

# Reprodução & Climatério

A revista REPRODUÇÃO & CLIMATÉRIO, anteriormente denominada REPRODUÇÃO, é órgão oficial de divulgação da SBRH, SOBRAGE e SOBRAC. Está registrada sob nº ISSN 1413-2087, e indexada no Index Medicus Latino Americano. Sua distribuição se faz a todos os sócios das sociedades participantes e aos principais serviços universitários da América Latina.

## Editor:

*Mario Cavagna*

## Editores Associados

*Eduardo Pandolfi Passos*

*João Sabino Pinho Neto*

*Paulo Spinola*

## Editores Anteriores

Araken Irerê Pinto  
Dirceu Mendes Pereira  
Edmund Chada Baracat

Nelson Vitielo  
Nilson Donadio  
Nilson Roberto de Melo

Newton Eduardo Busso  
Rui Alberto Ferriani  
Marcos Felipe Silva de Sá

## Conselho Editorial

Aarão Mendes Pinto Neto, Campinas, SP  
Agnaldo Pereira Cedenho, São Paulo, SP  
Alberto Soares Pereira Filho, Rio de Janeiro, RJ  
Alkindar Soares, Rio de Janeiro, RJ  
Almir Antonio Urbanetz, Curitiba, PR  
Álvaro Petracco, Porto Alegre, RS  
Anaglória Pontes, Botucatu, SP  
Angela Maggio da Fonseca, São Paulo, SP  
Aroldo Fernando Camargos, Belo Horizonte, MG  
Artur Dzik, São Paulo, SP  
César Eduardo Fernandes, São Paulo, SP  
Edmund Chada Baracat, São Paulo, SP  
Eduardo Leme Alves da Motta, São Paulo, SP  
Elsimar Metzner Coutinho, Salvador, BA

Fernando Freitas, Porto Alegre, RS  
Gilberto Costa Freitas, São Paulo, SP  
Hans Wolfgang Halbe, São Paulo, SP  
Hugo Maia Filho, Salvador, BA  
João Carlos Mantese, São Paulo, SP  
José Carlos de Lima, Recife, PE  
José Mendes Aldrighi, São Paulo, SP  
Lucas Vianna Machado, Belo Horizonte, MG  
Marco Aurélio Albernaz, Goiânia, GO  
Marcos Felipe Silva de Sá, Ribeirão Preto, SP  
Maria Celeste Osório Wender, Porto Alegre, RS  
Marta Finotti, Goiânia, GO  
Maurício Simões Abrão, São Paulo, SP

Newton Eduardo Busso, São Paulo, SP  
Nilson Roberto de Melo, São Paulo, SP  
Polimara Spritzer, Porto Alegre, RS  
Ricardo Baruffi, Ribeirão Preto, SP  
Ricardo Melo Marinho, Belo Horizonte, MG  
Rogério Bonassi Machado, São Paulo, SP  
Ronald Bossemeyer, Santa Maria, RS  
Rosaly Rulli Costa, Brasília, DF  
Rui Alberto Ferriani, Ribeirão Preto, SP  
Sebastião Freitas de Medeiros, Cuiabá, MT  
Selmo Geber, Belo Horizonte, MG  
Sonia Maria Rolim Rosa Lima, São Paulo, SP  
Wagner José Gonçalves, São Paulo, SP

## Conselho Editorial Internacional

Cesare Aragona, Roma, Italia  
Gian Benedetto Melis, Cagliari, Italia

Juliano Augusto Brum Scheffer, Paris, França  
Paolo E. Levi Setti, Milão, Italia

## Editoração e Impressão

Ponto Comunicação & Editora S/C Ltda.

