LEANDRA STEINMETZ

**Geração de inibina A após estímulo gonadotrófico :
novo método de detecção de tecido ovariano em
pacientes com anomalia da diferenciação sexual**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Durval Damiani

SÃO PAULO

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Steinmetz, Leandra

Geração de inibina A após estímulo gonadotrófico : novo método de detecção de tecido ovariano em pacientes com anomalia da diferenciação sexual / Leandra Steinmetz. -- São Paulo, 2006.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientador: Durval Damiani.

Descritores: 1.HERMAFRODITISMO 2.MENOTROPINAS 3.OVÁRIO
4.INIBINAS/uso diagnóstico 5.ESTRADIOL/uso diagnóstico

USP/FM/SBD-095/06

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pela possibilidade de realizar este mestrado.

Ao meu pai, que foi, é e sempre será o meu exemplo de vida. Meu pai, que em todos os momentos difíceis soube passar uma tranquilidade ímpar.

À minha mãe, que é uma pessoa extremamente especial e que me ensinou o que significam as palavras amor e dedicação.

Ao Ranieri, meu companheiro, amor e amigo, que em todos os momentos soube me entender e me apoiar integralmente.

Aos meus irmãos Deborah, Mario e Yaffa, pelo constante estímulo e apoio incondicional. Amo vocês.

Aos meus sogros, cunhados e sobrinhos por todo amor e companheirismo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Aos Pacientes e seus responsáveis, sem os quais todo este trabalho não seria possível.

Ao Prof. Dr. Durval Damiani, meu orientador, pelos ensinamentos, dedicação e paciência. Sua determinação e amor pela endocrinologia constituem um exemplo que procurarei seguir durante toda a minha vida.

À Profa. Dra. Nuvarte Setian, com quem eu tenho orgulho de conviver e aprender, minha eterna gratidão.

Aos amigos Hilton Kuperman e Thais Della Manna, pelo apoio, incentivo e sugestões.

Aos amigos Vaê Dichtchekenian e Hamilton Cabral de Menezes Filho, pelo companheirismo.

À amiga Louise Cominato Kanashiro, pela amizade e pela ajuda em momentos difíceis.

A todos os complementandos da Unidade de Endocrinologia Pediátrica, pelo incentivo de aprender todos os dias.

Ao Dr. Carlos Alberto Longui, pelo estímulo na realização deste trabalho.

À bióloga Mylene Neves Rocha, pela colaboração nas dosagens de inibina A.

Ao pessoal do laboratório do Instituto da Criança, em especial à Karina Hatamoto Kawasato, pela colaboração na separação das amostras.

À Mariza Kazue Umetsu da biblioteca do Instituto da Criança, pela amizade e pela ajuda na organização das referências bibliográficas.

À Dra Marta Miranda Leal, pelo trabalho de revisão da língua portuguesa.

Ao pessoal da coleta e da enfermagem da sala de vacina do Instituto da Criança, pela colaboração no atendimento aos pacientes.

Ao pessoal do SAME, pela boa vontade na separação dos prontuários.

Ao Prof. Dr. Cláudio Leone, pela orientação na análise estatística dos dados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro dado a este trabalho (protocolo nº 04/02168-7).

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Hermafroditismo verdadeiro	3
1.1.1. Definição.....	3
1.1.2. Etiopatogenia.....	4
1.1.3. Histologia	5
1.1.4. Apresentação Clínica.....	6
1.1.5. Avaliação diagnóstica	7
1.2. Inibinas.....	9
2. OBJETIVOS.....	15
3. MÉTODOS.....	17
3.1. Casuística	18
3.2. Métodos	21
3.3. Análise Estatística	24
4. RESULTADOS.....	26
4.1. Grupo HCSR.....	27
4.2. Grupo CRIPTO.....	31
4.3. Grupo pacientes sem diagnóstico	34
4.4. Grupo HV	37
5. DISCUSSÃO	43
5.1. Caracterização da Casuística	46
5.2. Avaliação do Método.....	50
5.3. Avaliação do resultado do teste de estímulo com hMG	55
5.4. Avaliação das correlações hormonais.....	61
5.5. Perspectivas Futuras.....	64
5.6. Considerações finais.....	66
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

17 OHP	17-hidroxi-progesterona
AMH	hormônio anti-mülleriano
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
ELISA	ensaio imunoenzimático
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSH	hormônio folículo-estimulante
GA	Genitália ambígua
GnRH	hormônio liberador das gonadotrofinas
hCG	hormônio gonadotrófico coriônico humano
HCSR	Hiperplasia Congênita da Supra-renal
hMG	gonadotrofina humana da menopausa
HV	Hermafroditismo verdadeiro
kDa	quilodalton
LH	hormônio luteinizante
ng/dL	nanogramas por decilitro
nm	nanômetro
pg/mL	picogramas por mililitro

RNM	ressonância nuclear magnética
rpm	rotações por minuto
SMAD	fator de transcrição utilizado na sinalização da inibina
SPSS	Statistic Package for Social Sciences
SRY	sex-determining region on the chromosome Y
TGF β	fator transformador de crescimento β
UI	unidades internacionais
UI/kg	unidades internacionais por quilograma
UI/L	unidades internacionais por litro
US	ultra-som

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas dos 13 pacientes com anomalia da diferenciação sexual sem etiologia definida.....	20
Tabela 2. Características clínicas dos sete pacientes com hermafroditismo verdadeiro	21
Tabela 3. Evolução e mediana (M) de LH, FSH, testosterona e estradiol em pacientes com HCSR antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2)	28
Tabela 4. Evolução e mediana (M) de Inibina A em pacientes com HCSR antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2)....	28
Tabela 5. Evolução e mediana (M) de LH, FSH, testosterona e estradiol em 10 pacientes com criptorquidia antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2).....	32
Tabela 6. Evolução de Inibina A em 10 pacientes com criptorquidia antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2)	32
Tabela 7. Evolução e mediana (M) de LH, FSH, testosterona e estradiol em pacientes com anomalia da diferenciação sexual sem etiologia definida antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2)	34
Tabela 8. Evolução de Inibina A em pacientes com anomalia da diferenciação sexual sem etiologia definida antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2).....	35
Tabela 9. Evolução e mediana (M) de LH, FSH, testosterona e estradiol em pacientes com HV antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2)	37
Tabela 10. Evolução e mediana (M) de inibina A em pacientes com HV antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2)....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ovotéstis (folículos ovarianos à esquerda e túbulos seminíferos à direita)	5
Figura 2. Formas moleculares de inibinas	10
Figura 3. Desenho do estudo	23
Figura 4. Evolução do FSH no grupo HCSR.....	29
Figura 5. Evolução do estradiol no grupo HCSR.....	30
Figura 6. Evolução da inibina A no grupo HCSR	30
Figura 7. Evolução do FSH no grupo Criptorquidia.....	33
Figura 8. Evolução do FSH no grupo dos pacientes com anomalia da diferenciação sexual sem etiologia definida.....	36
Figura 9. Evolução do FSH no grupo HV	38
Figura 10. Evolução do estradiol no grupo HV.....	39
Figura 11. Evolução da inibina no grupo HV	39
Figura 12. Incremento do FSH (Δ FSHA2-FSHB) nos quatro grupos (1-HCSR, 2-HV, 3-Pacientes sem diagnóstico e 4-Cripto).....	40
Figura 13. Comparação da resposta de estradiol (tempo A2-tempo B) nos grupos HCSR (1) e HV (2)	41
Figura 14. Comparação da resposta de inibina (tempo A2-tempo B) nos grupos HCSR (1) e HV (2)	41

RESUMO

Steinmetz L. Geração de inibina A após estímulo gonadotrófico: novo método de detecção de tecido ovariano em pacientes com anomalia da diferenciação sexual [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 75p.

Introdução: O hermafroditismo verdadeiro, caracterizado pela demonstração histológica de tecido ovariano e testicular no mesmo indivíduo, responde por cerca de 5% dos casos de anomalia da diferenciação sexual. Como a variabilidade fenotípica é muito grande, desde mulheres com genitália externa normal até homens com genitália externa normal, passando por toda uma gama de apresentações intermediárias, torna-se impossível o diagnóstico baseado apenas em dados clínicos. A avaliação da presença de tecido testicular é bem estabelecida, mas não há teste para a demonstração de tecido ovariano. A inibina A é produzida exclusivamente no ovário e é estimulada pelas gonadotrofinas. **Objetivos:** 1. Avaliar a efetividade do método de estimulação gonadal com a associação LH/FSH na demonstração de tecido ovariano; 2. Avaliar a eventual presença de tecido ovariano em pacientes com anomalias da diferenciação sexual através da dosagem sérica de Inibina A e de estradiol após estímulo gonadotrófico e; 3. Facilitar o diagnóstico de hermafroditismo verdadeiro antes da fase de exploração cirúrgica das gônadas. **Métodos:** Foram incluídos no estudo, dez pacientes com hiperplasia congênita de supra-renal, dez pacientes com criptorquidia unilateral isolada, treze pacientes com anomalia da diferenciação sexual sem etiologia definida e sete pacientes com hermafroditismo verdadeiro com diagnóstico histológico. Todos os pacientes foram submetidos a um teste de estímulo gonadotrófico, representado pela administração de gonadotrofina humana da menopausa (menotropina), que tem em sua composição LH e FSH, na dose de 150 UI de cada gonadotrofina, por via intramuscular, durante três dias subseqüentes. Dosagens de LH, FSH, estradiol, testosterona e inibina A foram realizadas antes (B), 24h após a primeira dose (A1) e 24 horas após a terceira dose (A2). **Resultados:** O LH não apresentou elevação significativa nos quatro grupos. O FSH elevou-se nos quatro grupos de forma progressiva e semelhante. O estradiol elevou-se significativamente nos grupos de pacientes com hiperplasia congênita das supra-renais ($p=0,005$) e de pacientes com hermafroditismo verdadeiro ($p=0,031$), enquanto a testosterona elevou-se nos grupos com criptorquidia isolada ($p=0,027$) e de pacientes com ambigüidade genital sem etiologia definida ($p=0,028$). A inibina A elevou-se significativamente nos grupos de pacientes com hiperplasia congênita das supra-renais ($p=0,005$) e com hermafroditismo verdadeiro ($p=0,043$). **Conclusão:** O teste de estímulo com LH e FSH mostrou-se útil para o diagnóstico da presença de tecido ovariano tanto em pacientes com hiperplasia congênita das supra-renais, como naqueles com hermafroditismo verdadeiro.

Descritores: hermafroditismo, menotropina, ovário, inibinas/uso diagnóstico, estradiol/uso diagnóstico.

SUMMARY

Steinmetz L. Inhibin A generation after gonadotropin stimulation: a new method to detect ovarian tissue in patients with intersex conditions such as true hermaphroditism [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 75p

Introduction: True hermaphroditism (TH) is characterized by the presence of ovarian and testicular tissue in the same patient comprises 5% of the intersex cases. A large spectrum of phenotypical variation is observed, ranging from normal female genitalia to normal male genitalia, covering a wide range of intermediary presentations, it becomes very difficult to make the diagnosis of TH on clinical basis. The detection of testicular tissue is well established but there is no available test to demonstrate the presence of ovarian tissue. Objectives: 1. To evaluate the effectiveness of the LH/FSH gonadal stimulation in demonstrating ovarian function 2. To evaluate the presence of ovarian tissue in intersex patients under gonadotropic stimulation and 3. To make the TH diagnosis before the surgical procedure. Patients and Methods: Ten patients with congenital adrenal hyperplasia (CAH), 10 with unilateral cryptorchidism, 13 intersex patients with no defined etiology, and seven TH patients have been included in the study. All the patients had a gonadotropic stimulation test with human menopausal gonadotropin (menotropin-hMG), 150 IU, intramuscular, for three consecutive days. LH, FSH, estradiol, testosterone, and Inhibin A were measured before (0 time), 24h after the first gonadotropin dose, and 24h after the third gonadotropin dose. Results: LH did not show any significant increase in the four groups studied. FSH increased in the four groups in a similar way. Estradiol increased in CAH patients ($p=0.005$) and in TH patients ($p=0.031$), while testosterone increased in patients with unilateral cryptorchidism ($p=0.027$) as well as in the intersex patients without defined etiology. Inhibin A levels increased in CAH patients ($p=0.005$) and in the TH patients ($p=0.043$). Conclusion: The LH/FSH stimulation test demonstrated to be a useful method to diagnose the presence of ovarian tissue in CAH patients as well as in TH patients, becoming an important tool to diagnose TH even before the surgical procedure and histologic studies of the gonads.

