa para cada paciente. Tal estudo comparativo apresenta-se na tabela 3.

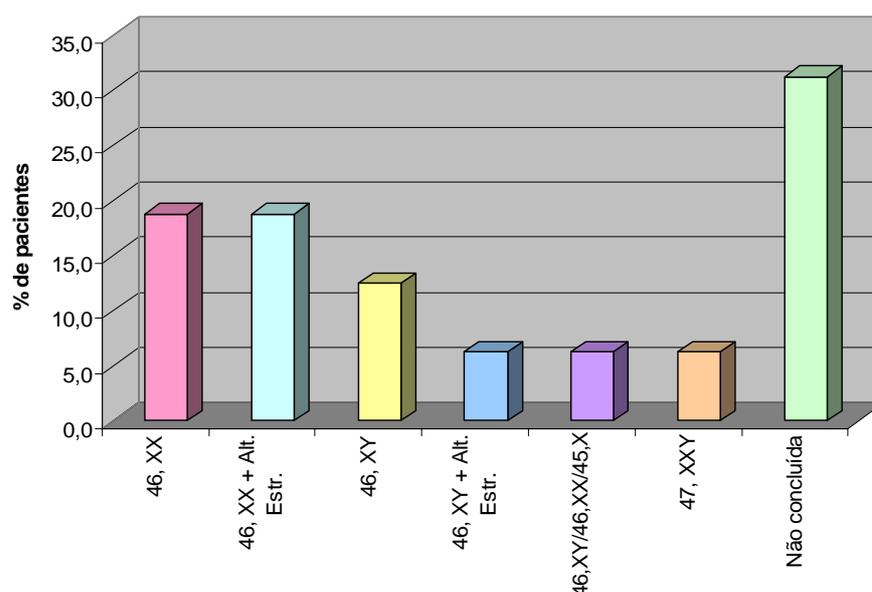


Figura 4: Resultado da análise citogenética em pacientes portadores de ambigüidade genital ou distúrbio de diferenciação sexual atendidos no HRAS e no HBDF entre os meses de Março/ 2005 e Junho/2006.

Tabela 3: Comparativo entre o resultado da análise citogenética e o aspecto da genitália externa em pacientes portadores de ambigüidade genital ou distúrbio de diferenciação sexual atendidos no HRAS e no HBDF entre os meses de Março/ 2005 e Junho/2006.

Resultado Citogenético	Aparência da genitália externa					
	Feminina	%	Masculina	%	Ambígua	%
46,XX	2	28,6	0	0,0	1	33,3
46,XY	1	14,3	1	16,7	0	0,0
46,XX + Alt. Estr.	3	42,9	1	16,7	0	0,0
46,XXY	0	0,0	1	16,7	0	0,0
46,XY/46,XX/45,X	0	0,0	0	0,0	1	33,3
Indeterminado	1	14,3	3	50,0	1	33,3
Total	7	100,0	6	100,0	3	100,0

7. DISCUSSÃO

O presente projeto recebeu aprovação para o início de suas atividades, por esta instituição de ensino, em julho de 2005, tendo sido primeiramente avaliado pelo Comitê de análise de projetos de pesquisa, pelo Labocien. Conseqüentemente, por tratar-se de um projeto de pesquisa envolvendo o estudo de seres humanos, também foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do UniCEUB (CEP/UniCeub), criado em 14 de setembro de 2004, estando credenciado para exercer suas funções junto à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde desde o dia 18 de outubro de 2005.

Como o objetivo principal do projeto é a determinação do sexo genético em indivíduos portadores de ambigüidade genital ou de distúrbio de diferenciação sexual, através de cultura temporária de linfócitos periféricos, atendidos no Hospital Regional da Asa Sul da Rede Pública do Distrito Federal, tornou-se necessária a avaliação deste mesmo projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde, para o início das atividades propostas.

As características e atribuições dos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) no Brasil estão contidas na Resolução nº. 340/04 (a qual incorpora a Resolução nº. 196/96 - CNS, e no que couber, as disposições constantes das Resoluções CNS nº. 251/97, 292/99, 303/2000 e 304/2000) do Conselho Nacional de Saúde (Anexo 3). De acordo com a mesma Resolução, "toda pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser submetida à apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa" cuja missão é salvaguardar os direitos e a dignidade dos sujeitos da pesquisa, além de contribuir para a qualidade dos trabalhos científicos e para a discussão do papel da produção de conhecimento no desenvolvimento institucional e no desenvolvimento social da comunidade. Contribui, ainda, para a valorização do pesquisador que recebe o reconhecimento de que sua proposta é eticamente adequada.

Cabe à instituição onde se realizam as investigações a constituição do CEP. Sendo assim, toda pesquisa com seres humanos desenvolvida no UniCEUB deve ser aprovada, inicialmente pelo CEP da universidade,

obedecendo as Resoluções da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos (CONEP), do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

O parecer final determinando a aprovação deste projeto de pesquisa foi finalmente obtido em fevereiro de 2006 pelo CEP/SES-DF. O projeto foi aprovado por um período de dois anos.

Sendo assim, a coleta de dados iniciou-se em 08 de março de 2006, após a devida apresentação da equipe de estudo aos responsáveis por este serviço no Hospital Regional da Asa Sul (HRAS). Desde a citada data a aluna e sua orientadora, responsáveis por este projeto, acompanharam os atendimentos ambulatoriais de Genética Clínica no HRAS para o conhecimento e possível inclusão de pacientes portadores de ambigüidade genital ou distúrbio de diferenciação sexual, no presente estudo.

As ambigüidades genitais constituem uma verdadeira emergência pediátrica e a adequada avaliação de cada caso pode evitar que o paciente seja criado num sexo inadequado, com interferência importante na sua saúde bio-psico-social (DAMIANI *ET AL*, 2001).

Os pacientes são encaminhados ao Ambulatório de Genética ainda quando recém saídos do berçário, o que viabiliza maior e melhor acompanhamento dos mesmos.

Devido ao tempo disponível para realização desse projeto, foi possível a formação de um grupo de estudo composto por 16 pacientes. A faixa etária dos pacientes envolvidos neste projeto apresentou variação desde os primeiros dias de vida até os quinze anos de idade, sendo que a maior parte, 43,8%, estava ainda no primeiro mês de vida e outros 25% encontrava-se com mais de 60 meses de vida. O diagnóstico precoce e o estabelecimento da conduta correta têm sido fatores determinantes na qualidade de vida que a criança terá, tendo em vista a afirmação social e psicológica que apresentará diante de si mesma.

Nos casos de crianças com ambigüidade genital, é fundamental que o diagnóstico seja realizado precocemente, antes que haja uma definição do sexo social e, principalmente, psicológico. O diagnóstico precoce permite a

correta indicação de tratamento, quando necessário, além de minimizar problemas psicológicos e sociais da família em relação à incerteza sobre o sexo do seu filho.

No levantamento estatístico realizado foi diagnosticado um caso de Hermafroditismo Verdadeiro (HV), em que a análise citogenética mostrou a presença de mosaicismo celular: 46,XX/46,XY/45,X. Segundo DAMIANI e colaboradores (2001) apesar da apresentação fenotípica mais para o lado masculino na maior parte dos casos de Hermafroditismo Verdadeiro, deverá ter opção preferencial para o sexo feminino, preservando-se as estruturas femininas eventualmente presentes como útero, trompas, cavidade vaginal e ovários, sendo que em geral, o tecido ovariano no HV é funcional e anatomicamente íntegro, ao passo que o tecido testicular é usualmente disgenético.

O cariótipo típico de um HV é 46,XX mas alguns pacientes (10%) são 46,XY. Uma pequena porcentagem de Hermafroditas Verdadeiros são quimeras, cujos tecidos se compõem de uma mistura de células XX e XY (THOMPSON *ET AL.*, 2002). Como é sugerido na literatura, a paciente foi submetida a uma cirurgia com preferência para o sexo feminino, por possuir útero bem formado, trompas e gônadas bilaterais, sendo que a gônada esquerda corresponde a um ovário normal e a gônada direita a um testículo. Em função da tenra idade, não é possível ainda prever se a paciente poderá ser fértil, mas não está descartada esta possibilidade, conforme relatos literários.

Foi também diagnosticado um caso de Hiperplasia Congênita da Suprarrenal que tem como característica mais comum a deficiência da enzima 21-hidroxilase (90% dos casos), que obstrui a via biossintética normal, causando superprodução dos precursores, que são então, desviados para a via de biossíntese de androgênios, o que acarreta níveis anormalmente altos de androgênios. Meninas com deficiência nessa enzima nascem com genitália ambígua, necessitando muitas vezes de correção e os meninos nascem com órgãos genitais externos normais (MACIEL-GUERRA & GUERRA JÚNIOR, 2002;

THOMPSON *et al.*, 2002). Não foi relatado se esse paciente sofreu alguma intervenção cirúrgica.

A Síndrome de Insensibilidade Androgênica, em que a aparência dos pacientes afetados é feminina, mas o sexo cromossômico é masculino (46,XY) foi diagnosticada em 02 (dois) pacientes. Ambos apresentaram diagnóstico citogenético corroborando a literatura. Os dois pacientes possuíam gônadas palpáveis na região inguinal, sendo que um dos pacientes realizou cirurgia para remoção de “hérnia” inguinal tendo sido confirmado tecido testicular. Não possuíam estruturas internas femininas tais como: útero e ovários, porém a genitália externa era feminina com hipoplasia de pequenos e grandes lábios.