Rua Pedro de Lucena, nº 64 - São Paulo - SP - Cep 03113-080

Fone: 0800-7723023 - E-mail: atendimento@pontoline.com.br



# Sociedade Brasileira de Reprodução Humana

Av. Jandira, 257 conj. 146 – CEP: 04080-001 – São Paulo - SP

Tel.: (11) 5055-6494 / 5055-2438

E-mail: sbrh@terra.com.br Site: www.sbrh.org.br

## Diretoria Biênio 2007-2008

### Presidente

Dirceu Henrique Mendes Pereira

### Secretário Executivo

Artur Dzik

### Tesoureiro - Adjunto

Marcelino Hofmeister Poli

### 1º Vice-Presidente

Sebastião de Freitas Medeiros

### Secretário Adjunto

Claudio Barros Leal

### Diretora Científica

Claudete Reggiani

### 2º Vice-Presidente

Ricardo Mello Marinho

### Tesoureira - Geral

Nilka Fernandes Donadio

### Presidente do Conselho de Delegados

Waldemar Naves do Amaral

## Delegados da SBRH – Biênio 2007-2008

AC - JULIO EDUARDO GOMES PEREIRA

PB - RICARDO LUCENA RAMOS

AL - FABIO CASTANHEIRA

PE - VILMA GUIMARÃES DE MENDONÇA

AM - LOURIVALDO RODRIGUES DE SOUSA

PI - JOAQUIM CASTELO BRANCO BARROS

AP - ALJERRY DIAS DO REGO

PR - JAIME KULAK

BA - KARINA DE SÁ ADAMI GONÇALVES

RJ - MARIA DO CARMO BORGES DE SOUZA

CE - MARCELO BORGES CAVALCANTE

RN - GEORGE DANTAS DE AZEVEDO

DF - HITOMI MIURA NAKAGAVA

RO - MARINES RODRIGUES SANTOS CESAR

ES - JULES WHYTE SOARES SOUSA

RR - JOSÉ ANTONIO NASCIMENTO FILHO

GO - MARIO APROBATO

RS - MARIA CELESTE OSORIO WENDER

MA - LUCIANE MARIA OLIVEIRA BRITO

SC - UBIRATAN CUNHA BARBOSA

MG - TULIO TADEU MARCOLINI

SE - GEORGE HAMILTON CALDAS SILVEIRA

MS - ALEX BORTOTTO GARCIA

SP - VILMON DE FREITAS

MT - MARCIA MARLY WINCK YAMAMOTO

TO - ADRIANO HOHL

PA - NELSON LUIZ DE OLIVEIRA SANTOS

Editorial	05
-----------	----

---

## Atualização

A influência das espécies reativas de oxigênio na infertilidade masculina	07
---	----

Letícia Lucchese  
Márcia Garcez  
Miriam Salvador  
Eleonora Bedin Pasqualotto  
Fábio Firmbach Pasqualotto

The influence of reactive oxygen species on male infertility

*Os autores relatam que as espécies reativas de oxigênio têm efeitos favoráveis ou prejudiciais sobre a função dos espermatozoides, de acordo com sua natureza, concentração, e momento e lugar da exposição.*

Tibolone in the perimenopause for the treatment of androgen deficiency	15
--	----

Hugo Maia Filho  
Julio Casoy  
Kleber Pimentel  
Tânia Correia  
Luiz A Freitas  
Célia Athayde  
Elsimar M Coutinho

O uso da tibolone na perimenopausa para tratar deficiência androgênica

*Os autores revisam o papel da tibolona no tratamento da mulher na perimenopausa.*

O laboratório de Andrologia como ajuda diagnóstica para casais pesquisando infertilidade	20
--	----

Luana Venturin Lara  
Cláudia Concer Viero  
Eleonora Bedin Pasqualotto  
Fabio Firmbach Pasqualotto

Andrology laboratory as a diagnostic help in infertility work-up

*Os autores referem que que o espermograma não pode ser considerado um “teste de fertilidade”, e sim o primeiro indicador de que o ciclo hormonal e da espermatogênese não apresenta grandes anormalidades.*

---

## Trabalhos Originais

Anti-Müllerian hormone: biomarker of ovarian reserve	25
--	----

Juliano Augusto Brum Scheffer  
Renato Fanchin  
René Frydman

Hormônio anti-mulleriano: biomarcador da reserva ovariana

*Os autores demonstram a relação da quantidade de folículos antrais e níveis séricos de AMH, sugerindo a importância desse peptídeo como biomarcador da reserva ovariana.*

### Estudo comparativo da viabilidade de ovário criopreservado por congelamento lento e vitrificação em ratas

Comparative study of ovarian cryopreservation by slow freezing and vitrification in mice

*Os autores comparam as técnicas de congelamento lento e vitrificação de tecido ovariano.*