Descriptors: hermaphroditism, menotropins, ovary, inhibins/ diagnostic use, estradiol/ diagnostic use.

1. INTRODUÇÃO

A condução de um caso de ambigüidade genital é complexa. O foco primário é o estabelecimento da etiologia e a escolha do sexo de criação e, como se trata de uma situação profundamente estressante para os pais, familiares e, conforme a idade, para a própria criança, cria-se uma necessidade social urgente para a solução rápida do problema.

A investigação diagnóstica é dispendiosa e difícil e, em alguns casos, mesmo após a realização de vários exames, o diagnóstico etiológico não pode ser feito ou, o que é pior, é feito incorretamente.

Durante as primeiras semanas de desenvolvimento, todos os embriões são fenotipicamente similares em relação à diferenciação sexual, com gônadas bipotenciais, ductos paramesonéfricos e mesonéfricos e genitália externa indiferenciada.

A determinação e a diferenciação sexual são processos seqüenciais, regulados por um grande número de genes localizados tanto nos cromossomos sexuais quanto nos autossômicos. O conjunto completo de todos os genes e fatores envolvidos no processo ainda é desconhecido.

A determinação sexual se refere à formação da gônada e inicia-se em torno da 5ª ou 6ª semana de gestação. É estabelecida por múltiplos eventos moleculares que direcionam o desenvolvimento de células germinativas e a sua migração para a crista urogenital, com formação de testículos

(normalmente na presença de cromossomo Y) ou ovários (na ausência de cromossomo Y e presença de um segundo cromossomo X).

A diferenciação sexual é a resposta dos tecidos-alvos a hormônios produzidos pelas gônadas após sua diferenciação em ovário ou testículo. É também um processo extremamente complexo e está sob o controle de múltiplos genes e hormônios. Anormalidades na diferenciação sexual normal são relativamente comuns e ocorrem em aproximadamente 1/4500 nascidos vivos (Agha et al., 2001; Brown e Warne, 2005).

Dentre as causas de diferenciação sexual anômala, o hermafroditismo verdadeiro (HV) figura como uma etiologia pouco comum na maior parte do mundo, ocorrendo em 4 a 10% dos casos.

1.1. HERMAFRODITISMO VERDADEIRO

1.1.1. Definição

O HV é caracterizado pela presença de tecido ovariano (folículos ou *corpora albicantia*) e tecido testicular (túbulos seminíferos, espermatogônias e/ou espermatozóides) no mesmo indivíduo. Tanto estruturas de derivados müllerianos como wolffianos podem estar presentes e pode haver vários graus de ambigüidade genital (Walker et al., 2000).

1.1.2. Etiopatogenia

Os eventos moleculares que levam ao HV ainda não foram totalmente estabelecidos, mas alguns casos têm sido atribuídos à translocação de um fragmento do cromossomo Y, que contém o gene SRY (*sex-determining region on the chromosome Y*), para um sítio no cromossomo X. A recombinação entre esses dois cromossomos ocorre durante a meiose e é normalmente restrita a regiões pseudo-autossômicas localizadas nas duas extremidades do cromossomo Y, onde também ocorre o pareamento deste com o cromossomo X. A recombinação fora das regiões pseudo-autossômicas pode resultar na translocação do gene SRY do Y para o X, e conseqüentemente, numa diferenciação sexual anormal, com o desenvolvimento de um paciente hermafrodita verdadeiro (Moses et al., 2003; MacLaughlin e Donahoe, 2004).

No entanto, o gene SRY está presente em apenas 10 a 30% dos pacientes hermafroditas verdadeiros 46,XX, sugerindo que o HV seja, em termos genéticos, uma condição heterogênea e que seus mecanismos etiopatogênicos ainda não estejam completamente estabelecidos (Sultan et al., 2002).

Sessenta por cento dos pacientes apresentam cariótipo 46,XX, enquanto em apenas 10% o cariótipo é 46,XY. Os outros 30% apresentam mosaicismos variados (Damiani et al., 2005).

1.1.3. Histologia

A gônada mais freqüentemente encontrada é o ovotéstis (tecido ovariano e testicular na mesma gônada) (Figura 1), seguida de ovário e testículo, sendo mais comum que as gônadas com predomínio de tecido testicular ocorram no lado direito e aquelas com predomínio de tecido ovariano, no lado esquerdo. O ovotéstis pode estar presente no abdome, na região inguinal ou na bolsa lábio-escrotal. Ele pode apresentar-se como uma estrutura bipolar, com tecido ovariano na porção cranial e testicular na caudal, em diferentes proporções; ou pode ser misto, com uma mistura variável de tecidos ovariano e testicular dentro da gônada.

Figura 1. Ovotéstis (folículos ovarianos à esquerda e túbulos seminíferos à direita)

Embora a aparência histológica do tecido ovariano nos hermafroditas verdadeiros seja quase sempre normal e várias gestações terem sido descritas em pacientes com HV, o tecido testicular é normalmente imaturo e a espermatogênese é rara. A incidência de tumores gonadais em pacientes com HV está em torno de 2,4 a 4,6% (Krstić et al., 2000; Yordam et al., 2001).

1.1.4. Apresentação Clínica

A maioria dos pacientes procura o serviço médico devido à ambigüidade genital e/ou ginecomastia. O grau de virilização depende da quantidade de tecido testicular funcionante.

Setenta por cento dos hermafroditas verdadeiros têm mamas bem desenvolvidas, 24,5% têm um discreto aumento mamário e apenas 5,5% dos pacientes não apresentam aumento das mamas. O desenvolvimento mamário independe do cariótipo.

Internamente, o útero está quase sempre presente, mas o desenvolvimento de estruturas mullerianas e wolffianas é variável e geralmente depende da gônada adjacente.

Durante a puberdade, em crianças criadas como meninos, são descritos sangramento uretral cíclico e desenvolvimento mamário decorrentes da presença de tecido ovariano funcionante. Da mesma forma, se persistir tecido testicular em crianças criadas como meninas, ocorrerá uma virilização, com hipertrofia clitoriana precoce e possibilidade de malignização posterior da gônada, especialmente em presença do cromossomo Y (Wiersma, 2001).

1.1.5. Avaliação diagnóstica

Tanto a genitália externa quanto os ductos internos do HV podem apresentar desde o fenótipo feminino até o masculino. A manifestação inicial é a ambigüidade genital em 90% dos casos e, mais raramente, clitoromegalia isolada ou hipospádia isolada. Grande parte dos pacientes tem um seio urogenital e, na maioria dos casos, o útero está presente (Sultan et al., 2002).

Devido à grande diversidade de aspectos da genitália externa e ao fato de que não há absolutamente nenhuma evidência clínica, laboratorial ou de imagem que distinga o hermafrodita verdadeiro de outras anomalias de diferenciação sexual, o diagnóstico depende completamente de achados histopatológicos (Ogilvy-Stuart e Brain, 2004).

Assim, alguns autores lançaram mão de métodos hormonais e de imagem, na tentativa da elucidação diagnóstica, antes de ser necessária a realização da biópsia gonadal.

A avaliação da presença de tecido testicular é feita com a aplicação da gonadotrofina coriônica humana (hCG), para estímulo da produção de testosterona pelas células de Leydig e com a dosagem de inibina B e hormônio anti-mulleriano (AMH) para avaliação das células de Sertoli.

A demonstração da presença de tecido ovariano é mais complicada. Em 1998, Mendez et al. publicaram os resultados de um estudo mostrando a resposta de estradiol ao estímulo combinado de LH e FSH, com a administração de gonadotrofina humana da menorpausa ou menotropina

(hMG) a cada 12h (2UI/Kg). Os autores consideraram a obtenção de uma concentração sérica acima de 80 pg/mL de estradiol como sugestiva da presença de tecido ovariano.

Apesar do ultra-som (US) ser importante na avaliação da anatomia da vagina e do útero, na exclusão de anomalias renais associadas e na visualização das adrenais, o método não é adequado para caracterizar o tipo de gônada presente (Pires et al., 2005).

Em um estudo realizado na Índia, com 10 pacientes, Biswas et al. (2004) compararam os achados do US e da ressonância nuclear magnética (RNM) com os histopatológicos pós-cirurgia. O US foi capaz de localizar 64% das gônadas e a RNM 73%. A diferenciação entre testículo e ovotéstis não foi possível através da RNM. Assim, enquanto o ovário pôde ser devidamente diagnosticado, o ovotéstis não pôde ser diferenciado do testículo mesmo na RNM. O US, e a RNM não foram capazes de detectar gônadas compostas por tecido fibroso ("streak").

Secaf et al. (1994) realizaram um estudo multicêntrico de sete anos, onde foram feitos 44 exames de RNM em pacientes com ambigüidade genital e os achados foram comparados com os achados cirúrgicos em 29 dos 44 pacientes. Os autores relataram que em 93% dos pacientes o útero foi adequadamente diagnosticado pela RNM. Dos 58 ovários, 37 foram corretamente identificados pela RNM (64%) e apenas 11 de 22 testículos foram corretamente identificados pela RNM (50%). Em um caso de ovotéstis, apenas o tecido testicular foi visto na RNM.

O diagnóstico pela biópsia, muitas vezes, é complicado pelo fato de que a análise de um fragmento da gônada pode levar a um diagnóstico incorreto. Em um levantamento realizado na África do Sul, relativo a um período de 16 anos, avaliou-se 71 crianças com hermafroditismo verdadeiro. Todas elas foram submetidas à biópsia, e 34 pacientes tiveram uma ou as duas gônadas extraídas. Comparando-se o estudo anatomopatológico da peça cirúrgica com o resultado da biópsia, concluiu-se que 22% das gônadas diagnosticadas como ovários ou testículos pela biópsia tratavam-se, na realidade, de ovotéstis, conforme constatado na avaliação da peça inteira (Wiersma, 2001).

É possível que muitos hermafroditas verdadeiros não sejam diagnosticados, particularmente quando a constituição cromossômica é 46,XY, uma vez que em pseudo-hermafroditas masculinos não se realiza sistematicamente o estudo histológico das gônadas.(Damiani et al., 2005)

O diagnóstico etiológico correto é de extrema importância, pois, junto com o aspecto externo da genitália do paciente, colabora para a decisão do sexo de criação da criança.

1.2. INIBINAS

A primeira evidência da existência da inibina foi em 1923 com a demonstração de um composto aquoso não esteróide de origem testicular que inibia a formação de células gonadotróficas hipertrofiadas (células de castração) na hipófise. O isolamento e a purificação da molécula da inibina ocorreram apenas em 1985 (Laven e Fauser, 2004).

As inibinas são glicoproteínas heterodiméricas compostas por uma subunidade α comum, ligada covalentemente por pontes dissulfídicas a uma subunidade β , que pode ser β A (inibina A) ou β B (inibina B) (Groome e Evans, 2000).

Cada isoforma é processada a partir de uma proteína precursora maior, para uma forma madura de 32 KDa, sendo 18 KDa da subunidade alfa e 14 KDa da subunidade beta. Um grande número de inibinas de diversos pesos moleculares foi identificado, o que é atribuído ao processamento de precursores das subunidades em sítios de quebra de aminoácidos após a dimerização ou por glicosilação diferencial, com a presença de uma ou duas cadeias de carboidrato localizadas na região carboxi da subunidade alfa. Além disso, várias formas de subunidade alfa inativas foram identificadas (Robertson et al., 1997) – (Figura 2).

Modificado de Pangas A. and Woodruff T., *Trends Endocrinol Metab.* 11, 309-314 (2000).

Figura 2. Formas moleculares de inibinas

As inibinas fazem parte da superfamília de fatores transformadores de crescimento β (TGF β), que inclui mais de 30 proteínas estruturalmente relacionadas que têm funções diversas durante o desenvolvimento embriológico e a homeostase de tecidos adultos.