A síndrome de Klinefelter é a causa mais freqüente de hipogonadismo e infertilidade em indivíduos do sexo masculino (MONEY, 1974). As vítimas da síndrome de Klinefelter, pessoas do sexo masculino, têm um cromossomo X adicional (47,XXY), estatura elevada, algum desenvolvimento do tecido mamário e testículos pequenos. A incidência é de 1,18 em 1000 nascimentos. Destes, 80% têm o cariótipo 47,XXY; 10% são mosaicos (46,XY ou 47,XXY) e os restantes têm múltiplos cromossomos X ou Y. Mais de 10% dos homens com infertilidade e 3% daqueles com cancro da mama têm a síndrome de Klinefelter. A presença de um cromossomo X adicional interfere com a produção de testosterona e conseqüentemente essa alteração da produção de testosterona reflete-se no fenótipo (AMORY *ET AL.*, 2000; HARGREAVE, 2000).

Esta síndrome raramente é diagnosticada no recém-nascido face à ausência de sinais específicos. Muitas vezes detecta-se a anormalia apenas quando problemas comportamentais, desenvolvimento pubertal anômalo ou infertilidade aparecem (AMORY *ET AL.*, 2000; HARGREAVE, 2000).

Quando possível, para uma melhor resposta, o tratamento e acompanhamento da síndrome de Klinefelter é normalmente realizado com a administração de testosterona. O tratamento deve ser iniciado pelos 11-12 anos de idade. Está demonstrada a sua eficácia numa percentagem importante de doentes, tanto em aspectos psicossociais como físicos (JAROW, 2000).

O paciente descrito neste trabalho foi diagnosticado com 14 anos de idade através do diagnóstico clínico e citogenético. Após seu diagnóstico

completo o paciente foi encaminhado ao setor de endocrinologia para início do tratamento com testosterona.

Os demais pacientes possuem diversas características que levam a suspeita de ambigüidade genital como gônadas palpáveis, criptorquidia, hipertrofia do clitóris e muitos desses pacientes são criados como meninos, sendo que seu sexo cromossômico é feminino ou vice-versa.

Distúrbios que afetam a determinação e a diferenciação sexuais, tais como ambigüidade genital, em geral, acometem conflitos diversos e envolvem não somente questões médicas complexas e urgentes, como problemas psicológicos extremamente sérios. Embora a sociedade tenha se tornado muito mais esclarecida, os problemas que afetam a diferenciação sexual ainda estão cercados de preconceitos.

Nos casos de crianças com ambigüidade genital, é fundamental que o diagnóstico correto seja realizado antes que haja uma definição do sexo social e, principalmente, psicológico. Portanto, o ideal é a identificação desses casos ainda no período neonatal, devendo-se iniciar nessa época uma pronta investigação. Essa avaliação deverá acontecer o mais precoce possível, evitando algumas possíveis situações de risco de vida para o paciente, como no caso da hiperplasia congênita das supra-renais na forma perdedora de sal, e minimizando os problemas psicológicos e sociais da família em relação à incerteza sobre o sexo do seu filho.

A realização da análise citogenética é essencial e conclusiva, tanto para o diagnóstico como para o prognóstico dos pacientes com determinado distúrbio de diferenciação sexual ou ambigüidade genital.

Sendo assim, além do diagnóstico precoce, outro aspecto importante do tratamento é o aconselhamento genético que essas crianças e seus familiares devem receber. As dúvidas que surgem, tanto para os familiares quanto para a própria criança, devem ser respondidas por uma equipe treinada no tratamento de tais casos. As consultas deverão dispor de tempo adequado para que todos possam expressar claramente suas questões, seus medos, suas inseguranças e o papel da equipe multiprofissional é de apoio e compreensão com o objetivo

de contribuir para a criação de um indivíduo adulto adaptado ao contexto social em que vive e à sua própria condição (DAMIANI *ET AL.*, 2001).

8. CONCLUSÃO

Com base nos resultados experimentais deste estudo, pode-se concluir que:

- O acompanhamento em ambulatório de genética clínica torna-se essencial para a determinação do sexo de criação dessas crianças.
- A decisão das condutas terapêuticas referentes ao tratamento clínico e ao tratamento cirúrgico são decorrentes da determinação sexual apropriada.
- O sexo social deve ser avaliado com muito cuidado, por profissionais qualificados em tal abordagem.
- O diagnóstico precoce, o aconselhamento genético e ainda, o acompanhamento psicológico que essas crianças e seus familiares devem receber, determinam o “sucesso” na criação dessa criança.

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Centro Universitário de Brasília - UniCEUB / Faculdade de Ciências da Saúde

Projeto de Pesquisa: “Determinação do sexo genético em pacientes portadores de ambigüidade genital ou de distúrbios de diferenciação sexual através de cultura temporária de linfócitos periféricos”.

Responsáveis: Prof^a. Dr^a. Fernanda Vinhaes de Lima – (61) 8435 5000

fvlima@brturbo.com

Edna Alves de Santana Esteves – (61) 9976 0700

bio_edna@hotmail.com

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Resolução 340/2004 - CSN)

Eu, _____, estou sendo convidada (o) a participar de minha livre e espontânea vontade, de um projeto de pesquisa que visa determinar o sexo da criança _____, pela qual sou responsável. Declaro ter ouvido e compreendido o presente termo de consentimento que informa:

1. O objetivo deste projeto é definir o sexo da criança evitando problemas psicológicos e sociais na família devido à incerteza quanto ao sexo da criança. Quando se trata de uma criança ainda sem registro civil, recomenda-se a realização desse exame, para posterior registro.
2. A pesquisa requer a coleta de 5mL de sangue do braço da criança com seringa e agulha descartáveis. A coleta de sangue está prevista para uma única vez, podendo ser repetida caso necessário. A realização deste exame não compromete, nem traz riscos à saúde da criança.
3. Fui informada também que a coleta de dados para a pesquisa constará de entrevista e questionário individual, realizada pela responsável do projeto, sendo assegurado sigilo e privacidade através da preservação da identidade e de todos os dados confidenciais envolvidos na pesquisa. E ainda, posso me recusar a responder qualquer pergunta em caso de constrangimento.
4. Caso seja do meu interesse, poderei solicitar a qualquer momento informações sobre os procedimentos para a realização da pesquisa e o resultado do exame, tendo o direito de abandonar a pesquisa a qualquer momento, se assim desejar, bastando para isso comunicar a minha decisão à líder do projeto.
5. Está prevista a publicação dos resultados dessa pesquisa em relatórios parcial e final às instituições envolvidas (LaboCien/Centro Universitário de Brasília e Hospital

Regional da Asa Sul da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal) e publicação em congressos e revistas científicas. Além disso, tenho garantido a não utilização desses dados por qualquer outro projeto de pesquisa.

6. Tenho garantido durante o curso da pesquisa, o aconselhamento genético a ser realizado pela líder desse projeto, após a liberação do resultado do exame. Assim como, acompanhamento psicológico por profissionais da Rede Pública Hospitalar. Caso não seja do meu interesse, não serei obrigado a receber nenhum dos aconselhamentos acima citados.
7. Tenho assegurado que meus dados pessoais e os da criança, pela qual sou responsável, terão manutenção e guarda em arquivos sigilosos mantidos sob responsabilidade da líder do projeto, apenas para análises e interpretações dos mesmos. Protegendo-nos, assim, contra qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva.
8. Estou ciente de que não há previsão de ressarcimento para os participantes desse projeto, pois todos os procedimentos ocorrerão enquanto a criança estiver sendo atendida no hospital.
9. O presente termo de consentimento foi elaborado em duas vias, sendo que uma cópia ficará comigo e a outra com a responsável da pesquisa.

Brasília, _____ de _____ de 2006.