Alvaro Pigatto Ceschin  
Beatriz Angélica Charlotte Thomaz  
Luciana Marques de Oliveira Carlos  
Gilberto Almodin  
Oswaldo Malafaia  
Sergio Ossamu Ioshii

29

### Gravidez na adolescência: resultados obstétricos e neonatais

Adolescent pregnancy: obstetric and neonatal outcomes

*Os autores avaliam os resultados obstétricos e neonatias de gestantes adolescentes em um serviço assistencial da cidade de São Paulo.*

Giacomo Trotta  
Neil F. Novo  
Yara Juliano  
Dirce M. Sigulem  
João C. Mantese  
Alfredo C.S.D. Barros,  
Maria Cristina F.S. Cury  
Mario Cavagna

35

### Sistema de Apoio ao Ensino de Ginecologia Endócrina através de Variáveis Clínicas na Plataforma World Wide Web

Support system to Gynecological Endocrinology teaching program through clinical variables at World Wide Web

*Os autores desenvolvem a implantação de um novo sistema de apoio ao ensino da Ginecologia.*

Ana Paula Rodrigues  
Vivian Ferreira do Amaral  
Cláudia Cabral Moro  
Laudelino Cordeiro Bastos

41

---

## Opinião

### Cesárea: decisão do obstetra ou da gestante?

Cesarean section: patient's choice or doctor's decision?

*O autor faz considerações sobre os aspectos éticos da decisão sobre a via de parto.*

Affonso Renato Meira

45

---

## Instruções aos Autores

48

## Lições do primeiro mundo

Lendo o oportuno editorial do Prof. Mario Cavagna no último número de nossa revista, acreditei que pudesse acrescentar algumas reflexões e dividi-las com os colegas, após ter participado do Congresso citado por ele.

As últimas décadas do século passado testemunharam número incrível de avanços na área da medicina reprodutiva. O primeiro, mais importante, amplamente divulgado e seguramente o pilar de todos os outros foi a “fertilização in-vitro” (FIV) com Steptoe e Edwards<sup>1</sup>.

A seqüência de eventos que melhoraram os resultados da FIV vem se superando a cada dia. Novos meios de cultura, fármacos indutores da ovulação<sup>2</sup>, ultra-sonografia transvaginal para a obtenção de oócitos, injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), diagnóstico genético pré-implantacional (PGD), mecanismos de identificação e seleção de melhores embriões etc.

Os avanços conseguidos com os conhecimentos adquiridos com a FIV vieram acompanhados de riscos, entre eles o mais freqüente é o aumento da incidência de gemelaridade que acompanha os processos de estímulo ovariano, nossas pacientes não são devidamente orientadas quanto aos da gemelaridade.

A importância do problema é grande a ponto de um só exemplar da revista “Fertility and Sterility” publicar sete trabalhos referentes ao mesmo tema, propondo soluções, cobrando posicionamento das entidades responsáveis e criticando a ausência de definições quanto à diminuição da incidência de gestações múltiplas<sup>3-9</sup>. Nossas sociedades ainda engatinham neste quesito.

A ênfase dada aos tópicos acima mencionados tenciona mostrar a importância e gravidade de cada fato e direcionar a conduta no sentido de minimizar os riscos e os custos da FIV com medidas que não comprometam os resultados já conseguidos. Os resultados com ciclos naturais em grupos selecionados de pacientes mostram resultados satisfatórios<sup>10,11</sup>, principalmente quando relatados em termos de gestação por transferência como já afirmou o Professor Cavagna em seu editorial. Na realidade não temos trabalhos em nossa literatura que possam nortear estes protocolos.

Mas qual seria o marcador mais importante do sucesso da FIV? Min et al.<sup>12</sup> sugerem que os programas de FIV relatem seus resultados baseados na sigla BESST (Birth Emphasizing a Successful Singleton at Term), ressaltando assim a importância de “um único” recém-nascido a termo por tratamento de FIV, neste caso o ciclo natural ou minimamente estimulado “cairia como uma luva”.