As inibinas exercem um efeito endócrino na supressão da produção hipofisária de FSH. Mais recentemente, alguns efeitos parácrinos foram descritos, como a habilidade da inibina A de estimular a síntese androgênica induzida pelo LH, nas células tecaais, aumentando assim, a disponibilidade de substratos para a síntese de estradiol.

A atividade da inibina depende de sua interação com receptores serina-treonina quinase tipos I e II, e a fosforilação de proteínas sinalizadoras citoplasmáticas, os SMADs.

Estudos recentes em humanos demonstraram que tanto o FSH quanto o LH estimulam a secreção de inibina A e B nas células da granulosa luteinizadas. A inibina A é estimulada em estágios mais avançados de desenvolvimento folicular e se torna a principal forma de inibina secretada no folículo pré-ovulatório em resposta tanto ao FSH como ao LH (Welt et al., 2001).

Lanuza et al. (1999), em um estudo com células de granulosa de ratas em cultura, demonstraram que a secreção das inibinas é regulada pelo FSH, estrógeno e fatores de crescimento locais. Tanto o FSH quanto o estrógeno estimularam a secreção de inibina A.

Enquanto o tecido ovariano é capaz de expressar tanto inibina A quanto inibina B, o tecido testicular é capaz apenas da expressão de inibina B, o que

torna a inibina A um marcador específico da gônada feminina (Byrd et al., 1998; Crofton et al., 1997; Lahlou e Roger, 2004; Raivio e Dunkel, 2002).

O primeiro ensaio desenvolvido para a dosagem das inibinas foi conduzido no final da década de 80. Inicialmente, as inibinas eram dosadas por radioimunoensaios que utilizavam anticorpos contra a subunidade α , não distinguindo as formas diméricas de inibina e incluindo na dosagem a subunidade α livre sérica. A partir de 1994, avanços tecnológicos importantes no desenvolvimento de métodos capazes de dosar as diferentes formas de inibina foram feitos. O método atualmente utilizado foi descrito por Groome et al. (1994) e consiste na técnica de ELISA tipo sanduíche, onde se utiliza um anticorpo monoclonal altamente específico para a subunidade βA e um anticorpo monoclonal marcado para a subunidade α , possibilitando a dosagem específica da inibina A.

A inibina A tem sido usada para monitorização de tumores de células da granulosa, assim como em fisiologia reprodutiva. O aumento de níveis de inibina A tem sido observado durante a gestação normal. Os valores aumentam durante o primeiro trimestre, caem após 10 semanas e ficam estáveis entre as semanas 15 a 25. Após isso, voltam a subir, atingindo o pico no termo. Os valores de inibina A estão muito elevados na gestação de fetos com síndrome de Down e em gestações que cursam com pré-eclâmpsia. Os valores de inibina A declinam com o envelhecimento ovariano (Groome e Evans, 2000; Tong et al., 2003).

Alguns estudos demonstraram que a inibina A aumenta com a evolução da puberdade em meninas normais (Bergadá et al., 2001; Raivio e Dunkel, 2002; Foster et al., 2005).

O aumento de inibina A durante a puberdade se deve ao fato de que a elevação dos níveis circulantes de LH e FSH na metade final da puberdade leva a um maior índice de recrutamento de folículos para se desenvolverem além do estágio antral, com uma maior proporção atingindo um tamanho suficiente para produzir inibina A (Crofton et al., 1997).

Crofton et al. (2002) analisaram a inibina A em 331 meninas de diferentes idades e mostraram que, durante os dois primeiros meses de vida, a inibina A é detectada em praticamente todas as amostras, mas depois se torna indetectável na maioria das amostras até o 10º ano de vida, após o qual a concentração média aumenta até atingir um platô aos 14 anos. A inibina A, o FSH e o estradiol mostraram uma correlação positiva com o estágio puberal. A inibina A se torna detectável em todas as amostras de meninas em estágio puberal de Tanner M3 a M5.

Em outro estudo com 28 meninas em diferentes fases de puberdade e cinco mulheres na fase folicular do ciclo menstrual, a concentração de inibina A aumentou entre os estádios II e III de puberdade e se manteve em concentrações maiores nos estádios IV e V da puberdade. Essas concentrações exibiram uma correlação positiva com a idade óssea (Foster et al., 2000).

Na mulher adulta, as inibinas apresentam diferentes padrões secretórios durante o ciclo menstrual. A inibina B é secretada pelos folículos

em resposta ao FSH durante o início da fase folicular, sendo assim, as concentrações plasmáticas de inibina B são máximas na fase folicular inicial e média. A inibina A é secretada apenas em baixos níveis durante o início da fase folicular, aumenta no final desta fase e atinge o pico durante a fase lútea, quando existe o estímulo combinado das gonadotrofinas LH e FSH (Welt, 2004).

Assim, levando-se em conta que a inibina A é um produto da célula granulosa do ovário e, visando-se a um diagnóstico mais simples e menos invasivo, propusemos a realização da dosagem de inibina A após estímulo gonadotrófico para a caracterização de tecido ovariano em pacientes com ambigüidade genital. Nossa proposta visa a elucidar alguns desses casos tentando demonstrar a presença de tecido ovariano de uma forma mais rápida e menos invasiva, colaborando para um diagnóstico mais preciso nos casos de anomalias da diferenciação sexual.

2. OBJETIVOS

Avaliar a efetividade do método de estimulação gonadal com a associação LH/FSH na demonstração de tecido ovariano.

Facilitar o diagnóstico do HV antes da fase de exploração cirúrgica das gônadas.

Avaliar a eventual presença de tecido ovariano em pacientes com anomalia da diferenciação sexual sem etiologia definida, através da dosagem sérica de inibina A e estradiol, após estímulo gonadotrófico.

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram incluídos no estudo 20 pacientes acompanhados nas Unidades de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança da FMUSP e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Destes, 13 apresentavam anomalia da diferenciação sexual sem etiologia definida e sete apresentavam diagnóstico histológico confirmado de hermafroditismo verdadeiro.

Foram excluídos os pacientes com etiologia esclarecida como os defeitos de síntese de testosterona, resistência androgênica comprovada pela detecção da mutação do receptor androgênico, deficiência de 5 α -redutase, hipoplasia de células de Leydig e deficiência gonadotrófica, por ser improvável o diagnóstico concomitante de HV nestes casos, e os pacientes com diagnóstico etiológico definido de HV que haviam retirado a porção ovariana da gônada.

O grupo de pacientes com anomalia da diferenciação sexual sem etiologia definida foi composto por 13 pacientes com média de idade de 5 anos e 9 meses (3 meses – 11 anos e 6 meses) no momento da realização do teste, 84,6 % com queixa de ambigüidade genital, com cariótipos variados. Todos foram criados no sexo masculino e de oito que realizaram

teste de estímulo com hCG, nenhum obteve resposta satisfatória. Apenas três realizaram biópsia, que evidenciou tecido testicular (Tabela 1).

O grupo de pacientes com HV foi composto por sete pacientes. Destes, em 71,4% a apresentação inicial foi ambigüidade genital, 85,7% apresentava cariótipo 46,XX, todos apresentavam ovotéstis, sendo que em 28,6% o ovotéstis era bilateral. Dos pacientes que apresentavam ovotéstis unilateral, em 80%, a associação foi com ovário. A maioria (71,4%) foi criada no sexo feminino (Tabela 2).

Foram incluídos no grupo controle, 10 pacientes com presença de ovários, portadoras de hiperplasia congênita de supra-renal (HCSR) pré-puberes, cariótipo 46,XX, com derivados müllerianos comprovados por ultrassonografia (ou outro método de imagem) e dosagem de precursores de síntese de cortisol (17OHP) confirmando o diagnóstico. Todas as pacientes estavam recebendo glicocorticóide e mineralocorticóide para o controle da doença de base.

Foi ainda considerado como controle, um grupo de 10 pacientes com ausência de ovário, portadores de criptorquidismo idiopático unilateral pré-puberes, com cariótipo 46,XY e resposta normal de testosterona ao estímulo com hCG (nível de testosterona maior ou igual a 160 ng/dL após a aplicação de hCG).

Tabela 1. Características clínicas dos 13 pacientes com anomalia da diferenciação sexual sem etiologia definida

	IDADE	EXAME FÍSICO	CARIÓTIPO	TESTE DO hCG testosterona após (ng/dL)	SEXO DE CRIAÇÃO	BIÓPSIA GONADAL
1	1a11m	Masc normal	46,XX/46,XY	<10	Masc	Não fez
2	3a8m	Ginecomastia	46,XY	Não fez	Masc	Não fez
3	4a6m	GA com gônadas palp.	46,XY	43,5	Masc	D e E- testículo
4	11a6m	Cripto bilateral	46,XY	76,5	Masc	D- testículo E- não fez
5	9a3m	GA	46,XY	110,0	Masc	Não fez
6	7a2m	Cripto bilateral e micropênis	46,XY	46,9	Masc	Não fez
7	8a1m	Cripto bilateral e hipospádia	46,XY	Não fez	Masc	Não fez
8	1a2m	GA com 1 gônada palp.	45,X/46,XY	Não fez	Masc	Não fez
9	9a10m	Cripto bilateral e micropênis	46,XY	33,6	Masc	Não fez
10	3m	GA sem gônadas palp.	46,XY	81,0	Masc	Não fez
11	4a3m	GA com 1 gônada palp	46,XY r(13)	Não fez	Masc	Não fez
12	8a4m	Cripto bilateral e hipospádia	46,XY inv 9	101,2	Masc	E- testículo e trompa uterina
13	3a8m	Cripto bilateral e hipospádia	46,XY	Não fez	Masc	Não fez

GA - genitália ambígua

r(13) - cromossomo 13 em anel

Tabela 2. Características clínicas dos sete pacientes com hermafroditismo verdadeiro

	IDADE	EXAME FÍSICO	CARIÓTIPO	TESTE DO hCG testosterona após (ng/dL)	SEXO DE CRIAÇÃO	BIÓPSIA GONADAL
1	13a6m	Cripto E, gineco- mastia aos 13 anos	46,XX	202,0	Masc	D- ovotéstis E- testículo
2	8a5m	GA sem gônadas palp.	46,XX	187,0	Fem	D-ovário E-ovotéstis
3	3m	GA sem gônadas palp	46,XX	325,0	Fem	D-ovário E-ovotéstis
4	14a4m	Cripto E micropênis	46,XX	103,0	Masc	D=E-ovotéstis
5	12a4m	GA sem gônadas palp.	46,XX	625,0	Fem	D=E-ovotéstis
6	6a6m	GA com 1 gônada palp.	46,XX	88,5	Fem	D-ovário E-ovotéstis
7	3a11m	GA sem gônadas palp.	46,XX/46,XY	115,0	Fem	D-ovário E-ovotéstis

GA - genitália ambígua

3.2. Métodos

Todos os pacientes foram submetidos a um teste de estímulo gonadotrófico, administrando-se a gonadotrofina humana da menopausa (hMG), composta por quantidades iguais de LH e FSH (Pergonal®, Serono, Brasil), na dose de 150 UI, por via intramuscular, durante três dias consecutivos.

Amostras de 8 mL de sangue foram coletadas no período da manhã, nos tempos: basal (B), 24 horas após a primeira dose (amostra 1 - A1) e 24 horas após a terceira dose (amostra 2 - A2) (Fig. 3). Após retração do coágulo, o sangue foi centrifugado, em temperatura ambiente, a 3000 rpm por 15 minutos e aliquoteado para quantificação de LH, FSH, testosterona, estradiol e Inibina A. O soro utilizado para a quantificação da inibina A ficou estocado em freezer a -20°C até a realização do ensaio. Com exceção da quantificação da inibina A, os outros hormônios determinados durante o teste fizeram parte da investigação rotineira dos casos incluídos no estudo.

O estradiol, o LH, o FSH e a testosterona foram determinados por ensaio imunofluorimétrico Auto DELFIA (Wallac, Inc., Turku, Finland). Os intervalos de confiança intra e inter-ensaio foram respectivamente 5,2 e 8,5%, 3,9 e 9,4%, 1,4 e 3,4% e 4,2 e 7,3%.