Responsável

Pesquisador

Testemunha

Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal -
(CEP/SES/DF)
SMN Qd. 03, Conjunto A, Bloco 1, Edifício Fepecs, 70.710-907, Brasília-DF (61) 3325-4955,
cepsesdf@saude.df.gov.br

Comitê de Bioética do UniCEUB – Centro Universitário de Brasília
SEPN 707/907, Campus do UniCEUB, 70790-075, Brasília-DF
(61) 3340 1656, cb-uniceub@yahoogrupos.com.br

ANEXO 2 – ANAMNESE

Centro Universitário de Brasília-UniCEUB / Faculdade de Ciências da Saúde

Responsáveis: Prof^a. Dr^a. Fernanda Vinhaes de Lima

Edna Alves de Santana Esteves

Caso nº: _____ Data da coleta: ____/____/____ às: _____

1. Identificação da Criança

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Naturalidade: _____

Cor: [] Negra [] Parda [] Branca Profissão: _____

Grupo Sangüíneo: [] A [] B [] AB [] O Rh: _____

Portador de genitália ambígua _____

2. Dados da Mãe

Nome: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Telefones: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Naturalidade: _____

Cor: [] Negra [] Parda [] Branca Profissão: _____

Grupo Sangüíneo: [] A [] B [] AB [] O Rh: _____

3. Antecedentes Maternos

Tabagismo: [] Sim [] Não Nº Cigarros: _____ (dia) Duração: _____

Parou de fumar há: _____ Fumou por quanto tempo? _____

Etilismo: [] Sim [] Não

Quantidade: _____ (mL/dia) Freqüência: _____ Período: _____ (anos)

Faz uso de alguma droga? [] Sim [] Não

Se sim, Qual? _____ Por quanto tempo? _____

Idade da menarca? _____

Fazia ou faz uso de anticoncepcional? [] Sim [] Não

Se sim, Qual? _____ Por quanto tempo? _____

Já sofreu algum aborto espontâneo? Sim Não
Quantos? 1 2 3 > 3 (____) Consecutivos? Sim Não
Em qual fase da gestação? 1º Trimestre 2º Trimestre 3º Trimestre

Tem filhos? Sim Não Quantos? _____
Todos nasceram vivos? Sim Não Quantos? _____
Alguma filha com baixa estatura? Sim Não
Se sim, qual a sua altura? _____ e sua idade? _____
Algum filho com atraso no desenvolvimento sexual? Sim Não
Se sim, descreva-o: _____
Qualquer outra característica que lhe chama a atenção? _____

Você sofre de alguma doença? Sim Não
Qual? _____ Por quanto tempo? _____

Você e seu marido são parentes? Sim Não
Se sim, qual grau de consangüinidade? _____

4. Dados sobre a gestação da criança portadora de genitália ambígua

Como você descobriu que estava grávida?
 Consulta no ginecologista de rotina Atraso menstrual
 Exame de farmácia Exame de sangue
 Sentiu o corpo diferente Seios doloridos
 Ecografia Outros _____

Quando descobriu, estava com quantas semanas de gestação? _____
Essa gravidez foi planejada? Sim Não
Tentou abortá-la? Sim Não
Se sim, como? _____ Com quantas semanas? _____

Fez uso de alguma medicação? Sim Não
Se sim, qual? _____ Por quanto tempo? _____
 Anticoncepcional Anabolizantes Outros _____

Durante essa gestação você teve alguma virose? Sim Não
Se sim, Qual?
 Sarampo Caxumba Rubéola
 Catapora Citomegalovirose Hepatite _____
Em qual fase da gestação? 1º Trimestre 2º Trimestre 3º Trimestre

5. Dados do Cônjuge

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Naturalidade: _____

Cor: Negra Parda Branca Profissão: _____

Grupo Sangüíneo: A B AB O Rh: _____

Tabagismo: Sim Não Nº Cigarros: _____ (dia) Duração: _____

Parou de fumar há: _____ Fumou por quanto tempo: _____

Etilismo: Sim Não

Quantidade: _____ (mL/dia) Freqüência: _____ Período: _____ (anos)

Faz uso de alguma droga? Sim Não

Se sim, Qual? _____ Por quanto tempo? _____

Tem filhos de outro relacionamento? Sim Não Quantos? _____

Algum filho com problemas de desenvolvimento? Sim Não

Se sim, descreva-o: _____

Faz uso de alguma medicação (anabolizantes)? Sim Não

Se sim, qual? _____ Por quanto tempo? _____

Sofreu alguma dessas viroses recentemente? Sim Não

Se sim, Qual? Há quanto tempo? _____

Sarampo

Caxumba

Rubéola

Catapora

Citomegalovirose

Hepatite _____

Dados complementares:

ANEXO 3 – RESOLUÇÕES Nº 196/96 E Nº 340/04 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

RESOLUÇÃO Nº 196 DE 10 DE OUTUBRO DE 1996

O Plenário do Conselho Nacional de Saúde em sua Quinquagésima Nona Reunião Ordinária, realizada nos dias 09 e 10 de outubro de 1996, no uso de suas competências regimentais e atribuições conferidas pela Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, e pela Lei nº 8.142, de 28 de dezembro de 1990, **RESOLVE:**

Aprovar as seguintes diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos:

I - PREÂMBULO

A presente Resolução fundamenta-se nos principais documentos internacionais que emanaram declarações e diretrizes sobre pesquisas que envolvem seres humanos: o Código de Nuremberg (1947), a Declaração dos Direitos do Homem (1948), a Declaração de Helsinque (1964 e suas versões posteriores de 1975, 1983 e 1989), o Acordo Internacional sobre Direitos Civis e Políticos (ONU, 1966, aprovado pelo Congresso Nacional Brasileiro em 1992), as Propostas de Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (CIOMS/OMS 1982 e 1993) e as Diretrizes Internacionais para Revisão Ética de Estudos Epidemiológicos (CIOMS, 1991). Cumpre as disposições da Constituição da República Federativa do Brasil de 1988 e da legislação brasileira correlata: Código de Direitos do Consumidor, Código Civil e Código Penal, Estatuto da Criança e do Adolescente, Lei Orgânica da Saúde 8.080, de 19/09/90 (dispõe sobre as condições de atenção à saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes), Lei 8.142, de 28/12/90 (participação da comunidade na gestão do Sistema Único de Saúde), Decreto 99.438, de 07/08/90 (organização e atribuições do Conselho Nacional de Saúde), Decreto 98.830, de 15/01/90 (coleta por estrangeiros de dados e materiais científicos no Brasil), Lei 8.489, de 18/11/92, e Decreto 879, de 22/07/93 (dispõem sobre retirada de tecidos, órgãos e outras partes do corpo humano com fins humanitários e científicos), Lei 8.501, de 30/11/92 (utilização de cadáver), Lei 8.974, de 05/01/95 (uso das técnicas de engenharia genética e liberação no meio ambiente de organismos geneticamente modificados), Lei 9.279, de 14/05/96 (regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial), e outras.

Esta Resolução incorpora, sob a ótica do indivíduo e das coletividades, os quatro referenciais básicos da bioética: autonomia, não maleficência, beneficência e justiça, entre outros, e visa assegurar os direitos e deveres que dizem respeito à comunidade científica, aos sujeitos da pesquisa e ao Estado.

O caráter contextual das considerações aqui desenvolvidas implica em revisões periódicas desta Resolução, conforme necessidades nas áreas tecnocientífica e ética.

Ressalta-se, ainda, que cada área temática de investigação e cada modalidade de pesquisa, além de respeitar os princípios emanados deste texto, deve cumprir com as exigências setoriais e regulamentações específicas.

II - TERMOS E DEFINIÇÕES

A presente Resolução, adota no seu âmbito as seguintes definições:

II.1 - Pesquisa - classe de atividades cujo objetivo é desenvolver ou contribuir para o conhecimento generalizável. O conhecimento generalizável consiste em teorias, relações ou princípios ou no acúmulo de informações sobre as quais estão baseados, que possam ser corroborados por métodos científicos aceitos de observação e inferência.

II.2 - Pesquisa envolvendo seres humanos - pesquisa que, individual ou coletivamente, envolva o ser humano, de forma direta ou indireta, em sua totalidade ou partes dele, incluindo o manejo de informações ou materiais.

II.3 - Protocolo de Pesquisa - Documento contemplando a descrição da pesquisa em seus aspectos fundamentais, informações relativas ao sujeito da pesquisa, à qualificação dos pesquisadores e à todas as instâncias responsáveis.

II.4 - Pesquisador responsável - pessoa responsável pela coordenação e realização da pesquisa e pela integridade e bem-estar dos sujeitos da pesquisa.

II.5 - Instituição de pesquisa - organização, pública ou privada, legitimamente constituída e habilitada na qual são realizadas investigações científicas.

II.6 - Promotor - indivíduo ou instituição, responsável pela promoção da pesquisa.

II.7 - Patrocinador - pessoa física ou jurídica que apoia financeiramente a pesquisa.

II.8 - Risco da pesquisa - possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer fase de uma pesquisa e dela decorrente.

II.9 - Dano associado ou decorrente da pesquisa - agravo imediato ou tardio, ao indivíduo ou à coletividade, com nexos causal comprovado, direto ou indireto, decorrente do estudo científico.

II.10 - Sujeito da pesquisa - é o(a) participante pesquisado(a), individual ou coletivamente, de caráter voluntário, vedada qualquer forma de remuneração.

II.11 - Consentimento livre e esclarecido - anuência do sujeito da pesquisa e/ou de seu representante legal, livre de vícios (simulação, fraude ou erro), dependência, subordinação ou intimidação, após explicação completa e pormenorizada sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, formulada em um termo de consentimento, autorizando sua participação voluntária na pesquisa.

II.12 - Indenização - cobertura material, em reparação a dano imediato ou tardio, causado pela pesquisa ao ser humano a ela submetida.

II.13 - Ressarcimento - cobertura, em compensação, exclusiva de despesas decorrentes da participação do sujeito na pesquisa.

II.14 - Comitês de Ética em Pesquisa-CEP - colegiados interdisciplinares e independentes, com "munus público", de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criados para defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

II.15 - Vulnerabilidade - refere-se a estado de pessoas ou grupos que, por quaisquer razões ou motivos, tenham a sua capacidade de autodeterminação reduzida, sobretudo no que se refere ao consentimento livre e esclarecido.

II.16 - Incapacidade - Refere-se ao possível sujeito da pesquisa que não tenha capacidade civil para dar o seu consentimento livre e esclarecido, devendo ser assistido ou representado, de acordo com a legislação brasileira vigente.

III - ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

As pesquisas envolvendo seres humanos devem atender às exigências éticas e científicas fundamentais.

III.1 - A ética da pesquisa implica em:

a) consentimento livre e esclarecido dos indivíduos-alvo e a proteção a grupos vulneráveis e aos legalmente incapazes (**autonomia**). Neste sentido, a pesquisa envolvendo seres humanos deverá sempre tratá-los em sua dignidade, respeitá-los em sua autonomia e defendê-los em sua vulnerabilidade;

b) ponderação entre riscos e benefícios, tanto atuais como potenciais, individuais ou coletivos (**beneficência**), comprometendo-se com o máximo de benefícios e o mínimo de danos e riscos;

c) garantia de que danos previsíveis serão evitados (**não maleficência**);

d) relevância social da pesquisa com vantagens significativas para os sujeitos da pesquisa e minimização do ônus para os sujeitos vulneráveis, o que garante a igual consideração dos interesses envolvidos, não perdendo o sentido de sua destinação sócio-humanitária (**justiça e equidade**).

III.2- Todo procedimento de qualquer natureza envolvendo o ser humano, cuja aceitação não esteja ainda consagrada na literatura científica, será considerado como pesquisa e, portanto, deverá obedecer às diretrizes da presente Resolução. Os procedimentos referidos incluem entre outros, os de natureza instrumental, ambiental, nutricional, educacional, sociológica, econômica, física, psíquica ou biológica, sejam eles farmacológicos, clínicos ou cirúrgicos e de finalidade preventiva, diagnóstica ou terapêutica.

III.3 - A pesquisa em qualquer área do conhecimento, envolvendo seres humanos deverá observar as seguintes exigências:

a) ser adequada aos princípios científicos que a justifiquem e com possibilidades concretas de responder a incertezas;

b) estar fundamentada na experimentação prévia realizada em laboratórios, animais ou em outros fatos científicos;

c) ser realizada somente quando o conhecimento que se pretende obter não possa ser obtido por outro meio;

d) prevalecer sempre as probabilidades dos benefícios esperados sobre os riscos previsíveis;

e) obedecer a metodologia adequada. Se houver necessidade de distribuição aleatória dos sujeitos da pesquisa em grupos experimentais e de controle, assegurar que, *a priori*, não seja possível estabelecer as vantagens de um procedimento sobre outro através de revisão de literatura, métodos observacionais ou métodos que não envolvam seres humanos;

f) ter plenamente justificada, quando for o caso, a utilização de placebo, em termos de não maleficência e de necessidade metodológica;

g) contar com o consentimento livre e esclarecido do sujeito da pesquisa e/ou seu representante legal;

h) contar com os recursos humanos e materiais necessários que garantam o bem-estar do sujeito da pesquisa, devendo ainda haver adequação entre a competência do pesquisador e o projeto proposto;

i) prever procedimentos que assegurem a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de auto-estima, de prestígio e/ou econômico - financeiro;

j) ser desenvolvida preferencialmente em indivíduos com autonomia plena. Indivíduos ou grupos vulneráveis não devem ser sujeitos de pesquisa quando a informação desejada possa ser obtida através de sujeitos com plena autonomia, a menos que a investigação possa trazer benefícios diretos aos vulneráveis. Nestes casos, o direito dos indivíduos ou grupos que queiram participar da pesquisa deve ser assegurado, desde que seja garantida a proteção à sua vulnerabilidade e incapacidade legalmente definida;

l) respeitar sempre os valores culturais, sociais, morais, religiosos e éticos, bem como os hábitos e costumes quando as pesquisas envolverem comunidades;

m) garantir que as pesquisas em comunidades, sempre que possível, traduzir-se-ão em benefícios cujos efeitos continuem a se fazer sentir após sua conclusão. O projeto deve analisar as necessidades de cada um dos membros da comunidade e analisar as diferenças presentes entre eles, explicitando como será assegurado o respeito às mesmas;

n) garantir o retorno dos benefícios obtidos através das pesquisas para as pessoas e as comunidades onde as mesmas forem realizadas. Quando, no interesse da comunidade, houver benefício real em incentivar ou estimular mudanças de costumes ou comportamentos, o protocolo de pesquisa deve incluir, sempre que possível, disposições para comunicar tal benefício às pessoas e/ou comunidades;

o) comunicar às autoridades sanitárias os resultados da pesquisa, sempre que os mesmos puderem contribuir para a melhoria das condições de saúde da coletividade, preservando, porém, a imagem e assegurando que os sujeitos da pesquisa não sejam estigmatizados ou percam a auto-estima;

p) assegurar aos sujeitos da pesquisa os benefícios resultantes do projeto, seja em termos de retorno social, acesso aos procedimentos, produtos ou agentes da pesquisa;

q) assegurar aos sujeitos da pesquisa as condições de acompanhamento, tratamento ou de orientação, conforme o caso, nas pesquisas de rastreamento; demonstrar a preponderância de benefícios sobre riscos e custos;

r) assegurar a inexistência de conflito de interesses entre o pesquisador e os sujeitos da pesquisa ou patrocinador do projeto;

s) comprovar, nas pesquisas conduzidas do exterior ou com cooperação estrangeira, os compromissos e as vantagens, para os sujeitos das pesquisas e para o Brasil, decorrentes de sua realização. Nestes casos deve ser identificado o pesquisador e a instituição nacionais co-responsáveis pela pesquisa. O protocolo deverá observar as exigências da Declaração de Helsinque e incluir documento de aprovação, no país de origem, entre os apresentados para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição brasileira, que exigirá o cumprimento de seus próprios referenciais éticos. Os estudos patrocinados do exterior também devem responder às necessidades de treinamento de pessoal no Brasil, para que o país possa desenvolver projetos similares de forma independente;

t) utilizar o material biológico e os dados obtidos na pesquisa exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo;

u) levar em conta, nas pesquisas realizadas em mulheres em idade fértil ou em mulheres grávidas, a avaliação de riscos e benefícios e as eventuais interferências sobre a fertilidade, a gravidez, o embrião ou o feto, o trabalho de parto, o puerpério, a lactação e o recém-nascido;

v) considerar que as pesquisas em mulheres grávidas devem, ser precedidas de pesquisas em mulheres fora do período gestacional, exceto quando a gravidez for o objetivo fundamental da pesquisa;

x) propiciar, nos estudos multicêntricos, a participação dos pesquisadores que desenvolverão a pesquisa na elaboração do delineamento geral do projeto; e

z) descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que a aprovou.

IV - CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa.

IV.1 - Exige-se que o esclarecimento dos sujeitos se faça em linguagem acessível e que inclua necessariamente os seguintes aspectos:

a) a justificativa, os objetivos e os procedimentos que serão utilizados na pesquisa;

b) os desconfortos e riscos possíveis e os benefícios esperados;

c) os métodos alternativos existentes;

d) a forma de acompanhamento e assistência, assim como seus responsáveis;

e) a garantia de esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia, informando a possibilidade de inclusão em grupo controle ou placebo;

f) a liberdade do sujeito se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado;

g) a garantia do sigilo que assegure a privacidade dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa;

h) as formas de ressarcimento das despesas decorrentes da participação na pesquisa; e

i) as formas de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

IV.2 - O termo de consentimento livre e esclarecido obedecerá aos seguintes requisitos:

a) ser elaborado pelo pesquisador responsável, expressando o cumprimento de cada uma das exigências acima;

b) ser aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa que referenda a investigação;

c) ser assinado ou identificado por impressão dactiloscópica, por todos e cada um dos sujeitos da pesquisa ou por seus representantes legais; e

d) ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador.

IV.3 - Nos casos em que haja qualquer restrição à liberdade ou ao esclarecimento necessários para o adequado consentimento, deve-se ainda observar:

a) em pesquisas envolvendo crianças e adolescentes, portadores de perturbação ou doença mental e sujeitos em situação de substancial diminuição em suas capacidades de consentimento, deverá haver justificação clara da escolha dos sujeitos da pesquisa, especificada no protocolo, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e cumprir as exigências do consentimento livre e esclarecido, através dos representantes legais dos referidos sujeitos, sem suspensão do direito de informação do indivíduo, no limite de sua capacidade;

b) a liberdade do consentimento deverá ser particularmente garantida para aqueles sujeitos que, embora adultos e capazes, estejam expostos a condicionamentos específicos ou à influência de autoridade, especialmente estudantes, militares, empregados, presidiários, internos em centros de readaptação, casas-abrigo, asilos, associações religiosas e semelhantes, assegurando-lhes a inteira liberdade de participar ou não da pesquisa, sem quaisquer represálias;

c) nos casos em que seja impossível registrar o consentimento livre e esclarecido, tal fato deve ser devidamente documentado, com explicação das causas da impossibilidade, e parecer do Comitê de Ética em Pesquisa;

d) as pesquisas em pessoas com o diagnóstico de morte encefálica só podem ser realizadas desde que estejam preenchidas as seguintes condições:

- documento comprobatório da morte encefálica (atestado de óbito);
- consentimento explícito dos familiares e/ou do responsável legal, ou manifestação prévia da vontade da pessoa;
- respeito total à dignidade do ser humano sem mutilação ou violação do corpo;
- sem ônus econômico financeiro adicional à família;
- sem prejuízo para outros pacientes aguardando internação ou tratamento;
- possibilidade de obter conhecimento científico relevante, novo e que não possa ser obtido de outra maneira;

e) em comunidades culturalmente diferenciadas, inclusive indígenas, deve-se contar com a anuência antecipada da comunidade através dos seus próprios líderes, não se dispensando, porém, esforços no sentido de obtenção do consentimento individual;

f) quando o mérito da pesquisa depender de alguma restrição de informações aos sujeitos, tal fato deve ser devidamente explicitado e justificado pelo pesquisador e submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa. Os dados obtidos a partir dos sujeitos da pesquisa não poderão ser usados para outros fins que os não previstos no protocolo e/ou no consentimento.