Estes clamores em direção a otimização dos tratamentos com redução das taxas de gemelares parece vem conseguindo repercussão. Em dezembro último um grupo de “experts” e tendo como “chairman” o Prof. René Frydman organizou com sucesso “THE FIRST WORLD CONGRESS ON NATURAL CYCLE/MINIMAL STIMULATION IVF” em Londres, criando na mesma oportunidade a ISNAR (International Society of Natural Cycle Assisted Reproduction).

A criação desta nova sociedade, segundo seus fundadores, foi necessária pois não só nos encaminhamos para uma nova era de FIV, a de transferência de um só embrião (TUSE) por ciclo, mas como também de colocar como principal objetivo o cuidado com os direitos da mulher quando ela procura tratamentos de reprodução assistida.

Além de trabalhos mostrando resultados com ciclo natural e com estimulação mínima, Prof. Karl Nygren de Estocolmo afirmou que, eventualmente, a TUSE será a rotina nos tratamentos de FIV. Os países nórdicos e a Bélgica vem, segundo ele, mostrando o caminho, seguido pelos países do Reino Unido, França e Holanda. Os dados nacionais da Suécia mostraram nos últimos anos 70% de TUSE com 5% de gemelares e taxa de gestação por transferência de 30%.

Questões fundamentais evidentemente permanecem e o objetivo desta nova sociedade é discuti-las. Quando e em que proporção o ciclo natural/minimamente estimulado deve ser usado? Qual o grupo de pacientes que se beneficiaria? Qual a medida de comparação para eficácia, segurança e custo ?

A disponibilidade no futuro para métodos de seleção mais eficientes na escolha de um embrião viável e saudável aliado à seleção adequada dos casais ampliarão a utilização do uso do ciclo natural/minimamente estimulado para FIV no futuro.

Todas estas verdades são incontestes e se somadas à nossa realidade, na qual o acesso à medicina reprodutiva é privilégio ou sorte de poucos elas nos mostram a importância que o assunto suscita. A organização da medicina privada (o serviço público não tem recursos ou interesse político suficientes para atender a demanda) e principalmente os centros de excelência devem oferecer alternativas que facilitem o acesso dos casais aos tratamentos de infertilidade. Evidentemente estes tratamentos deveriam ser oferecidos do mais simples ao mais complexo, do de menor custo ao mais caro, respeitando as indicações e as chances de gestação de cada um.

O primeiro mundo nos ensinou a FIV em ciclo natural e agora nos mostra a importância de voltar às origens. Lições do primeiro mundo !!!

**Newton Eduardo Busso**

## Referências bibliográficas

1. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 1978; 7:366.
2. Busso NE, Righi MMC, Machado MSA, Busso CE, Auge APF. Drogas utilizadas nos processos de indução da ovulação. In: Busso NE, Acosta AA, Remohí J. Indução da ovulação. São Paulo: Atheneu; 1999, 257-8.
3. Dickey RP. A year of inaction on high-order multiple pregnancies due to ovulation induction. *Fertil Steril*, 2003;79:14-16.
4. Jones Jr HW. Multiple births: how are we doing. *Fertil Steril*, 2003;79:17-21.
5. Fritz MA, Ory SJ. Practice guidelines cannot be justified in the absence of sufficient evidence: inaction is far more appropriate than indefensible action. *Fertil Steril*, 2003;79:22-24.
6. Rosenwaks Z, Chung PH. High order multiple pregnancy: is it a matter of inaction or a consequence of practice patterns ? *Fertil Steril*, 2003;79:25-26.
7. Daya S. Inappropriate use of cohort studies to formulate treatment guidelines. *Fertil Steril*, 2003;79:27.
8. Dickey RP. It has really been 15 years of inaction on high-order multiple pregnancies due to ovulation induction. *Fertil Steril*, 2003;79:28-29.
9. Fratarelli JL, Leondires MP, Mc Keeby JL, Miller BT, Segars JH. Blastocist transfer decreases multiple pregnancy rates in in-vitro fertilization cycles: a randomized controlled trial. *Fertil Steril*, 2003;79:228-30.
10. Busso NE, Machado MSA, Righi MMC, Vieira M, Crepaldi A. Ciclo natural em Reprodução Assistida: Apresentação de caso. *Reprod Clim* 1999, 14:207-10.
11. Busso NE. Fertilização “ in-vitro” com injeção intracitoplasmática de espermatozoides em ciclos naturais de mulheres de diferentes faixas etárias. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, 2005.
12. Min JK, Breheny AS, Maclachlan V, Healy DL. What is the most standard or success in assisted reproduction? The singleton, term gestation, live birth rate per cycle initiated: the BESST end point for assisted reproduction. *Hum reprod*, 2004;19:3-7.