A inibina A foi quantificada no laboratório de Medicina Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, através da técnica descrita por Groome et al. em 1994, utilizando-se um ensaio imunoenzimático - ELISA (DSL-10-28100 Inhibin A ELISA, Webster, TX) que usa um anticorpo monoclonal contra a subunidade β A da inibina A aderido à placa e um segundo anticorpo monoclonal contra a subunidade α da inibina ligado à enzima peroxidase de rabanete.

Foram realizados dez ensaios e, em cada um, tanto a curva padrão quanto as amostras foram determinadas em duplicata. O coeficiente de correlação das curvas variou de 0,96 a 0,99.

Duplicatas das amostras foram repetidas quando apresentavam coeficiente de variação maior que 15%. Os coeficientes médios de variação intra e interensaio foram respectivamente de 6,2% e 7,8%.

As amostras foram lidas em uma leitora automática de microplacas (ELX 800 Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA) em uma absorbância de 450nm. Os resultados foram expressos em pg/mL. O limite de detecção do método é de 1 pg/mL para valores extrapolados.

Figura 3. Desenho do estudo

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq) sob o protocolo nº 190/03.

Todos os pais ou responsáveis assinaram o termo de consentimento informado, após leitura cuidadosa e esclarecimento de eventuais dúvidas.

O trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob o protocolo nº 04/02168-7.

3.3 Análise Estatística

As amostras que apresentaram concentrações hormonais abaixo do limite de detecção do método foram consideradas, para fins de cálculo estatístico, iguais a esse limite.

Foram utilizados testes não paramétricos por se tratar de uma amostra pequena e por se observar na literatura que os parâmetros estudados são analisados após transformação logarítmica, o que aponta para uma distribuição não paramétrica dos mesmos.

As diferenças entre as concentrações hormonais de cada grupo foram avaliadas pelo teste de Friedman. Comparações de níveis hormonais pareados antes, durante e após a administração de hMG foram feitas com o teste de Wilcoxon. Para a comparação de valores não pareados, ou seja, comparação da elevação dos níveis hormonais com o estímulo gonadotrófico entre os grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

A análise de correlação linear, utilizando-se o coeficiente de Pearson, foi usada para correlacionar os parâmetros testados.

Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Para a análise estatística, foi usado o programa SPSS versão 13.0 para Windows (SPSS, Inc. Chicago, IL).

4. RESULTADOS

Os pacientes foram divididos em quatro grupos: pacientes com hiperplasia congênita de supra-renal (HCSR, n=10), pacientes com criptorquidia isolada (Cripto, n=10), pacientes com anomalias da diferenciação sexual sem diagnóstico definido (pacientes sem diagnóstico, n=13) e paciente com hermafroditismo verdadeiro (HV, n=7).

4.1. GRUPO HCSR

O grupo de HCSR foi composto por 10 pacientes pré-puberes. Os resultados das dosagens hormonais deste grupo estão ilustrados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Evolução e mediana (M) de LH, FSH, testosterona e estradiol em pacientes com HCSR antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2)

	LH (U/L)			FSH (U/L)			Estradiol (pg/mL)			Testosterona (ng/dL)		
	B	A1	A2	B	A1	A2	B	A1	A2	B	A1	A2
1	<0,6	<0,6	<0,6	<1	10	17,4	<13	26,6	54,1	<14	65	49
2	<0,6	<0,6	<0,6	1,1	8,6	11,7	<13	22,4	95,5	<14	<14	<14
3	<0,6	0,7	0,7	<1	15,1	25,9	<13	20,1	119,1	<14	<14	<14
4	<0,6	<0,6	<0,6	<1	11,2	17,8	<13	72	228,9	<14	<14	<14
5	<0,6	<0,6	<0,6	<1	11,7	21	<13	47,1	368,2	<14	<14	<14
6	<0,6	<0,6	0,7	<1	9,5	17,6	<13	35,3	254,3	<14	<14	<14
7	<0,6	<0,6	0,7	<1	13,2	27,3	<13	<13	149,4	<14	<14	<14
8	<0,6	<0,6	<0,6	<1	8,4	13,6	<13	<13	60,7	<14	<14	27
9	<0,6	<0,6	1,1	1,8	9,8	13,5	28,8	103,6	400	32	34	51
10	<0,6	<0,6	<0,6	2,1	12,9	17,1	<13	39,7	160,7	<14	<14	<14
M	—	<0,6	<0,6	<1	10,6	17,5	<13	30,95	155,05	<14	<14	<14

Tabela 4. Evolução e mediana (M) de Inibina A em pacientes com HCSR antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2)

	INIBINA A (pg/mL)		
	B	A1	A2
1	<1	<1	43,19
2	1,92	<1	49,19
3	<1	12,27	68,31
4	<1	<1	138,30
5	<1	<1	153,33
6	<1	<1	76,28
7	<1	<1	72,58
8	<1	<1	20,36
9	<1	<1	141,80
10	<1	<1	45,92
M	<1	<1	70,45

O LH não mostrou diferença entre os tempos ($p=0,125$ entre os tempos B e A2).

O FSH mostrou diferença significativa entre todos os tempos ($p=0,005$) (Figura 4).

Figura 4. Evolução do FSH no grupo HCSR

O estradiol mostrou diferença entre todos os tempos ($p= 0,008$ entre B e A1 e $p= 0,002$ entre B e A2 e entre A1 e A2) (Figura 5).

A testosterona não mostrou diferença significativa entre B e A1($p=0,5$), entre B e A2 ($p=0,250$) ou entre A1 e A2 ($p= 0,750$).

A inibina A mostrou diferença entre os grupos A1 e A2 ($p=0,002$) e entre B e A2 ($p=0,002$), mas não após a primeira dose ($p= 1$) (Figura 6).

Figura 5. Evolução do estradiol no grupo HCSR

Figura 6. Evolução da inibina A no grupo HCSR

No grupo de pacientes com HCSR, no tempo A2, não houve correlação entre os valores de FSH e inibina A ($r=0,019$ e $p=0,959$) e entre FSH e estradiol ($r=0,128$ e $p=0,725$), observando-se apenas correlação entre os níveis de inibina A e estradiol ($r=0,892$ e $p=0,001$).

O menor nível de inibina A pós-estímulo em pacientes pré-puberes com HCSR foi de 20,36 pg/mL e a mediana foi de 70,44 pg/mL. Quanto ao estradiol, o menor valor foi de 54,1pg/mL e a mediana de 155,1pg/mL.

4.2. GRUPO CRIPTO

O grupo de pacientes com criptorquidia isolada foi composto por 10 pacientes pré-puberes. Os resultados das dosagens hormonais deste grupo estão ilustrados nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Evolução e mediana (M) de LH, FSH, testosterona e estradiol em 10 pacientes com criptorquidia antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2)

	LH (U/L)			FSH (U/L)			Estradiol (pg/mL)			Testosterona (ng/dL)		
	B	A1	A2	B	A1	A2	B	A1	A2	B	A1	A2
1	<0,6	<0,6	<0,6	<1	6,5	9,9	<13	18,7	<13	<14	<14	19,0
2	<0,6	0,70	<0,6	<1	15,3	17,3	<13	<13	<13	<14	<14	72,0
3	<0,6	<0,6	<0,6	<1	8,9	14,3	<13	<13	<13	<14	<14	17,0
4	<0,6	<0,6	<0,6	<1	9,8	15,9	<13	<13	<13	<14	<14	<14
5	<0,6	<0,6	<0,6	1,1	10,2	16,9	<13	<13	<13	<14	<14	16,0
6	<0,6	<0,6	<0,6	2,0	8,0	10,9	<13	<13	<13	<14	<14	<14
7	<0,6	<0,6	<0,6	<1	12,4	17,1	<13	<13	13,4	<14	<14	17,0
8	<0,6	<0,6	<0,6	<1	9,7	14,8	<13	<13	<13	<14	<14	<14
9	<0,6	<0,6	<0,6	<1	3,7	7,7	<13	<13	<13	<14	<14	<14
10	<0,6	<0,6	<0,6	<1	12,1	19,2	<13	<13	<13	<14	<14	57,0
M	___	<0,6	___	<1	9,75	15,35	___	<13	<13	___	___	16,5

Tabela 6. Evolução de Inibina A em 10 pacientes com criptorquidia antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2)

	INIBINA A (pg/mL)		
	B	A1	A2
1	<1	<1	<1
2	<1	<1	<1
3	<1	<1	<1
4	<1	<1	<1
5	<1	<1	<1
6	<1	<1	<1
7	<1	<1	<1
8	<1	<1	<1
9	<1	<1	<1
10	<1	<1	<1

O FSH mostrou diferença significativa entre todos os tempos ($p = 0,002$) (Figura 7).

Figura 7. Evolução do FSH no grupo Criptorquidia

O estradiol e o LH não foram diferentes nos 3 tempos.

A testosterona mostrou diferença entre os tempos B e A2 ($p=0,031$) e entre A1 e A2 ($p=0,031$). Os tempos B e A1 não foram diferentes ($p=1$).

Todos os pacientes com criptorquidia apresentaram níveis de inibina A abaixo do limite de detecção do método.

A inibina no tempo A2 dos pacientes com HCSR foi significativamente maior que dos pacientes com criptorquidia ($p<0,001$).

4.3. GRUPO PACIENTES SEM DIAGNÓSTICO

Este grupo foi composto por 13 pacientes com anomalia da diferenciação sexual sem diagnóstico definido. Os resultados das dosagens hormonais deste grupo estão ilustrados nas tabelas 7e 8.

Tabela 7. Evolução e mediana (M) de LH, FSH, testosterona e estradiol em pacientes com anomalia da diferenciação sexual sem etiologia definida antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2)

	LH (U/L)			FSH (U/L)			Estradiol (pg/mL)			Testosterona (ng/dL)		
	B	A1	A2	B	A1	A2	B	A1	A2	B	A1	A2
1	<0,6	<0,6	0,7	<1	15,2	23,4	<13	<13	<13	20,0	109,0	99,0
2	<0,6	<0,6	<0,6	<1	11,2	18,7	<13	<13	<13	<14	<14	93,0
3	<0,6	<0,6	<0,6	<1	10,1	11,7	<13	<13	<13	<14	<14	37,0
4	<0,6	<0,6	<0,6	<1	4,8	9,9	<13	<13	<13	<14	<14	<14
5	<0,6	<0,6	<0,6	<1	8,6	13,5	<13	<13	<13	57,0	43,0	43,0
6	<0,6	<0,6	0,7	<1	9,4	17,0	<13	<13	<13	<14	<14	<14
7	<0,6	<0,6	<0,6	<1	9,7	15,0	<13	<13	<13	<14	<14	19,0
8	<0,6	1,30	1,3	<1	25,9	37,3	<13	<13	<13	<14	<14	77,0
9	<0,6	<0,6	<0,6	<1	6,0	10,4	<13	<13	<13	<14	<14	<14
10	1,00	—	3,4	13,5	—	50,0	<13		<13	<14	—	<14
11	<0,6	0,90	0,8	1,7	14,0	25,7	<13	<13	<13	<14	<14	25,0
12	<0,6	<0,6	0,7	2,9	10,7	18,0	<13	<13	<13	<14	<14	41,1
13	<0,6	<0,6	<0,6	<1	8,7	13,1	<13	<13	<13	<14	<14	19,0
M	<0,6	<0,6	0,65	<1	9,9	17,0	—	—	—	<14	<14	25,0

Tabela 8. Evolução de Inibina A em pacientes com anomalia da diferenciação sexual sem etiologia definida antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2)

	INIBINA A (pg/mL)		
	B	A1	A2
1	<1	<1	<1
2	<1	<1	<1
3	<1	<1	<1
4	<1	<1	<1
5	<1	<1	<1
6	<1	<1	<1
7	<1	<1	<1
8	<1	<1	<1
9	<1	<1	<1
10	<1		<1
11	<1	<1	<1
12	<1	<1	<1
13	<1	<1	<1

O LH não foi diferente nos grupos pré e pós a 1ª dose de hMG ($p=0,50$), mas mostrou diferença entre os tempos B e A2 ($p=0,031$).

O FSH mostrou diferença entre os três tempos ($p<0,001$) (Figura 8).

A testosterona mostrou diferença entre os tempos B e A2 ($p=0,023$) e entre os tempos A1 e A2 ($p=0,039$), mas não após a 1ª dose ($p=1$).