V - RISCOS E BENEFÍCIOS

Considera-se que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco. O dano eventual poderá ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a coletividade.

V.1 - Não obstante os riscos potenciais, as pesquisas envolvendo seres humanos serão admissíveis quando:

a) oferecerem elevada possibilidade de gerar conhecimento para entender, prevenir ou aliviar um problema que afete o bem-estar dos sujeitos da pesquisa e de outros indivíduos;

b) o risco se justifique pela importância do benefício esperado;

c) o benefício seja maior, ou no mínimo igual, a outras alternativas já estabelecidas para a prevenção, o diagnóstico e o tratamento.

V.2 - As pesquisas sem benefício direto ao indivíduo, devem prever condições de serem bem suportadas pelos sujeitos da pesquisa, considerando sua situação física, psicológica, social e educacional.

V.3 - O pesquisador responsável é obrigado a suspender a pesquisa imediatamente ao perceber algum risco ou dano à saúde do sujeito participante da pesquisa, conseqüente à mesma, não previsto no termo de consentimento. Do mesmo modo, tão logo constatada a superioridade de um método em estudo sobre outro, o projeto deverá ser suspenso, oferecendo-se a todos os sujeitos os benefícios do melhor regime.

V.4 - O Comitê de Ética em Pesquisa da instituição deverá ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo.

V.5 - O pesquisador, o patrocinador e a instituição devem assumir a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos.

V.6 - Os sujeitos da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, têm direito à indenização.

V.7 - Jamais poderá ser exigido do sujeito da pesquisa, sob qualquer argumento, renúncia ao direito à indenização por dano. O formulário do consentimento livre e esclarecido não deve conter nenhuma ressalva que afaste essa responsabilidade ou que implique ao sujeito da pesquisa abrir mão de seus direitos legais, incluindo o direito de procurar obter indenização por danos eventuais.

VI - PROTOCOLO DE PESQUISA

O protocolo a ser submetido à revisão ética somente poderá ser apreciado se estiver instruído com os seguintes documentos, em português:

VI.1 - folha de rosto: título do projeto, nome, número da carteira de identidade, CPF, telefone e endereço para correspondência do pesquisador responsável e do patrocinador, nome e assinaturas dos dirigentes da instituição e/ou organização;

VI.2 - descrição da pesquisa, compreendendo os seguintes itens:

a) descrição dos propósitos e das hipóteses a serem testadas;

b) antecedentes científicos e dados que justifiquem a pesquisa. Se o propósito for testar um novo produto ou dispositivo para a saúde, de procedência estrangeira ou não, deverá ser indicada a situação atual de registro junto a agências regulatórias do país de origem;

c) descrição detalhada e ordenada do projeto de pesquisa (material e métodos, casuística, resultados esperados e bibliografia);

d) análise crítica de riscos e benefícios;

e) duração total da pesquisa, a partir da aprovação;

f) explicitação das responsabilidades do pesquisador, da instituição, do promotor e do patrocinador;

g) explicitação de critérios para suspender ou encerrar a pesquisa;

h) local da pesquisa: detalhar as instalações dos serviços, centros, comunidades e instituições nas quais se processarão as várias etapas da pesquisa;

i) demonstrativo da existência de infra-estrutura necessária ao desenvolvimento da pesquisa e para atender eventuais problemas dela resultantes, com a concordância documentada da instituição;

j) orçamento financeiro detalhado da pesquisa: recursos, fontes e destinação, bem como a forma e o valor da remuneração do pesquisador;

l) explicitação de acordo preexistente quanto à propriedade das informações geradas, demonstrando a inexistência de qualquer cláusula restritiva quanto à divulgação pública dos resultados, a menos que se trate de caso de obtenção de patenteamento; neste caso, os resultados devem se tornar públicos, tão logo se encerre a etapa de patenteamento;

m) declaração de que os resultados da pesquisa serão tornados públicos, sejam eles favoráveis ou não; e

n) declaração sobre o uso e destinação do material e/ou dados coletados.

VI.3 - informações relativas ao sujeito da pesquisa:

a) descrever as características da população a estudar: tamanho, faixa etária, sexo, cor (classificação do IBGE), estado geral de saúde, classes e grupos sociais, etc. Expor as razões para a utilização de grupos vulneráveis;

b) descrever os métodos que afetem diretamente os sujeitos da pesquisa;

c) identificar as fontes de material de pesquisa, tais como espécimens, registros e dados a serem obtidos de seres humanos. Indicar se esse material será obtido especificamente para os propósitos da pesquisa ou se será usado para outros fins;

d) descrever os planos para o recrutamento de indivíduos e os procedimentos a serem seguidos. Fornecer critérios de inclusão e exclusão;

e) apresentar o formulário ou termo de consentimento, específico para a pesquisa, para a apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, incluindo informações sobre as circunstâncias sob as quais o consentimento será obtido, quem irá tratar de obtê-lo e a natureza da informação a ser fornecida aos sujeitos da pesquisa;

f) descrever qualquer risco, avaliando sua possibilidade e gravidade;

g) descrever as medidas para proteção ou minimização de qualquer risco eventual. Quando apropriado, descrever as medidas para assegurar os necessários cuidados à saúde, no caso de danos aos indivíduos. Descrever também os procedimentos para monitoramento da coleta de dados para prover a segurança dos indivíduos, incluindo as medidas de proteção à confidencialidade; e

h) apresentar previsão de ressarcimento de gastos aos sujeitos da pesquisa. A importância referente não poderá ser de tal monta que possa interferir na autonomia da decisão do indivíduo ou responsável de participar ou não da pesquisa.

VI.4 - qualificação dos pesquisadores: "Curriculum vitae" do pesquisador responsável e dos demais participantes.

VI.5 - termo de compromisso do pesquisador responsável e da instituição de cumprir os termos desta Resolução.

VII - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP

Toda pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser submetida à apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa.

VII.1 - As instituições nas quais se realizem pesquisas envolvendo seres humanos deverão constituir um ou mais de um Comitê de Ética em Pesquisa- CEP, conforme suas necessidades.

VII.2 - Na impossibilidade de se constituir CEP, a instituição ou o pesquisador responsável deverá submeter o projeto à apreciação do CEP de outra instituição, preferencialmente dentre os indicados pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/MS).

VII.3 - Organização - A organização e criação do CEP será da competência da instituição, respeitadas as normas desta Resolução, assim como o provimento de condições adequadas para o seu funcionamento.

VII.4 - Composição - O CEP deverá ser constituído por colegiado com número não inferior a 7 (sete) membros. Sua constituição deverá incluir a participação de profissionais da área de saúde, das ciências exatas, sociais e humanas, incluindo, por exemplo, juristas, teólogos, sociólogos, filósofos, bioeticistas e, pelo menos, um membro da sociedade representando os usuários da instituição. Poderá variar na sua composição, dependendo das especificidades da instituição e das linhas de pesquisa a serem analisadas.

VII.5 - Terá sempre caráter multi e transdisciplinar, não devendo haver mais que metade de seus membros pertencentes à mesma categoria profissional, participando pessoas dos dois sexos. Poderá ainda contar com consultores "ad hoc", pessoas pertencentes ou não à instituição, com a finalidade de fornecer subsídios técnicos.

VII.6 - No caso de pesquisas em grupos vulneráveis, comunidades e coletividades, deverá ser convidado um representante, como membro "ad hoc" do CEP, para participar da análise do projeto específico.

VII.7 - Nas pesquisas em população indígena deverá participar um consultor familiarizado com os costumes e tradições da comunidade.

VII.8 - Os membros do CEP deverão se isentar de tomada de decisão, quando diretamente envolvidos na pesquisa em análise.

VII.9 - Mandato e escolha dos membros - A composição de cada CEP deverá ser definida a critério da instituição, sendo pelo menos metade dos membros com experiência em pesquisa, eleitos pelos seus pares. A escolha da coordenação de cada Comitê deverá ser feita pelos membros que compõem o colegiado, durante a primeira reunião de trabalho. Será de três anos a duração do mandato, sendo permitida recondução.

VII.10 - Remuneração - Os membros do CEP não poderão ser remunerados no desempenho desta tarefa, sendo recomendável, porém, que sejam dispensados nos horários de trabalho do Comitê das outras obrigações nas instituições às quais prestam serviço, podendo receber ressarcimento de despesas efetuadas com transporte, hospedagem e alimentação.

VII.11 - Arquivo - O CEP deverá manter em arquivo o projeto, o protocolo e os relatórios correspondentes, por 5 (cinco) anos após o encerramento do estudo.