# A influência das espécies reativas de oxigênio na infertilidade masculina

The influence of reactive oxygen species on male infertility

Letícia Lucchese, Márcia Garcez, Miriam Salvador, Eleonora Bedin Pasqualotto, Fábio Firmbach Pasqualotto



Letícia Lucchese

Letícia Lucchese possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1994) e Especialização em Hematologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (2001). Atualmente é Farmacêutica-Bioquímica da Prefeitura Municipal de Caxias do Sul e mestranda da Universidade de Caxias do Sul no projeto de pesquisa Infecção viral causada pelo *Papiloma vírus humano* e seu papel na qualidade seminal e no estresse oxidativo. Tem experiência profissional na área de Análises Clínicas com ênfase em Hematologia.

## RESUMO

A infertilidade masculina é uma entidade multifatorial que abrange uma grande variedade de alterações, podendo ser congênita ou adquirida. A infertilidade idiopática pode ser causada pela excessiva produção de espécies reativas de oxigênio no plasma seminal, levando ao estresse oxidativo. Estudos têm demonstrado que os espermatozoides humanos possuem a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio quando incubados em ambiente aeróbio, sendo que as maiores fontes de espécies reativas de oxigênio no sêmen são leucócitos, espermatozoides com citoplasma residual e espermatozoides imaturos. A membrana plasmática dos espermatozoides é rica em ácidos graxos poliinsaturados sendo vulnerável ao processo de peroxidação lipídica, o que pode prejudicar a estrutura celular, motilidade, sobrevivência e funções metabólicas do espermatozoide. O estresse oxidativo pode induzir dano ao DNA espermático, podendo ser responsável pela aceleração do processo de apoptose da célula germinativa, levando a diminuição da concentração de espermatozoides e à aparente deterioração da qualidade seminal observada nas últimas 4 à 5 décadas. Entretanto dois fatores protegem o DNA espermático do ataque oxidativo: a característica de empacotamento do DNA e os antioxidantes presentes no plasma seminal. Consequentemente, as espécies reativas de oxigênio têm efeitos favoráveis ou prejudiciais sobre a função dos espermatozoides de acordo com sua natureza e concentração, assim como o momento e lugar da exposição. Estes achados mostram a importância do equilíbrio adequado entre antioxidantes e baixos níveis de ERO que são necessários para função espermática normal.

**UNITERMOS:** Infertilidade masculina; espécies reativas de oxigênio; antioxidantes; estresse oxidativo.

## Introdução

Infertilidade é a inabilidade de um casal sexualmente ativo, sem a utilização de métodos contraceptivos, de estabe-

lecer gravidez no período de um ano<sup>1</sup>, prazo no qual aproximadamente 90% dos casais o fazem. Sendo um fenômeno universal que acomete de 10% a 15% dos casais, independente dos fatores sociais, econômicos ou culturais<sup>2</sup>. A avaliação de fertilidade é um fenômeno complexo e multifatorial que envolve a avaliação do casal. Em aproximadamente 50% dos casos de infertilidade conjugal, a causa esta relacionada pelo menos em parte com o homem<sup>1,3</sup>.

As causas de infertilidade masculina podem ser geradas por vários fatores, sendo que de 30 a 40% dos casos não se descobrem às causas da dificuldade do casal engravidar. Portanto, infertilidade idiopática é uma situação extremamente

Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.  
Endereço para correspondência:  
Fábio Firmbach Pasqualotto  
CONCEPTION – Centro de Reprodução Humana  
Rua Pinheiro Machado, 2569, salas 23/24.  
CEP 95020-170 Caxias do Sul – RS, Brasil.  
(54)3214-4095/3215-1695  
[fabio@conception-rs.com.br](mailto:fabio@conception-rs.com.br)  
[www.conception-rs.com.br](http://www.conception-rs.com.br)

séria, visto que representa uma elevada porcentagem de homens inférteis que não podem ser tratados com as modalidades terapêuticas empíricas aplicadas atualmente<sup>4,5</sup>. Uma das causas de infertilidade idiopática esta relacionada ao estresse oxidativo (EO)<sup>6</sup>.