O estradiol e a inibina não mostraram diferença entre os três tempos ($p=1$).

Figura 8. Evolução do FSH no grupo dos pacientes com anomalia da diferenciação sexual sem etiologia definida

4.4. GRUPO HV

Este grupo foi composto por sete pacientes com diagnóstico histológico de HV. Os resultados das dosagens hormonais deste grupo estão ilustrados nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Evolução e mediana (M) de LH, FSH, testosterona e estradiol em pacientes com HV antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2)

	LH (U/L)			FSH (U/L)			Estradiol (pg/mL)			Testosterona (ng/dL)		
	B	A1	A2	B	A1	A2	B	A1	A2	B	A1	A2
1	7,7	—	—	12,8	—	—	23,3	—	—	70,0	—	—
2	<0,6	<0,6	<0,6	1,7	10,8	15,4	<13	50,3	333,1	<14	<14	<14
3	1,6	2,3	1,0	1,4	27,0	40,1	<13	13,7	23,3	343,0	493,0	807,0
4	17,8	20,8	12,6	30,7	33,7	34,3	28,9	26,3	37,8	351,0	389,0	440,0
5	0,6	0,7	2,5	10,2	12,7	16,0	22,2	38,9	153,8	<14	<14	<14
6	0,7	<0,6	<0,6	<1	10,4	15,8	<13	<13	88,0	<14	<14	<14
7	<0,6	<0,6	<0,6	1,1	9,1	12,2	<13	23,8	97,3	<14	<14	<14
M	0,65	0,65	0,80	1,55	11,75	15,90	13,00	25,05	92,65	<14	<14	<14

Tabela 10. Evolução e mediana (M) de inibina A em pacientes com HV antes (B), 24 h após a 1ª dose (A1) e 24 h após a 3ª dose (A2)

	INIBINA A (pg/mL)		
	B	A1	A2
1	<1	—	—
2	<1	25,80	95,36
3	12,82	<1	20,00
4	<1	<1	23,86
5	<1	8,82	22,31
6	<1	<1	40,62
7	<1	20,3	146,64
M	<1	4,91	32,24

O paciente nº 1 foi excluído da análise estatística, pois não aplicou a medicação.

O LH não mostrou diferença ($p=0,875$)

O FSH mostrou diferença entre todos os tempos ($p=0,031$) (Figura 9).

Figura 9. Evolução do FSH no grupo HV

O estradiol mostrou diferença entre os tempos B e A2 e A1 e A2 ($p=0,031$), mas não após a 1ª dose ($p=0,188$) (Figura 10).

Figura 10. Evolução do estradiol no grupo HV

A testosterona não mostrou diferença ($p= 0,50$).

A inibina A mostrou diferença entre os tempos B e A2 e A1 e A2 ($p=0,031$), mas não após a 1ª dose ($p=0,375$) (Figura 11).

Figura 11. Evolução da inibina no grupo HV

Neste grupo de pacientes, no tempo A2, não houve correlação entre os valores de FSH e inibina A ($r=0,623$ e $p=0,186$), entre FSH e estradiol ($r=0,593$ e $p=0,215$) e entre os níveis de inibina A e estradiol ($r=0,401$ e $p=0,431$).

O menor nível de inibina A pós-estímulo em pacientes com HV foi de 20,0 pg/mL e a mediana foi de 32,24 pg/mL. O menor valor de estradiol foi de 23,3 pg/mL e a mediana de 92,65 pg/mL.

O incremento do FSH com o teste ($\Delta\text{FSHA2-FSHB}$) foi comparável nos quatro grupos ($p = 0,318$) (Figura 12).

Figura 12. Incremento do FSH ($\Delta\text{FSHA2-FSHB}$) nos quatro grupos (1-HCSR, 2-HV, 3-Pacientes sem diagnóstico e 4-Cripto)

A resposta de estradiol ($\Delta\text{EA2-EB}$) não mostrou diferença significativa entre os grupos HCSR e HV ($p=0,181$), assim como a resposta da inibina A entre esses dois grupos ($p=0,263$), mostrando estimulação ovariana semelhante nestes dois grupos (Figuras 13 e 14).

Figura 13. Comparação da resposta de estradiol (tempo A2-tempo B) nos grupos HCSR (1) e HV (2)

Figura 14. Comparação da resposta de inibina (tempo A2-tempo B) nos grupos HCSR (1) e HV (2)

Quatro pacientes relataram dor no local da aplicação e uma paciente apresentou telarca que regrediu após 15 dias do teste. Nenhum dos nossos pacientes apresentou a síndrome de hiperestimulação ovariana.

5. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços na investigação diagnóstica dos estados intersexuais, a nível molecular e bioquímico, uma proporção significativa de pacientes dentre os pseudo-hermafroditas masculinos (aproximadamente 30%) permanece sem etiologia definida. Nas outras classes diagnósticas, apesar de menor, há ainda um número importante de casos sem etiologia definida. Uma minoria destes pacientes acaba realizando biópsia gonadal a fim de esclarecer o diagnóstico, e mesmo quando fazem, é apenas de uma gônada ou de um fragmento desta, podendo não estabelecer o diagnóstico definitivo. Entre esses casos, pode haver pacientes com HV que precisariam retirar a gônada inteira para caracterizar a presença de tecidos ovariano e testicular.

Em uma revisão realizada na Austrália em que foram analisadas 51 crianças com genitália ambígua, os autores mostraram que 6% dos pacientes com cariótipo 46,XX ficaram sem diagnóstico final, em contraste com 34% dos pacientes com cariótipo 46,XY (Agha et al.,2001).

Dos nossos pacientes com anomalia da diferenciação sexual sem etiologia definida, onze tinham cariótipo 46,XY (84,6%) e dois apresentavam mosaicismos.

Provavelmente, a frequência de HV é subestimada em nosso meio. Dentre os pacientes acompanhados sem etiologia definida, certamente alguns são hermafroditas verdadeiros. Além disso, alguns pacientes são

erroneamente diagnosticados, como por exemplo, aqueles classificados como homens XX quando a biópsia não mostra tecido ovariano.

A dificuldade diagnóstica do hermafroditismo verdadeiro reside na necessidade da demonstração da presença de tecidos testicular e ovariano no mesmo indivíduo, uma vez que dados clínicos, hormonais e de imagem, não contribuem para este diagnóstico.

Alguns casos na literatura demonstram esta dificuldade. Walker et al. (2000) relataram um caso de ambigüidade genital notada ao nascimento, com falos de 1,5 cm, cariótipo 46,XX, gônada direita (D) palpável em bolsa labioescrotal, gônada esquerda (E) não palpável e com uretra na base do falos. A investigação revelou ausência de útero. Foi feito o diagnóstico de reversão sexual 46,XX e o registro foi feito no sexo masculino na primeira semana de vida. Aos dez meses, o paciente fez um genitograma que mostrou útero rudimentar e vagina, levando a realização de uma laparotomia que mostrou um ovário E histologicamente normal. A gônada D se revelou um ovotéstis disgenético.

Pires et al. (2005) descreveram um caso de um paciente de 21 anos, com ambigüidade genital, criado no sexo masculino, que começou a apresentar sangramentos vaginais cíclicos a partir da puberdade. Na investigação observou-se imagens sugestivas de ovário e de testículo em uma mesma gônada no US, levando à suspeita de HV, que foi confirmada em avaliação histológica posterior. Este achado é raro na literatura, pois a maioria dos trabalhos mostra que o US não é um bom método para caracterização da gônada.

O paciente número 1 da nossa casuística de hermafroditas verdadeiros foi criado no sexo masculino e apresentava apenas criptorquidia unilateral. Aos 13 anos evoluiu com ginecomastia bilateral. Na investigação apresentava cariótipo 46,XX e a biópsia revelou ovotéstis.

A ginecomastia é a manifestação mais importante no diagnóstico tardio do HV, pois pacientes que ficam sem diagnóstico e são criados como homens, não retiram a porção ovariana da gônada, cuja produção hormonal na época da puberdade, leva ao desenvolvimento mamário.

5.1. Caracterização da Casuística

O grupo controle neste estudo foi dividido de acordo com a presença ou ausência de tecido ovariano. Foram alvos do estudo dois grupos: aqueles pacientes em que a dúvida diagnóstica persistia mesmo após investigação e um outro grupo com diagnóstico histológico confirmado de hermafroditismo verdadeiro, para checar a resposta hormonal do ovário destes pacientes e para comparar esta resposta com aquela de pacientes que possuem ovários normais.

O grupo de pacientes com HCSR foi selecionado de forma que todas as pacientes fossem pré-puberes no momento da realização do teste, para que não houvesse influência dos hormônios puberais e assim, nós pudéssemos avaliar isoladamente a resposta ao estímulo aplicado.

O grupo de pacientes com criptorquidia isolada foi selecionado como um grupo controle negativo, pois possuem apenas tecido testicular, que, como já descrito na literatura, não produz inibina A.

Optamos por analisar a resposta encontrada em pacientes com anomalias da diferenciação sexual sem diagnóstico definido para tentar encontrar pacientes que possuíssem folículos ovarianos em suas gônadas, podendo assim, definir o diagnóstico de HV antes da exploração cirúrgica.

Este grupo foi composto por 13 pacientes, mas apenas três haviam realizado biópsia gonadal, que evidenciou tecido testicular.

Optamos por incluir estes três pacientes, mesmo com suas biópsias mostrando tecido testicular, porque esse diagnóstico pode não estar correto. Wiersma (2001), na África do Sul mostrou que 22% dos diagnósticos feitos a partir da biópsia de gônadas na sua casuística estavam incorretos.

Avaliamos também, sete pacientes com HV confirmados por estudo histológico. Seis destes apresentavam cariótipo 46,XX e um paciente apresentava mosaicismo. O mosaicismo apresentando por esse último (46,XX/46,XY) seria o cariótipo mais lógico de se encontrar em casos de HV, pois assim o paciente teria uma linha genética 46,XX que levaria ao desenvolvimento de ovário e uma outra linha genética 46,XY, que levaria ao desenvolvimento de testículo. No entanto, esse mosaicismo é pouco encontrado.

Nossos achados neste grupo são similares a outros relatos na literatura.

Brown e Warne, (2005) revisaram 283 casos de HV descritos na literatura e encontraram que 71% dos pacientes apresentavam cariótipo 46,XX, seguido por mosaicismos e por cariótipo 46,XY. A gônada mais frequentemente encontrada foi o ovotéstis, seguida por ovários, com testículos ocorrendo raramente. Como em nossos pacientes, a combinação ovário-ovotéstis foi a mais comum, seguida por ovotéstis bilateral. Na maioria dessas casuísticas o sexo de criação feminino teve uma leve preferência em relação ao masculino.

Damiani et al. (1997) relataram 16 casos de HV. Todos procuraram o serviço por ambigüidade genital. Metade dos pacientes apresentava cariótipo 46,XX. Treze gônadas eram palpáveis, sendo que destas, nove eram ovotéstis e quatro testículos. No estudo histológico, 59,3% das gônadas eram ovotéstis. A maioria dos pacientes foi criada no sexo feminino (62,5%).

Em outro relato, com 36 pacientes, Damiani et al. (2005) mostraram que 47,2% dos pacientes apresentavam cariótipo 46,XX, 27,8% mosaicismos variados e 25% cariótipo 46,XY. O ovotéstis foi a gônada mais encontrada (47%) e a maioria foi criada no sexo feminino (80%).

Em uma outra série de 22 pacientes com HV, 20 apresentavam ambigüidade genital, sendo que 21 pacientes tinham pelo menos uma gônada palpável. A maioria apresentou boa resposta de testosterona ao teste com hCG. Dezesete pacientes tinham cariótipo 46,XX e 29 gônadas eram ovotéstis. Oito pacientes foram criados como meninos (Hadjathanasiou et al., 1994).

Na Africa do Sul, onde a incidência de HV é a maior do mundo, foram avaliadas 71 crianças. Destas, 73% tinham ovotéstis e 80% cariótipo 46,XX (Wiersma, 2001).