VII.12 - Liberdade de trabalho - Os membros dos CEPs deverão ter total independência na tomada das decisões no exercício das suas funções, mantendo sob caráter confidencial as informações recebidas. Deste modo, não podem sofrer qualquer tipo de pressão por parte de superiores hierárquicos ou pelos interessados em determinada pesquisa, devem isentar-se de envolvimento financeiro e não devem estar submetidos a conflito de interesse.

VII.13 - Atribuições do CEP:

a) revisar todos os protocolos de pesquisa envolvendo seres humanos, inclusive os multicêntricos, cabendo-lhe a responsabilidade primária pelas decisões sobre a ética da pesquisa a ser desenvolvida na instituição, de modo a garantir e resguardar a integridade e os direitos dos voluntários participantes nas referidas pesquisas;

b) emitir parecer consubstanciado por escrito, no prazo máximo de 30 (trinta) dias, identificando com clareza o ensaio, documentos estudados e data de revisão. A revisão de cada protocolo culminará com seu enquadramento em uma das seguintes categorias:

- aprovado;
- com pendência: quando o Comitê considera o protocolo como aceitável, porém identifica determinados problemas no protocolo, no formulário do consentimento ou em ambos, e recomenda uma revisão específica ou solicita uma modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em 60 (sessenta) dias pelos pesquisadores;
- retirado: quando, transcorrido o prazo, o protocolo permanece pendente;
- não aprovado; e
- aprovado e encaminhado, com o devido parecer, para apreciação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP/MS, nos casos previstos no capítulo VIII, item 4.c.

c) manter a guarda confidencial de todos os dados obtidos na execução de sua tarefa e arquivamento do protocolo completo, que ficará à disposição das autoridades sanitárias;

d) acompanhar o desenvolvimento dos projetos através de relatórios anuais dos pesquisadores;

e) desempenhar papel consultivo e educativo, fomentando a reflexão em torno da ética na ciência;

f) receber dos sujeitos da pesquisa ou de qualquer outra parte denúncias de abusos ou notificação sobre fatos adversos que possam alterar o curso normal do estudo, decidindo pela continuidade, modificação ou suspensão da pesquisa, devendo, se necessário, adequar o termo de consentimento. Considera-se como anti-ética a pesquisa descontinuada sem justificativa aceita pelo CEP que a aprovou;

g) requerer instauração de sindicância à direção da instituição em caso de denúncias de irregularidades de natureza ética nas pesquisas e, em havendo comprovação, comunicar à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP/MS e, no que couber, a outras instâncias; e

h) manter comunicação regular e permanente com a CONEP/MS.

VII.14 - Atuação do CEP:

a) A revisão ética de toda e qualquer proposta de pesquisa envolvendo seres humanos não poderá ser dissociada da sua análise científica. Pesquisa que não se faça acompanhar do respectivo protocolo não deve ser analisada pelo Comitê.

b) Cada CEP deverá elaborar suas normas de funcionamento, contendo metodologia de trabalho, a exemplo de: elaboração das atas; planejamento anual de suas atividades; periodicidade de reuniões; número mínimo de presentes para início das reuniões; prazos para emissão de pareceres; critérios para solicitação de consultas de *experts* na área em que se desejam informações técnicas; modelo de tomada de decisão, etc.

VIII - COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA (CONEP/MS)

A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP/MS é uma instância colegiada, de natureza consultiva, deliberativa, normativa, educativa, independente, vinculada ao Conselho Nacional de Saúde.

O Ministério da Saúde adotará as medidas necessárias para o funcionamento pleno da Comissão e de sua Secretaria Executiva.

VIII.1 - Composição: A CONEP terá composição multi e transdisciplinar, com pessoas de ambos os sexos e deverá ser composta por 13 (treze) membros titulares e seus respectivos suplentes, sendo 05 (cinco) deles personalidades destacadas no campo da ética na pesquisa e na saúde e 08 (oito) personalidades com destacada atuação nos campos teológico, jurídico e outros, assegurando-se que pelo menos um seja da área de gestão da saúde. Os membros serão selecionados, a partir de listas indicativas elaboradas pelas instituições que possuem CEP registrados na CONEP, sendo que 07 (sete) serão escolhidos pelo Conselho Nacional de Saúde e 06 (seis) serão definidos por sorteio. Poderá contar também com consultores e membros "ad hoc", assegurada a representação dos usuários.

VIII.2 - Cada CEP poderá indicar duas personalidades.

VIII.3 - O mandato dos membros da CONEP será de quatro anos com renovação alternada a cada dois anos, de sete ou seis de seus membros.

VIII.4 - Atribuições da CONEP - Compete à CONEP o exame dos aspectos éticos da pesquisa envolvendo seres humanos, bem como a adequação e atualização das normas atinentes. A CONEP consultará a sociedade sempre que julgar necessário, cabendo-lhe, entre outras, as seguintes atribuições:

a) estimular a criação de CEPs institucionais e de outras instâncias;
b) registrar os CEPs institucionais e de outras instâncias;
c) aprovar, no prazo de 60 dias, e acompanhar os protocolos de pesquisa em áreas temáticas especiais tais como:

1- genética humana;
2- reprodução humana;
3- fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações;

4- equipamentos, insumos e dispositivos para a saúde novos, ou não registrados no país;

5- novos procedimentos ainda não consagrados na literatura;

6- populações indígenas;

7- projetos que envolvam aspectos de biossegurança;

8- pesquisas coordenadas do exterior ou com participação estrangeira e pesquisas que envolvam remessa de material biológico para o exterior; e

9- projetos que, a critério do CEP, devidamente justificado, sejam julgados merecedores de análise pela CONEP;

d) prover normas específicas no campo da ética em pesquisa, inclusive nas áreas temáticas especiais, bem como recomendações para aplicação das mesmas;

e) funcionar como instância final de recursos, a partir de informações fornecidas sistematicamente, em caráter *ex-officio* ou a partir de denúncias ou de solicitação de partes interessadas, devendo manifestar-se em um prazo não superior a 60 (sessenta) dias;

f) rever responsabilidades, proibir ou interromper pesquisas, definitiva ou temporariamente, podendo requisitar protocolos para revisão ética inclusive, os já aprovados pelo CEP;

g) constituir um sistema de informação e acompanhamento dos aspectos éticos das pesquisas envolvendo seres humanos em todo o território nacional, mantendo atualizados os bancos de dados;

h) informar e assessorar o MS, o CNS e outras instâncias do SUS, bem como do governo e da sociedade, sobre questões éticas relativas à pesquisa em seres humanos;

i) divulgar esta e outras normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos;

j) a CONEP juntamente com outros setores do Ministério da Saúde, estabelecerá normas e critérios para o credenciamento de Centros de Pesquisa. Este credenciamento deverá ser proposto pelos setores do Ministério da Saúde, de acordo com suas necessidades, e aprovado pelo Conselho Nacional de Saúde; e

l) estabelecer suas próprias normas de funcionamento.

VIII.5 - A CONEP submeterá ao CNS para sua deliberação:

a) propostas de normas gerais a serem aplicadas às pesquisas envolvendo seres humanos, inclusive modificações desta norma;

b) plano de trabalho anual;

c) relatório anual de suas atividades, incluindo sumário dos CEP estabelecidos e dos projetos analisados.

IX - OPERACIONALIZAÇÃO

IX.1 - Todo e qualquer projeto de pesquisa envolvendo seres humanos deverá obedecer às recomendações desta Resolução e dos documentos endossados em seu preâmbulo. A responsabilidade do pesquisador é indelegável, indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

IX.2 - Ao pesquisador cabe:

a) apresentar o protocolo, devidamente instruído ao CEP, aguardando o pronunciamento deste, antes de iniciar a pesquisa;

b) desenvolver o projeto conforme delineado;

c) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;

d) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento;

e) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP;

f) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto;

g) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

IX.3 - O Comitê de Ética em Pesquisa institucional deverá estar registrado junto à CONEP/MS.

IX.4 - Uma vez aprovado o projeto, o CEP passa a ser co-responsável no que se refere aos aspectos éticos da pesquisa.

IX.5 - Consideram-se autorizados para execução, os projetos aprovados pelo CEP, exceto os que se enquadrarem nas áreas temáticas especiais, os quais, após aprovação pelo CEP institucional deverão ser enviados à CONEP/MS, que dará o devido encaminhamento.

IX.6 - Pesquisas com novos medicamentos, vacinas, testes diagnósticos, equipamentos e dispositivos para a saúde deverão ser encaminhados do CEP à CONEP/MS e desta, após parecer, à Secretaria de Vigilância Sanitária.

IX.7 - As agências de fomento à pesquisa e o corpo editorial das revistas científicas deverão exigir documentação comprobatória de aprovação do projeto pelo CEP e/ou CONEP, quando for o caso.

IX.8 - Os CEP institucionais deverão encaminhar trimestralmente à CONEP/MS a relação dos projetos de pesquisa analisados, aprovados e concluídos, bem como dos projetos em andamento e, imediatamente, aqueles suspensos.