Alguns estudos sugerem que a excessiva e descontrolada produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) talvez possa ser um dos maiores fatores que levam a infertilidade masculina por causarem deterioração da qualidade e da função do espermatozóide<sup>3,7,8</sup>. Portanto, o entendimento dos efeitos do EO no espermatozóide humano facilitará o diagnóstico de infertilidade masculina bem como as estratégias de tratamento específicas<sup>7</sup>. Este trabalho mostra alguns estudos sobre o papel das espécies reativas de oxigênio exercido sobre a fertilidade masculina.

## Espécies reativas e antioxidantes

Os radicais livres (RL) podem ser definidos como estruturas altamente reativas, instáveis e que possuem um elétron desemparelhado na última camada eletrônica<sup>9</sup>. As espécies reativas de oxigênio (ERO) nem sempre são RL, mas estão envolvidas em reações químicas que geram esses radicais nos organismos vivos<sup>9,10</sup>. Em contrapartida existem os antioxidantes que são compostos que funcionam como bloqueadores dos processos oxido - redutivos desencadeados pelos radicais livres. Frequentemente, o termo “antioxidantes” é implicitamente restrito aos compostos inibidores da lipoperoxidação, entretanto, podem ser definido mais amplamente como “uma substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada a outras que oxidam um substrato, previnem significativamente, a oxidação deste substrato”<sup>9</sup>. O dano causado pelas ERO é minimizado pelos sistemas de defesa antioxidante não enzimático ou enzimático, este último representado principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (Sod), catalase (Cat), glutatona-peroxidase (GPx) e glutatona-redutase (GR)<sup>11</sup>.

A detoxificação das espécies reativas de oxigênio (ERO) envolve um mecanismo de elevada sincronia e que atua de forma altamente cooperativa. A regulação do sistema de defesa antioxidante enzimático depende principalmente de seu substrato (radicais livres e espécies reativas de oxigênio), da produção de co-substratos e da afinidade, seletividade e especificidade por este substrato<sup>12</sup>.

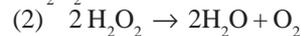
Entre as principais enzimas antioxidantes, detectadas em espermatozoides de diferentes espécies animais, esta a superóxido dismutase - Sod (EC 1.15.1.1)<sup>13,14</sup>. Os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) são dismutados pela ação desta enzima, produzindo peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular ( $O_2$ ) conforme a reação 1:



Em células eucariotas há várias isoenzimas do tipo Sod, geralmente responsáveis por compartimentos celulares distintos, podendo conter cobre, zinco, ferro ou manganês em

seus sítios ativos<sup>15</sup>. Atualmente três tipos de Sod estão bioquímica e molecularmente caracterizadas em mamíferos: Sod1 ou SodCuZn, codificada por um gene presente no cromossomo 21, foi a primeira enzima Sod a ser caracterizada<sup>9</sup>, Sod2 ou SodMn, codificada por um gene presente no cromossomo 6<sup>15</sup>, Sod3 ou SodEC (Sod extracelular) codificada por um gene presente no cromossomo 4<sup>16</sup>. A atividade da Sod é regulada através de sua biossíntese, a qual depende da oxigenação tissular, como foi comprovado em ratas submetidas a tensões de oxigênio elevadas<sup>17</sup>. Aumentos na concentração de superóxido podem elevar os níveis das isoenzimas da Sod<sup>9</sup>.

Outra enzima detectada no espermatozoides de seres humanos e que neutraliza as ações prejudiciais do excesso de ERO é a catalase (Cat) (EC 1.11.1.6), a qual está presente no espermatozóide e plasma seminal, sendo codificada por um gene presente no cromossomo 11 é um tetrâmero formado por unidades idênticas, cada monômero contém um grupo prostético heme, ligado ao ferro em seu centro catalítico<sup>14,18</sup>. Atua removendo o  $H_2O_2$  de acordo com a reação 2:



A catalase tem grande capacidade de destruir  $H_2O_2$ . Em termos de moléculas de  $H_2O_2$  destruídas por minuto, por moléculas de enzima, ela é uma das mais ativas enzimas conhecidas. Porém, sua afinidade pelo  $H_2O_2$  é baixa, sendo necessárias altas concentrações de  $H_2O_2$  para que ela possa trabalhar rápido<sup>19</sup>.