A avaliação da função testicular em pacientes HV com cariótipo 46,XX é muito importante. Níveis basais de testosterona são informativos em crianças menores que seis meses. A estimulação com hCG para demonstrar a presença de atividade do tecido testicular é necessária apenas em crianças de mais idade. Entretanto, pode ocorrer a regressão progressiva da atividade das células de Leydig, levando a uma diminuição da resposta de testosterona com o avançar da idade.

Dos nossos sete pacientes, três apresentaram resposta subnormal de testosterona ao teste do hCG. Damiani et al. (1997) mostraram boa resposta de testosterona em apenas cinco de 11 pacientes testados. Estes dados demonstram que a presença de teste de hCG não responsivo não exclui HV, e que devemos procurar tecido ovariano em casos de pseudo-hermafroditismo masculino com ou sem uma boa resposta ao estímulo com hCG.

Há uma tendência de que pacientes com HV sejam criados no sexo feminino, com uma conduta conservadora em relação à preservação do tecido ovariano sempre que possível, pois parece que o tecido ovariano não apresenta problemas funcionais, a maioria das pacientes tem derivados müllerianos e há uma probabilidade razoável de que entrem na puberdade e eventualmente sejam férteis. Além disso, os procedimentos cirúrgicos para uma aparência feminina da genitália externa costumam obter um melhor resultado. (Yordam et al., 2001)

Assim, o diagnóstico de HV deve ser precoce para que a escolha seja feita corretamente. Como a caracterização do tecido testicular é bem estabelecida, quanto mais fácil for a caracterização do tecido ovariano, mais precoce será o diagnóstico.

5.2. Avaliação do Método

O estímulo gonadotrófico proposto foi baseado nos seguintes fatos: o tecido ovariano em crianças pré-púberes não produz hormônios sem estimulação; o estímulo do LH e do FSH associados é mais potente para a produção hormonal; e este estímulo possibilita a dosagem de um hormônio exclusivamente produzido pelo ovário, como é o caso da inibina A, facilitando o diagnóstico das anomalias de diferenciação sexual.

O FSH é o componente fundamental do controle do crescimento e maturação de folículos desde os estágios iniciais de desenvolvimento. Ele também estimula a aromatase presente nas células da granulosa que catalisa a conversão de andrógenos a estrógenos.

O LH tem um papel crítico nos eventos fisiológicos que levam ao desenvolvimento de um folículo pré-ovulatório dominante. Sob a estimulação do LH, as células da teca produzem andrógenos que são transferidos para as células da granulosa e transformados em estrógenos pela aromatase.

Na fase folicular, o FSH estimula a expressão de receptores de LH nas células da granulosa (ação facilitada pelo estrógeno). Assim nas ultimas fases do desenvolvimento folicular, as células da granulosa se tornam receptivas ao

estímulo de LH e este se torna capaz de exercer suas ações tanto nas células da teca quanto nas da granulosa. A maioria das ações do FSH nas células da granulosa, incluindo a ativação da aromatase, pode ser exercida pelo LH desde que seus receptores estejam expressos (Filicori et al., 2001).

O ovário da criança possui folículos latentes e o estímulo gonadotrófico é capaz de estimular as células ovarianas para a produção de estradiol e inibinas A e B, em níveis semelhantes aos encontrados em mulheres adultas durante o ciclo menstrual.

Estudos *in vitro* sugerem que a secreção de inibina A é dependente de gonadotrofinas. Tanto o LH quanto o FSH estimulam a expressão e a secreção de inibina A a partir de células da granulosa imatura de ratos, primatas e humanos (Lanuza et al., 1999).

Em folículos antrais pequenos, o LH sozinho não estimula a secreção da inibina A. A aplicação concomitante de FSH leva a um aumento do estradiol e da inibina A. No folículo pré-ovulatório, que já está sob um estímulo gonadotrófico mais prolongado, uma única dose de LH ou FSH leva a um aumento de estradiol e inibina A (Welt et al., 2001).

O estudo da estimulação fisiológica das inibinas pelas gonadotrofinas é limitado na maioria dos estudos *in vivo*, devido ao uso do FSH exógeno que pode acelerar a maturação folicular normal. O padrão de secreção das inibinas A e B durante o ciclo menstrual sugere que em condições fisiológicas há uma diferença na espécie de inibina secretada dependente do estímulo gonadotrófico, com estimulação da inibina B pelo FSH, durante o início da fase folicular e estimulação da inibina A tanto pelo FSH quanto pelo LH, durante o final da fase folicular (Welt et al., 1999).

A administração do antagonista do GnRH durante a fase lútea em mulheres normo-ovulatórias leva a uma diminuição dos níveis de inibina. A administração concomitante de FSH pode não restaurar os níveis de inibina A, enquanto a administração simultânea de hCG traz os níveis de inibina A para o normal, sugerindo que a secreção de inibina A durante a fase lútea é dependente tanto de FSH quanto de LH (Laven e Fauser, 2004).

Hohmann et al. (2005) demonstraram que o estímulo exógeno é mais potente que o estímulo fisiológico do ciclo menstrual. A administração de gonadotrofinas levou a um aumento significativamente maior das inibinas A e B, estradiol e do FSH, quando comparados aos níveis hormonais do ciclo menstrual natural.

Embora não haja estudos com estímulo gonadotrófico em crianças para a dosagem de inibina A, vários autores têm descrito um aumento dos níveis de inibinas após a administração exógena de gonadotrofinas para indução de ovulação. Informações mais detalhadas vieram de estudos que fazem um *down-regulation* hipofisário com o análogo do GnRH antes do estímulo com as gonadotrofinas para a fertilização *in vitro*, pois desta forma, cria-se um ambiente para avaliação do impacto da aplicação de FSH e LH sobre as inibinas. Este modelo simula o que ocorre nos nossos pacientes, uma vez que com o bloqueio há queda dos hormônios a níveis semelhantes aos de crianças pré-púberes e após, aumento dos hormônios em resposta ao estímulo gonadotrófico aplicado (Burger et al., 1998; Lockwood et al., 1996; Yong et al., 2003).

Welt et al. (2001) aplicaram estímulo com FSH recombinante em 29 mulheres com supressão do eixo após a aplicação do análogo do GnRH, e concluíram que a inibina A é estimulada em estágios mais avançados de desenvolvimento folicular e se torna a principal forma de inibina secretada no folículo pré-ovulatório em resposta tanto ao FSH como ao LH. Eles demonstraram, também, que o FSH estimula a secreção de inibinas A e B durante a fase folicular inicial, quando pequenos folículos antrais estão presentes, e que tanto o FSH quanto o LH estimulam a secreção da inibina A em folículos pré-ovulatórios.

Além da resposta de inibina, avaliamos também o aumento do estradiol em resposta ao estímulo.

No estudo de mulheres durante o ciclo menstrual, os níveis de estradiol apresentaram uma tendência a aumento após o pico de FSH, e os níveis dobraram três dias após o pico de FSH, quando comparados aos níveis dois dias antes deste pico (Sehested et al., 2000).

A dosagem de estradiol após estímulo gonadotrófico em crianças foi realizada por Mendez et al. (1998). Esses autores avaliaram 11 pacientes com ambigüidade genital e quatro pacientes 46,XY com criptorquidia, como controles. Todos os pacientes foram submetidos a um teste com hMG, na dose de 4U/kg/dia por sete dias ou até o estradiol alcançar 80pg/mL. Se isso não acontecesse, a dose era dobrada por mais sete dias. Dos quinze pacientes testados neste estudo, cinco apresentaram uma resposta positiva entre o 6º e o 10º dia, os demais não responderam ao estímulo. Posteriormente, os pacientes que responderam ao estímulo tiveram o diagnóstico de HV confirmado pelo estudo histológico.

Filicori et al. (2001) compararam a eficácia da aplicação de hMG com a de FSH altamente purificado em 50 mulheres adultas submetidas à reprodução assistida após a aplicação de análogo de GnRH. As dosagens de FSH, inibina A e inibina B não mostraram uma diferença significativa entre os dois grupos de tratamento. Por outro lado, o uso concomitante de LH e FSH levou a um maior aumento de estradiol quando comparado ao uso isolado de FSH, sugerindo maior disponibilidade local de substrato androgênico nessas pacientes devido ao uso do LH e/ou estimulação direta da aromatase através de receptores de LH nas células da granulosa de folículos maiores.

Assim, como a literatura mostra que a secreção de inibina A é mais tardia no ciclo menstrual e é dependente da secreção tanto de FSH quanto de LH e que a associação destas leva a uma maior secreção de estradiol, optamos por aplicar a gonadotrofina humana da menopausa, que é uma combinação de quantidades iguais de LH e FSH, para que o estímulo do ovário infantil fosse mais completo.

A dose fixa de 150 U de hMG por dia foi escolhida pois é a dose mais utilizada na literatura para a estimulação folicular e indução de ovulação, embora seja usada por um período mais prolongado. Estudos mostram que a resposta hormonal ao estímulo é dose dependente. Eldar-Geva et al. (2000) fizeram estímulo com 100U e 200U de FSH recombinante em mulheres adultas pós-supressão com análogo de GnRH. A inibina A aumentou significativamente e de forma dose-dependente, principalmente após o 4º dia.

Optamos por estimular por três dias, pois os estudos com estimulação gonadotrófica pós-supressão do eixo com análogo do GnRH mostraram um aumento significativo dos hormônios no 4º dia de estudo. (Eldar-Geva et al., 2000) Em mulheres adultas no início da fase folicular do ciclo menstrual, Burger et al. (1998) demonstraram que houve um aumento significativo de inibina A 36 horas após a aplicação de apenas uma dose de FSH.

5.3. Avaliação do resultado do teste de estímulo com hMG

A aplicação de hMG em pacientes com HCSR objetivou mostrar a resposta do teste em crianças pré-púberes com ovários normais, e, com esse resultado, ter um parâmetro de normalidade para poder comparar com os valores obtidos em pacientes com anomalias da diferenciação sexual.

Com a aplicação da hMG, todos os pacientes dos quatro grupos apresentaram um aumento progressivo do FSH, mostrando que sua vida média era superior a 24 horas. Não houve aumento correspondente do LH, muito provavelmente porque talvez sua vida média seja menor (Griffin e Ojeda, 2004). Mesmo sem este aumento de LH, o fato da testosterona, nos pacientes com criptorquidia, elevar-se significativamente após o 3º dia de aplicação, demonstra nítido estímulo das células de Leydig.

No grupo de pacientes com HCSR, o estradiol mostrou uma resposta significativa com a aplicação de três doses consecutivas de hMG, sendo esta resposta já notada após a 1ª dose, mostrando que uma dose de

gonadotrofinas já é suficiente para estimular a produção de estradiol pelo ovário infantil.

Entretanto, para o diagnóstico da presença de tecido ovariano, utilizamos a resposta do estradiol após a 3ª dose de hMG pois, mesmo que estatisticamente tenha havido um aumento do estradiol após a 1ª dose de hMG, não foram todas as pacientes que responderam neste momento.

No 4º dia do estudo realizado por Mendez et al. (1998), o que corresponde ao nosso ultimo dia de coleta, os cinco pacientes que responderam ao estímulo (estradiol acima de 80 pg/mL em torno do 10º dia), apresentavam níveis de estradiol de 30 a 68 pg/mL. Os pacientes que não responderam até o final do teste, apresentavam níveis de estradiol abaixo de 20 pg/mL.

Comparando esses achados com os nossos, vemos que no 4º dia do nosso estudo (após a aplicação das três doses) o estradiol das pacientes do grupo controle (HCSR) variou de 54,1 a 400 pg/mL, sendo que apenas duas pacientes apresentavam valores abaixo de 80 pg/mL, que foi o nível de corte utilizado no estudo de Mendez et al.(1998). No nosso grupo de pacientes com HV, o estradiol após o estímulo, variou de 23,3 a 333,1 pg/mL e, também, apenas duas pacientes apresentaram níveis menores que 80 pg/mL no 4º dia de estudo. Provavelmente, se o nosso estímulo fosse mais prolongado, atingiríamos um valor de estradiol acima de 80 pg/mL em todas as pacientes, à semelhança do demonstrado por Mendez et al. (1998).

A testosterona não mostrou resposta significativa no grupo de pacientes com HCSR. Apenas a paciente nº 9 apresentou uma testosterona mais elevada devido a um pior controle da doença de base.