X. DISPOSIÇÕES TRANSITÓRIAS

X.1 - O Grupo Executivo de Trabalho-GET, constituído através da Resolução CNS 170/95, assumirá as atribuições da CONEP até a sua constituição, responsabilizando-se por:

- a) tomar as medidas necessárias ao processo de criação da CONEP/MS;
- b) estabelecer normas para registro dos CEP institucionais;

X.2 - O GET terá 180 dias para finalizar as suas tarefas.

X.3 - Os CEP das instituições devem proceder, no prazo de 90 (noventa) dias, ao levantamento e análise, se for o caso, dos projetos de pesquisa em seres humanos já em andamento, devendo encaminhar à CONEP/MS, a relação dos mesmos.

X4 - Fica revogada a Resolução 01/88.

ADIB D. JATENE

Presidente do Conselho Nacional de Saúde

Homologo a Resolução CNS nº 196, de 10 de outubro de 1996, nos termos do Decreto de Delegação de Competência de 12 de novembro de 1991.

ADIB D. JATENE

Ministro de Estado da Saúde

RESOLUÇÃO Nº 340, DE 8 DE JULHO DE 2004.

O Plenário do Conselho Nacional de Saúde, em sua Centésima Quadragésima Quarta Reunião Ordinária, realizada nos dias 7 e 8 de julho de 2004, no uso de suas competências regimentais e atribuições conferidas pela Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, e pela Lei nº 8.142, de 28 de dezembro de 1990, e

Considerando o recente avanço técnico-científico e suas aplicações na pesquisa em genética humana, exigindo posicionamento de instituições, pesquisadores e Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) em todo o País, demandando, portanto, regulamentação complementar à Resolução CNS Nº 196/96 (Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos), atribuição da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), conforme item VIII.4 daquela Resolução;

Considerando os subsídios advindos do sistema CEPs – CONEP e a experiência acumulada na análise dos projetos de pesquisa dessa área até o momento; e

Considerando a necessidade de serem observados os riscos potenciais à saúde e a proteção dos direitos humanos, das liberdades fundamentais e do respeito à dignidade humana na coleta, processamento, uso e armazenamento de dados e materiais genéticos humanos,

R E S O L V E:

Aprovar as seguintes Diretrizes para Análise Ética e Tramitação dos Projetos de Pesquisa da Área Temática Especial de Genética Humana:

I - Preâmbulo:

A presente Resolução incorpora todas as disposições contidas na Resolução CNS Nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, da qual esta é parte complementar da área temática específica, e incorpora também, no que couber, as disposições constantes das Resoluções CNS Nºs 251/97, 292/99, 303/2000 e 304/2000.

II - Termos e Definições:

II.1 - A pesquisa em genética humana é a que envolve a produção de dados genéticos ou proteômicos de seres humanos, podendo apresentar várias formas:

a) pesquisa de mecanismos genéticos básicos: estudos sobre localização, estrutura, função e expressão de genes humanos e da organização cromossômica;

b) pesquisa em genética clínica: pesquisa que consiste no estudo descritivo de sujeitos individualmente e/ou em suas famílias, visando elucidar

determinadas condições de provável etiologia genética, podendo envolver análise de informações clínicas e testes de material genético;

c) pesquisa em genética de populações: estudos da variabilidade genética normal ou patológica em grupos de indivíduos e da relação entre esses grupos e uma condição particular;

d) pesquisas moleculares humanas: pesquisa que envolve testes moleculares associados ou não a doenças; estudos genéticos ou epigenéticos dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) ou de proteínas visando a novos tratamentos ou à prevenção de desordens genéticas, de outras patologias ou à identificação de variabilidade molecular;

e) pesquisa em terapia gênica e celular: introdução de moléculas de DNA ou RNA recombinante em células somáticas humanas *in vivo* (terapia gênica *in vivo*) ou células somáticas humanas *in vitro* e posterior transferência dessas células para o organismo (terapia gênica *ex vivo*) e pesquisas com células-tronco humanas com modificações genéticas; e

f) pesquisa em genética do comportamento: estudo com o objetivo de estabelecer possíveis relações entre características genéticas e comportamento humano.

II.2 - Todo procedimento relacionado à genética humana, cuja aceitação não esteja ainda consagrada na literatura científica, será considerado pesquisa e, portanto, deverá obedecer às diretrizes desta Resolução. Incluem-se procedimentos de genética em reprodução assistida, não regulados pelo Conselho Federal de Medicina.

III - Aspectos Éticos:

A finalidade precípua das pesquisas em genética deve estar relacionada ao acúmulo do conhecimento científico que permita aliviar o sofrimento e melhorar a saúde dos indivíduos e da humanidade.

III.1 - A pesquisa genética produz uma categoria especial de dados por conter informação médica, científica e pessoal e deve por isso ser avaliado o impacto do seu conhecimento sobre o indivíduo, a família e a totalidade do grupo a que o indivíduo pertença.

III.2 - Devem ser previstos mecanismos de proteção dos dados visando evitar a estigmatização e a discriminação de indivíduos, famílias ou grupos.

III.3 - As pesquisas envolvendo testes preditivos deverão ser precedidas, antes da coleta do material, de esclarecimentos sobre o significado e o possível uso dos resultados previstos.

III.4 - Aos sujeitos de pesquisa deve ser oferecida a opção de escolher entre serem informados ou não sobre resultados de seus exames.

III.5 - Os projetos de pesquisa deverão ser acompanhados de proposta de aconselhamento genético, quando for o caso.

III.6 - Aos sujeitos de pesquisa cabe autorizar ou não o armazenamento de dados e materiais coletados no âmbito da pesquisa, após

informação dos procedimentos definidos na Resolução sobre armazenamento de materiais biológicos.

III.7 - Todo indivíduo pode ter acesso a seus dados genéticos, assim como tem o direito de retirá-los de bancos onde se encontrem armazenados, a qualquer momento.

III.8 - Para que dados genéticos individuais sejam irreversivelmente dissociados de qualquer indivíduo identificável, deve ser apresentada justificativa para tal procedimento para avaliação pelo CEP e pela CONEP.

III.9 - Nos casos de aprovação de desassociação de dados genéticos pelo CEP e pela CONEP, deve haver esclarecimento ao sujeito de pesquisa sobre as vantagens e desvantagens da dissociação e Termo de Consentimento específico para esse fim.

III.10 - Deve ser observado o item V.7 da Resolução CNS Nº 196/96, inclusive no que se refere a eventual registro de patentes.

III.11 - Os dados genéticos resultantes de pesquisa associados a um indivíduo identificável não poderão ser divulgados nem ficar acessíveis a terceiros, notadamente a empregadores, empresas seguradoras e instituições de ensino, e também não devem ser fornecidos para cruzamento com outros dados armazenados para propósitos judiciais ou outros fins, exceto quando for obtido o consentimento do sujeito da pesquisa.

III.12 - Dados genéticos humanos coletados em pesquisa com determinada finalidade só poderão ser utilizados para outros fins se for obtido o consentimento prévio do indivíduo doador ou seu representante legal e mediante a elaboração de novo protocolo de pesquisa, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e, se for o caso, da CONEP. Nos casos em que não for possível a obtenção do TCLE, deve ser apresentada justificativa para apreciação pelo CEP.

III.13 - Quando houver fluxo de dados genéticos humanos entre instituições deve ser estabelecido acordo entre elas de modo a favorecer a cooperação e o acesso equitativo aos dados.

III.14 - Dados genéticos humanos não devem ser armazenados por pessoa física, requerendo a participação de instituição idônea responsável, que garanta proteção adequada.

III.15 - Os benefícios do uso de dados genéticos humanos coletados no âmbito da pesquisa, incluindo os estudos de genética de populações, devem ser compartilhados entre a comunidade envolvida, internacional ou nacional, em seu conjunto.

III.16 - As pesquisas com intervenção para modificação do genoma humano só poderão ser realizadas em células somáticas.

IV - Protocolo de Pesquisa:

IV.1 - As pesquisas da área de genética humana devem ser submetidas à apreciação do CEP e, quando for o caso, da CONEP como

protocolos completos, de acordo com o capítulo VI da Resolução CNS Nº 196/96, não sendo aceitos como emenda, adendo ou subestudo de protocolo de outra área, devendo ainda incluir:

- a) justificativa da pesquisa;
- b) como os genes/segmentos do DNA ou do RNA ou produtos gênicos em estudo se relacionam com eventual condição do sujeito da pesquisa;
- c) explicitação clara dos exames e testes que serão realizados e indicação dos genes/segmentos do DNA ou do RNA ou de produtos gênicos que serão estudados;
- d) justificativa para a escolha e tamanho da amostra, particularmente quando se tratar de população ou grupo vulnerável e de culturas diferenciadas (grupos indígenas, por exemplo);
- e) formas de recrutamento dos sujeitos da pesquisa e de controles, quando for o caso;
- f) análise criteriosa dos riscos e benefícios atuais e potenciais para o indivíduo, o grupo e gerações futuras, quando couber;
- g) informações quanto ao uso, armazenamento ou outros destinos do material biológico;
- h) medidas e cuidados para assegurar a privacidade e evitar qualquer tipo ou situação de estigmatização e discriminação do sujeito da pesquisa, da família e do grupo;
- i) explicitação de acordo preexistente quanto à propriedade das informações geradas e quanto à propriedade industrial, quando couber;
- j) descrição do plano de aconselhamento genético e acompanhamento clínico, quando indicado, incluindo nomes e contatos dos profissionais responsáveis, tipo de abordagens de acordo com situações esperadas, conseqüências para os sujeitos e condutas previstas. Os profissionais responsáveis pelo aconselhamento genético e acompanhamento clínico deverão ter a formação profissional e as habilitações exigidas pelos conselhos profissionais e sociedades de especialidade;
- l) justificativa de envio do material biológico e/ou dados obtidos para outras instituições, nacionais ou no exterior, com indicação clara do tipo de material e/ou dados, bem como a relação dos exames e testes a serem realizados. Esclarecer as razões pelas quais os exames ou testes não podem ser realizados no Brasil, quando for o caso; e
- m) em projetos cooperativos internacionais, descrição das oportunidades de transferência de tecnologia.

V - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE):

V.1 - O TCLE deve ser elaborado de acordo com o disposto no capítulo IV da Resolução CNS Nº 196/96, com enfoque especial nos seguintes itens:

a) explicitação clara dos exames e testes que serão realizados, indicação dos genes/segmentos do DNA ou do RNA ou produtos gênicos que serão estudados e sua relação com eventual condição do sujeito da pesquisa;

b) garantia de sigilo, privacidade e, quando for o caso, anonimato;

c) plano de aconselhamento genético e acompanhamento clínico, com a indicação dos responsáveis, sem custos para os sujeitos da pesquisa;

d) tipo e grau de acesso aos resultados por parte do sujeito, com opção de tomar ou não conhecimento dessas informações;

e) no caso de armazenamento do material, a informação deve constar do TCLE, explicitando a possibilidade de ser usado em novo projeto de pesquisa. É indispensável que conste também que o sujeito será contatado para conceder ou não autorização para uso do material em futuros projetos e que quando não for possível, o fato será justificado perante o CEP. Explicitar também que o material somente será utilizado mediante aprovação do novo projeto pelo CEP e pela CONEP (quando for o caso);

f) informação quanto a medidas de proteção de dados individuais, resultados de exames e testes, bem como do prontuário, que somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos e que não será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.);

g) informação quanto a medidas de proteção contra qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva; e

h) em investigações familiares deverá ser obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de cada indivíduo estudado.

VI - Operacionalização:

VI.1 - Cabe ao CEP, conforme o disposto no capítulo VII da Resolução CNS Nº 196/96, a análise dos projetos de pesquisa, assumindo co-responsabilidade no que diz respeito aos aspectos éticos.

VI.2 - Cabe ao CEP devolver de imediato ao pesquisador o protocolo que não contiver todas as informações relevantes (capítulo VI – Resolução CNS Nº 196/96, assim como as referidas nos capítulos III e IV da presente Resolução).

VI.3 - Cabe à CONEP a aprovação final das pesquisas em genética humana que incluam:

a) envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético;

b) armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniente com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;

c) alterações da estrutura genética de células humanas para utilização *in vivo*;

d) pesquisas na área da genética da reprodução humana (reprogenética);

e) pesquisas em genética do comportamento; e

f) pesquisas em que esteja prevista a dissociação irreversível dos dados dos sujeitos de pesquisa.

VI.4 - Nos casos previstos no item VI.3 acima, o CEP deverá examinar o protocolo, elaborar o parecer consubstanciado e enviar ambos à CONEP com a documentação completa conforme a Resolução CNS Nº 196/96, itens VII.13.a e b e VIII.4.c.1. O pesquisador deve ser informado que deverá aguardar o parecer da CONEP para início da execução do projeto.

VI.5 - Fica delegada ao CEP a aprovação final dos projetos de genética humana que não se enquadrem no item VI.3 acima. Nesses casos, o CEP deve enviar à CONEP a folha de rosto e o parecer consubstanciado final, seja de aprovação ou não aprovação.

VI.6 - A remessa de material para o exterior deve obedecer às disposições normativas e legais do País.

HUMBERTO COSTA

Presidente do Conselho Nacional de Saúde

Homologo a Resolução CNS Nº 340, de 8 de julho de 2004, nos termos do Decreto de Delegação de Competência de 12 de novembro de 1991.

HUMBERTO COSTA

Ministro de Estado da Saúde

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amory, J.K.; Anawalt, B.D.; Paulsen, C.A. Klinefelter's syndrome. *Lancet*. 356: 333-5, 2000.

Borges-Osório, M^a R.; Robinson, W. M. Genética Humana. 2^a edição. Editora Artmed, Porto Alegre, 2001.

Carakushansky, G. Doenças Genéticas em Pediatria. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2001.

Caspersson, T.; Zech, L.; Johansson, C. Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 60:315-319, 1970.

Catala, M. Embriologia – Desenvolvimento Humano Inicial. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2003.

Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996. Disponível em <<http://conselho.saude.gov.br/comissao/conep/resolucao.html>> Acesso em : 01 de abril de 2005.

Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 340, de 08 de julho de 2004. Disponível em <<http://conselho.saude.gov.br/comissao/conep/resolucao.html>> Acesso em : 01 de abril de 2005.

Damiani, D.; Setian, N.; Kuperman, H.; Manna, T.D.; Dichtchekian, V. Genitália Ambígua: Diagnóstico Diferencial e Conduta. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia – ABE&M*. Volume 45, nº1, p. 37-47, fev 2001.

Damiani, D. Estados Intersexuais. *Pediatria Moderna*. 31:945-80. 1995.

Damiani, D; Fellous, M.; McElreavey, K.; Barbaux, S.; Barreto, E.S.A.; Dichtchekian, V.; et al. True hermaphroditism: clinical aspects and molecular studies in 16 cases. *Eur J Endocrinol*. 136:201-4. 1997.

Danish, R.K. Intersex problems in the neonate. *Indian Journal of Pediatrics*. 9:555-75.1982.

de la Chapelle, A. The complicated issue of sex determination. *Am J Hum Genet.*, 43: 1-3. 1988.

Ford, C.; Polani, P.; Briggs, J.; Bishops, P. A presumptive human XXY/XX mosaic. *Nature*. 183:1030-1. 1959.

Hargreave, T.B. Genetics and male infertility. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol*. 12(3): 207-19, 2000.

Jacobs, P.; Strong, J. A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. *Nature.* 183:302-3. 1959.

Jarow, J.P. Klinefelter's syndrome in the male infertility clinic. *J. Urol.* 163(2): 667-8, 2000.

Jorde, L. B.; Carey, J. C.; Bamshad, M. J.; White, R. L. Genética Médica. 2ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2000.

Koopman, P.; Gubbay, J.; Vivian, N.; Goodfellow, P; Lovell-Badge, R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature.* 351:117-21. 1991

Maciel-Guerra, A. T.; Guerra Júnior, G. Menino ou Menina? – Os distúrbios da diferenciação sexual. Editora Manole Ltda, São Paulo, 2002.

Mello, R. A. Embriologia Humana. Editora Atheneu, São Paulo, 2000.

Money, J. Cytogenetics, hormones, and behavior disability: Comparison of XXY and XYY syndromes. *Clin. Genet.* 6: 370-4, 1974.

Moorhead, P.S.; Nowell, P.C.; Mellman, W.J.; Battips, D.M.; Hungerfor, D.A. Chromosome preparations of leukocytes culture from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.,* 20: 613, 1960.

Moore, K.L.; Persaud, T.V.N. Embriologia Básica. 3ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1991.

Moore, K.L.; Persaud, T.V.N. Embriologia Clínica. 6ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2000.

Morris, J. M. The syndrome of testicular feminizations in male pseudohermaphroditism. *Am J Obstret Gynecol.* 65:1192. 1953.

Motta, P. A. Genética Humana – Aplicada à psicologia e toda a área biomédica. 2ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2005.

Pinsky, L.; Kaufman, M. Genetics of steroid receptors and their disorders. *Afv Hum Genet.* 16: 299-472. 1987

Ramsay, M.; Bernstein, R.; Zwane, E.; et al. XX true hermaphroditism in southern African blacks: An enigma of primary sexual differentiation. *Am J Hum Genet.* 43:4-13. 1988.

Sohval, A. R. Mixed gonadal dysgenesis: a variety of hermaphroditism. *Am J Hum Genet.* 15:155. 1963.

Strachan, T.; Read, A. P. Genética Molecular Humana. 2ª ed. Artmed Editora S.A., Porto Alegre, 2001.

Suzuki, Y.; Sasagawa, I.; Yazawa, H.; Tateno, T.; Nakada, T.; Saito, H.; Hiroi, M. Localization of the sex-determining region-Y gene in XX males. *Arch Androl.* 44(2):133-6, Mar-Apr 2550.

Tjio, J. H.; Levan, A. The chromosome number of Man. *Hereditas*, 42:1-6, 1956.

Thompson, M. W.; McInnes, R. R.; Willard, H. F. Thompson & Thompson - Genética Médica. 6ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2002.

van Niekerk, W. A.; Relief, A. E. The gonads of human true hermaphrodites. *Hum Genet.* 58: 117-22, 1981.

Vogel, F.; Motulsky, A G. Genética Humana – Problemas e Abordagens. 3ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2000.

Wilkins, L. The diagnosis and treatment of endocrine disorders in childhood and adolescence. *Thomas, Springfield*. 1950.