A inibina A apresentou resposta estatisticamente significativa apenas após a 3ª dose, mostrando que este é um estímulo mais prolongado e que depende de um desenvolvimento e diferenciação maior dos folículos ovarianos. A aplicação de uma dose não é suficiente para mostrar este aumento.

Este achado é compatível com trabalhos da literatura que estudam a secreção hormonal na puberdade e durante o ciclo menstrual, onde os níveis de inibina A apresentam um aumento mais tardio em relação ao estradiol, levando-se em conta o início da estimulação de gonadotrofinas (Sehested et al., 2000).

Baseados em nossos resultados nas pacientes com HCSR, consideramos que o nível de corte de inibina A, para demonstrar a presença de ovário após estímulo gonadotrófico, é de 20,0 pg/mL e de estradiol de 54,0 pg/mL. A mediana de inibina A após o estímulo foi de 70,45 pg/mL e do estradiol de 155,05 pg/mL.

O nosso nível de corte de inibina A é maior que a mediana encontrada por Sehested et al. (2000) em meninas no estágio Tanner V de puberdade (11,5 pg/mL). O estradiol encontrado pelos autores nesta fase foi de 49,5 pg/mL.

Durante o ciclo menstrual, níveis de inibina A são mais baixos no início da fase folicular (mediana: 9 pg/mL), aumentam significativamente no final da fase folicular (mediana: 22 pg/mL) e continuam aumentando durante a fase periovulatória (mediana: 43 pg/mL), atingem o pico no meio da fase lútea (mediana: 52 pg/mL) e caem significativamente no final da fase lútea (mediana: 15,5 pg/mL). Comparando os nossos achados com esses dados, podemos

dizer que o estímulo aqui utilizado levou a níveis de inibina A mais altos que aqueles encontrados em mulheres adultas durante o ciclo menstrual.

Em relação aos valores de estradiol encontrados neste estudo, a nossa mediana é comparável a mulheres adultas no final da fase folicular (mediana de 115,7 pg/mL) (Sehested et al., 2000).

Burger et al. (1998) demonstraram que com uma dose 100UI de FSH aplicada entre o 3º e o 5º dia do ciclo menstrual, a inibina A aumentou de 9,9 para 20,6 pg/mL e com 200UI de FSH, a inibina A aumentou de 13,5 para 35,9 pg/mL.

Os valores obtidos nesse estudo, após apenas uma dose de FSH, devem-se ao fato das pacientes serem adultas e estarem no início da fase folicular do ciclo menstrual, sendo assim há uma soma do estímulo gonadotrófico fisiológico com o farmacológico. Embora os níveis de inibina A nesta fase do ciclo menstrual sejam baixos, Schneyer et al. (2000) demonstraram a presença de inibina A em aspirado de folículos pequenos (até 6 mm), mesmo antes que aumentos significativos de estradiol sejam detectados.

Trabalhos que comparam o tamanho do folículo com a sua secreção hormonal mostram que folículos pequenos não secretam inibina A e que é necessário um certo aumento do folículo para que haja essa secreção. Há, no entanto, controvérsias em relação ao tamanho do folículo capaz de secretar inibina A. Welt et al. (2001) apresentaram um estudo onde a inibina A se tornou detectável quando os folículos alcançaram um diâmetro de 6 a 9 mm. Já em outro estudo os autores referem que a inibina A não é detectável

até que os folículos atinjam 14 mm (Welt et al., 1999). Hohmann et al. (2005) mostraram um aumento da inibina A apenas quando foi detectado um folículo de 15 mm ou mais durante o final da fase folicular.

Três das nossas pacientes com HCSR realizaram US antes e após a aplicação de hMG. As três apresentavam pequenos folículos antes do estímulo e após os folículos variaram de 13 a 18 mm, mostrando que com o estímulo aplicado, independente dos critérios utilizados na literatura, os folículos ovarianos atingiram tamanho compatível com a produção e secreção da inibina A e de estradiol.

Os pacientes com criptorquidia isolada, mesmo com uma elevação de LH/FSH comparável a de pacientes com HCSR, não apresentaram resposta de estradiol e inibina A, ficando abaixo do limite de detecção do método em todos os pacientes após três dias de estímulo, concordando com a literatura mundial que mostra que a inibina A não é detectável em homens (Byrd et al., 1998; Crofton et al., 1997; Lahlou e Roger, 2004; Raivio e Dunkel, 2002).

O grupo de pacientes com anomalia da diferenciação sexual sem etiologia definida apresentou uma resposta semelhante aos pacientes com criptorquidia isolada, mostrando que nestes pacientes não havia presença de tecido ovariano.

Provavelmente, se aumentarmos a casuística certamente poderemos encontrar pacientes com HV em meio aos pacientes que estão sem diagnóstico definido.

A resposta encontrada nos pacientes com HV foi semelhante àquela apresentada pelos pacientes com HCSR, mostrando que o teste é

comparável nos dois grupos. Embora a mediana da inibina A após o estímulo (32,24 pg/mL) no grupo HV ser menor que a do grupo HCSR, não houve diferença significativa dos níveis entre os dois grupos. O mesmo ocorre com os níveis de estradiol.

Em nosso estudo, com um estímulo mais curto em relação ao realizado por Mendez et al. (1998), o valor de corte de estradiol para mostrar a presença de ovário em pacientes com HV foi de 23,3 pg/mL, pois todos os pacientes que apresentaram níveis acima deste valor, tinham tecido ovariano confirmado por exame anátomo-patológico.

As pacientes que apresentaram a maior e a menor resposta do estradiol e da inibina A apresentavam ovotéstis unilateral associado a um ovário, mostrando que não houve correlação da resposta hormonal com a histologia gonadal.

O paciente nº 1 possui apenas valores hormonais basais, pois não aplicou a medicação (hMG) e quando reconvocado, já havia retirado a porção ovariana do ovotéstis. O valor basal do estradiol era de 23,3 pg/mL, já acima do limite de sensibilidade do método e maior que os níveis após estímulo dos 10 pacientes com criptorquidia usados como controle negativo. A dúvida diagnóstica ficou entre homem XX e HV. Muito provavelmente este paciente responderia positivamente ao teste e obteríamos o diagnóstico antes do procedimento cirúrgico.

A paciente nº 3 fez o teste com 3 meses de vida, fase em que apresentava níveis basais altos de testosterona, com um aumento importante após a aplicação das gonadotrofinas. No estudo histológico a

paciente apresentava ovotéstis associado a ovário. Foi retirada a porção testicular do ovotéstis e a paciente repetiu o teste que evidenciou uma testosterona <14 ng/dL após o 3º dia de estímulo.

O paciente nº 4 foi criado como menino, apresenta ovotéstis bilateral e fez o teste do hCG antes do início da puberdade, com resposta parcial. O teste com hMG foi realizado com o paciente já em puberdade e evidenciou uma testosterona basal em níveis de puberdade normal.

Neste grupo de pacientes com HV, houve um aumento de estradiol e inibina A com o estímulo gonadotrófico, mas não houve correlação estatística entre os níveis hormonais. Provavelmente isto se deve ao pequeno número de pacientes em diferentes estádios puberais ou poderia ocorrer mesmo se aumentássemos a casuística, uma vez que cada ovário responde com uma intensidade diferente ao estímulo gonadotrófico.

5.4. Avaliação das correlações hormonais

Dados de correlação entre concentrações hormonais não implicam em uma relação causa-efeito, mas são interessantes para determinar se existe alguma relação.

No grupo de pacientes com HCSR não houve correlação estatística entre o FSH e o estradiol, muito provavelmente porque a paciente que apresentou o FSH mais alto (27,3U/L – paciente 7) não é a mesma paciente que apresentou o estradiol mais alto após o estímulo (400pg/mL –

paciente 9). Porém há uma correlação clara entre o aumento de FSH e o aumento de estradiol. O mesmo acontece com a inibina A.

Há evidências em mulheres adultas que sugerem que não é o nível de FSH circulante por si que é crítico para o crescimento do folículo e para a produção hormonal, mas sim, a duração desta elevação (Crofton et al., 2002).

Por outro lado, há uma correlação positiva entre o estradiol e a inibina A, pois o estímulo na célula da granulosa para os dois hormônios é o mesmo, independente do valor absoluto de FSH dosado. A correlação entre a inibina A e o estradiol também pode se dever ao fato de que a inibina A exerce uma ação parácrina no ovário, estimulando a produção de estradiol via aumento de andrógenos. Além disso, outros estudos mostraram que o estradiol aumenta a secreção da inibina A estimulada pelo FSH em células granulosas de folículos imaturos em primatas (Welt et al., 1999). Nosso achado é semelhante aos de outros autores.

Foster et al. (2000) demonstraram uma correlação positiva entre concentração de inibina A e estradiol, mas não da inibina A com o FSH em um estudo com meninas em diferentes fases de puberdade e mulheres na fase folicular do ciclo menstrual.

Bergadá et al. (2001) notaram que durante os dois primeiros meses de vida na menina, apesar de apresentarem níveis altos de inibina A e FSH, não se observa uma correlação positiva entre estes hormônios. Eles concluem que esta falta de correlação pode se dever à variabilidade intensa de secreção de gonadotrofinas que é observada em meninas desta idade.

Sehested et al. (2000) notaram que no início da puberdade a correlação da inibina A com o LH é mais forte do que com o FSH, mostrando que o evento mais precoce e significativo da puberdade é o aumento da secreção de LH. Com a evolução da puberdade, esta correlação positiva do FSH com a inibina A se perde. Houve uma correlação positiva entre a inibina A e o estradiol a partir de estágio III de puberdade.

A relação do estradiol com a inibina A é bem estabelecida na literatura, independente do estímulo gonadotrófico aplicado (Burger et al., 1998; Crofton et al., 1997; Welt et al., 1999).

Outros trabalhos mostram uma correlação positiva entre o FSH e a inibina A e/ou o estradiol.

Provavelmente, Crofton et al. em 1997 encontraram uma correlação positiva entre a inibina A e o FSH durante o início da puberdade, pois eles não aplicaram estímulo farmacológico e trabalharam com os níveis fisiológicos da evolução da puberdade, que são mais baixos, não forçando os folículos a uma produção exagerada de hormônios.

Em outro estudo mais ampliado, realizado em 2002, Crofton et al. também demonstraram uma correlação positiva do FSH com a inibina A em meninas pré-puberes, mas essa correlação não se manteve em meninas com estádios puberais M3 a M5. Nos estádios M1 e M2, o estradiol era muito baixo para fazer correlações, mas nos estádios M3 a M5 o estradiol mostrou uma correlação positiva com a inibina A e o FSH.

5.5. Perspectivas Futuras

Bergadá et al. (2002) avaliaram o comportamento das inibinas em um estudo retrospectivo com soro de 31 meninas de 4 a 65 dias de vida, divididas em três grupos conforme a idade e demonstraram que quanto mais nova a paciente, maior o valor de inibina A. Durante as duas primeiras semanas de vida, a inibina A encontrada foi de 79 ± 12 pg/mL, caindo progressivamente para $47,9 \pm 11$ no segundo mês de vida. Após o sexto mês, os níveis de inibina A são indetectáveis, permanecendo assim até a puberdade.

Os autores concluíram que a concentração sérica de inibina A tende a cair progressivamente durante o 2º mês de vida. Os níveis observados foram mais altos que durante a puberdade e tão altos quanto aqueles observados durante a fase lútea do ciclo menstrual (Bergadá et al, 2002).

Em um outro estudo realizado na Dinamarca com dosagem de inibina A em 204 meninas com três meses de idade, os autores encontraram níveis detectáveis em apenas 6% das pacientes. Muito provavelmente, os autores encontraram uma positividade baixa, porque, como visto no estudo de Bergadá et al. (2002), a inibina A cai progressivamente nos dois primeiros meses e talvez se a coleta fosse mais precoce, os valores seriam mais altos (Chellakooty et al, 2003).

Das nossas pacientes pré-puberes com HCSR, nenhuma teve nível de inibina A detectável no tempo basal, mas uma paciente do grupo com HV, que tinha três meses no momento da coleta, apresentou inibina A de 12,82 pg/ml, reforçando essa idéia.

A presença de níveis elevados de inibina A na circulação nos primeiros dois meses de vida reflete um grau avançado de maturação e diferenciação das células da granulosa após o nascimento. Nesta idade, devido ao estímulo gonadotrófico que ocorre com a queda abrupta de esteróides sexuais de origem placentária, são notados vários estágios de desenvolvimento folicular. Estudos morfológicos de ovários durante o período neonatal mostram a coexistência de folículos pré-antrais, antrais e folículos císticos, alguns já com sinais de atresia (Bergadá et al, 2002; Raivio e Dunkel, 2002).

Nesta idade, nem todas as pacientes apresentam níveis detectáveis de estradiol, provavelmente porque os ensaios utilizados têm uma baixa sensibilidade e não detectam variações modestas ou transitórias de níveis de estradiol. Assim, a dosagem de inibina A nos dois primeiros meses de vida pode ser uma arma diagnóstica para a presença de ovário, particularmente quando ensaios altamente sensíveis e específicos para o estradiol não estiverem disponíveis.

Nós sugerimos a dosagem de inibina A em pacientes no período neonatal com ambigüidade genital. Além de ser mais fisiológico que o estímulo com gonadotrofinas exógenas, os níveis encontrados por Bergadá et al. durante as duas primeiras semanas de vida (79 ± 12 pg/mL) são semelhantes aos valores que encontramos após a 3ª dose em nossas pacientes com HCSR (mediana de 70,45 pg/mL).

Desta forma, inferimos que a dosagem de inibina A, nos primeiros dois meses de vida, é útil para o diagnóstico da presença de tecido ovariano e se assemelha ao teste de estímulo gonadotrófico realizado neste estudo.

5.6. Considerações finais

O teste de estímulo com hMG se mostrou útil para o diagnóstico de tecido ovariano. Desta forma acreditamos que pacientes diagnosticados como PHM podem, na verdade, ser HV e só serem identificados com o teste proposto, visto que a biópsia pode não obter fragmento diagnóstico.

Acreditamos que se nós aumentarmos nossa casuística, faremos diagnóstico de HV em pacientes onde a investigação diagnóstica for inconclusiva e este achado pode modificar em muito, tanto a conduta inicial quanto o prognóstico do paciente.

6. CONCLUSÕES

O estímulo com LH/FSH mostrou-se útil e eficiente na demonstração da presença de tecido ovariano.

O método pode ser usado para a identificação de hermafroditismo verdadeiro, antes do procedimento cirúrgico, o que permite uma melhor programação cirúrgica.

Apesar de não termos identificado hermafroditas verdadeiros nos pacientes com anomalia da diferenciação sexual sem etiologia definida, o método se mostra útil para tentar diagnosticar esta condição e permitir um planejamento terapêutico mais adequado.

A resposta de Inibina A e de Estradiol 24h após a primeira administração de gonadotrofinas não permite a constatação de tecido ovariano, sendo necessário o prosseguimento do teste por três dias.

Tanto as respostas de Inibina A quanto de Estradiol permitiram, com o teste aplicado, reconhecer a presença de tecido ovariano.

7. REFERÊNCIAS

Agha AA, Thomsett MJ, Batch JA. The child of uncertain sex: 17 years of experience. *J Paediatr Child Health*. 2001;37:348-51.

Bergadá I, Ballerine GM, Ayuso S, Groome NP, Bergada C, Campo S. High serum concentrations of dimeric inhibins A and B in normal newborn girls. *Fertil Steril*. 2002;77:363-5.

Bergadá I, Bergada C, Campo S. Role of inhibins in childhood and puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2001;14:343-53.

Biswas K, Kapoor A, Karak AK, Kriplani A, Gupta DK, Kucheria K, Ammini A. Imaging in intersex disorders. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2004;17:841-5.

Brown J, Warne G. Practical management of the Intersex Infant. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2005;18:3-23.

Burger HG, Groome NP, Robertson DM. Both inhibin A and B respond to exogenous follicle-stimulating hormone in the follicular phase of the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:4167-9.

Byrd W, Bennett MJ, Carr BR, Dong Y, Wians F, Rainey W. Regulation of biologically active dimeric inhibin A and B from infancy to adulthood in the male. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:2849-54.

Chellakooty M, Schmidt M, Haavisto M, Boisen KA, Damgaard IN, Mau C, Petersen JH, Juul A, Skakkebaek NE, Main KM. Inhibin A, Inhibin B, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and sex hormone-binding globulin levels in 473 healthy infant girls. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:3515-20.

Crofton PM, Evans AEM, Groome NP, Taylor MRH, Holland CV, Kelnar CJH. Dimeric inhibins in girls from birth to adulthood: relationship with age, pubertal stage, FSH and oestradiol. *Clin Endocrinol*. 2002;56:223-30.

Crofton PM, Illingworth PJ, Groome NP, Stirling HF, Swanston I, Gow S, Wu FCW, McNeilly A, Kelnar CJH. Changes in dimeric inhibin A and B during normal early puberty in boys and girls. *Clin Endocrinol*. 1997;46:109-14.

Damiani D, Fellous M, McElreavey K, Barboux S, Barreto ES, Dichtchekian V, Setian N. True hermaphroditism: clinical aspects and molecular studies in 16 cases. *Eur J Endocrinol*. 1997;136:201-4.

Damiani D, Guedes DR, Damiani D, Setian N, Maciel-Guerra AT, Mello MP, Guerra-Junior G. Hermafroditismo verdadeiro: experiência com 36 casos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2005;49:71-8.

Eldar-Geva T, Robertson DM, Cahir N, Groome N, Gabbe MP, Maclachlan V, Healy DL. Relationship between serum inhibin A and B and ovarian follicle development after a daily fixed dose administration of recombinant follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:607-13.

Filicori M, Cognigni GE, Taraborrelli S, Spettoli D, Ciampaglia W, Tabarelli Fatis C, Pocognoli P, Cantelli B, Boschi S. Luteinizing hormone activity in menotropins optimizes folliculogenesis and treatment in controlled ovarian stimulation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:337-43.

Foster CM, Olton PR, Padmanabhan V. Diurnal changes in FSH-regulatory peptides and their relationship to gonadotrophins in pubertal girls. *Hum Reprod*. 2005;20:543-8.

Foster CM, Phillips DJ, Wyman T, Evans LW, Groome NP, Padmanabhan V. Changes in serum inhibin, activin and follistatin concentrations during puberty in girls. *Hum Reprod*. 2000;15:1052-7.

Griffin JE. Male reproductive function. In: Griffin JE, Ojeda SR. *Textbook of endocrine physiology*. 5th ed. Oxford: Oxford University Press; 2004. p.226-48.

Groome NP, Evans LW. Does measurement of inhibin have a clinical role? *Ann Clin Biochem*. 2000;37:419-31.

Groome NP, Illingworth PJ, Cookel, Ganesan TS, Baird DT, Mcneilly AS. Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin Endocrinol*. 1994;40:717-23.

Hadjiathanasiou CG, Brauner R, Lortat-Jacob S, Nivot S, Jaubert F, Fellous M, Nihoul-Fekete C, Rappaport R. True hermaphroditism: genetic variants and clinical management. *J Pediatr*. 1994;125:738-44.

Hohmann FP, Laven JSE, Jong FH, Fauser BCJM. Relationship between inhibin A and B, estradiol and follicle growth dynamics during ovarian stimulation in normo-ovulatory women. *Eur J Endocrinol*. 2005;152:395-401.

Krstić ZD, Smoljanić Z, Vukanić D, Varinac D, Janjić G. True hermaphroditism: 10 years' experience. *Pediatr Surg Int*. 2000;16:580-3.

Lahlou N, Roger M. Inhibin B in pubertal development and pubertal disorders. *Semin Reprod Med*. 2004;22:165-75.

Lanuza GM, Groome NP, Baranao JL, Campo S. Dimeric inhibin A and B production are differentially regulated by hormones and local factors in rat granulosa cells. *Endocrinology*. 1999;140:2549-54.

Laven JSE, Fauser BCJM. Inhibins and adult ovarian function. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;225:37-44.

Lockwood GM, Muttukrishna N, Groome NP, Knight PG, Ledger WL. Circulating inhibins and activin A during GnRH-analogue down-regulation and

ovarian hyperstimulation with recombinant FSH for in-vitro fertilization-embryo transfer. *Clin Endocrinol*.1996;45:741-8.

MacLaughlin DT, Donahoe PK. Sex determinations and differentiation. *N Engl J Med*. 2004;350:367-78.

Mendez JP, Schiavon R, Diaz-Cueto L, Ruiz AI, Canto P, Soderlund D, Diaz-Sanchez V, Ulloa-Aguirre A. A reliable endocrine test with human menopausal gonadotropins for diagnosis of true hermaphroditism in early infancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:3523-6.

Moses DM, Litmanovitch T, Rienstein S, Meyerovitch J, Goldman B, Goldring AA. True Hermaphroditism with ambiguous genitalia due to a complicated mosaic karyotype: clinical features, cytogenetic findings and literature review. *Am J Med Genet*. 2003;116A:300-3.

Ogilvy-Stuart AL, Brain CE. Early assessment of ambiguous genitalia. *Arch Dis Child*. 2004;89:401-7.

Pangas SA, Woodruff TK. Activin Signal Transduction Pathways. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11:309-14.

Pires CR, Poli AHM, Zanforlin Filho SM, Mattar R, Moron AF, Diniz ALD. True hermaphroditism: the importance of ultrasonic assessment. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005;26:86-8.

Raivio T, Dunkel L. Inhibins in childhood and puberty. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2002;16:43-52.

Robertson DM, Cahir N, Findlay JK, Burger HG, Groome N. The biological and immunological characterization of inhibin A and B forms in humans follicular fluid and plasma. *J Clin Endocrinol Metab*.1997;82:889-96.

Secaf E, Hricak H, Gooding CA, Ho VW, Gorczyca DP, Ringertz H, Conte FA, Kogan BA, Grumbach MM. Role of MRI in the evaluation of ambiguous genitalia. *Pediatr Radiol*. 1994;24:231-5.

Schneyer AL, Fujiwara T, Fox J, Welt CK, Adams J, Messerlian GM, Taylor AE. Dynamic changes in the intrafollicular Inhibin/Activin/Follistatin axis during human follicular development: relationship to circulating hormone concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:3319-30.

Sehested A, Juul A, Anderson AM, Petersen JH, Jensen TK, Muller J, Skakkebaek NE. Serum Inhibin A and Inhibin B in healthy prepubertal, pubertal, and adolescent girls and adult women: relation to age, stage of puberty, menstrual cycle, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and estradiol levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:1634-40.

Sultan C, Paris F, Jeandel C, Lumbroso S, Galifer RB. Ambiguous genitalia in the newborn. *Semin Reprod Med*. 2002;20:181-8.

Tong S, Wallace EM, Burger HG. Inhibins and activins: clinical advances in reproductive medicine. *Clin Endocrinol*. 2003;58:115-27.

Walker AM, Walker JL, Adams S, Shi E, McGlynn M, Verge CF. True hermaphroditism. *J Paediatr Child Health*. 2000;36:67-73.

Welt CK. Regulation and function of Inhibins in the normal menstrual cycle. *Semin Reprod Med*. 2004;22:187-93.

Welt CK, Adams JM, Sluss PM, Hall JE. Inhibin A and Inhibin B responses to gonadotropin withdrawal depends on stage of follicle development. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:2163-9.

Welt CK, Smith ZA, Pauler DK, Hall JE. Differential regulation of Inhibin A and Inhibin B by luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and stage of follicle development. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2531-7.

Wiersma R. Management of the African child with true hermaphroditism. *J Pediatr Surg*. 2001;36:397-9.

Yong PYK, Baird DT, Thong KJ, McNeilly AS, Anderson RA. Prospective analysis of the relationships between the ovarian follicle cohort and basal FSH concentration, the inhibin response to exogenous FSH and ovarian follicle number at different stages of the normal menstrual cycle and after pituitary down-regulation. *Hum Reprod*. 2003;18: 35-44.

Yordam N, Alikasifoglu A, Kandemir N, Caglar M, Balci S. True hermaphroditism: clinical features, genetic variants and gonadal histology. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2001;14: 421-7.