Entre os antioxidantes não-enzimáticos incluem-se as vitaminas, carotenóides polifenóis, ácido úrico entre outros. Esses antioxidantes agem principalmente quebrando a cadeia das reações oxidativas, eliminando radicais livres ou quelando íons metálicos<sup>20,21</sup>.

Estresse oxidativo (EO), é então caracterizado como o desequilíbrio entre a produção de ERO e sua neutralização pelos antioxidantes<sup>22,23,24,25,26</sup>. De acordo com Aitken & Krausz o EO é primeiramente induzido pela geração excessiva de ERO por espermatozoides imaturos e morfológicamente defeituosos e/ou por leucócitos seminais ativados<sup>27</sup>; lesando não apenas a fluidez da membrana plasmática, mas também a integridade do DNA nuclear dos espermatozoides<sup>28</sup>. Outra possível fonte de EO inclui reação redox dos xenobióticos, depreciação de antioxidantes ou apoptose<sup>29</sup>.

O espermatozóide possui poucos antioxidantes em seu citoplasma, tornando esta célula muito vulnerável aos danos causados pelas ERO<sup>26</sup>. Felizmente, o plasma seminal é rico em antioxidantes, contribuindo desta forma para o equilíbrio entre produção e neutralização das ERO<sup>30</sup>. Entre os antioxidantes presentes em elevadas concentrações no plasma seminal estão os grupos tiol, ácido ascórbico e ácido úrico e em quantidades substanciais a glutatona e alfa-tocoferol. O espermatozóide possui elevadas concentrações de grupos tióis, porém pequenas quantidades de ácido ascórbico, alfa-tocoferol, ácido úrico e glutatona<sup>31</sup>. Outras substâncias como proteínas (albumina) ou pequenas moléculas tais como hipotaurina, taurina e piruvato, podem agir como neutralizadoras das ERO no sêmen, protegendo assim contra o estresse oxidativo<sup>32,33</sup>. Entretanto o principal antioxidante no líquido seminal dos homens férteis é a vitamina C (ácido ascórbico) contribuindo com até 65% de sua capacidade

de antioxidante<sup>34</sup>. Sua concentração no líquido seminal chega a ser 10 vezes maior que no plasma sanguíneo<sup>35</sup>.

Toda esta relação entre produção de espécies reativas de oxigênio e sua neutralização pelos antioxidantes é necessário para assegurar uma função espermática adequada para que se consiga o objetivo final que é a gravidez da parceira.

## Infertilidade masculina

De maneira corriqueira, o diagnóstico de infertilidade masculina depende de uma avaliação descritiva dos parâmetros do ejaculado, com ênfase na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides, sendo a morfologia de Tygerberg a mais importante para predizer fertilidade. Porém é necessário enfatizar que a análise seminal não é um teste de fertilidade. Atualmente, o número absoluto de espermatozoides não prediz o prognóstico de fertilidade, por isso, testes *in vitro* foram desenvolvidos para monitorar a capacidade funcional dessas células<sup>36,37</sup>.

De fato, a pobre qualidade seminal do ejaculado humano nos separa de muitos dos outros mamíferos<sup>38</sup>. Mesmo em uma população de homens férteis, até 50% dos espermatozoides do ejaculado podem apresentar alterações na motilidade ou morfologia<sup>1</sup>. Acredita-se que para acontecer a fertilização do gameta feminino pelo masculino, é necessário apenas um número mínimo de espermatozoides com movimentos progressivos e morfologicamente normais<sup>39</sup>. Sharma e Agarwal relataram que a produção de ERO pelos espermatozoides, assim como outras células que vivem em condições aeróbicas, origina-se principalmente da atividade metabólica normal<sup>36</sup>. Zini *et al.*, mostraram que os espermatozoides humanos possuem a capacidade de gerar ERO quando incubados em ambiente aeróbio<sup>40</sup>.

Vários são os fatores associados à infertilidade masculina, no entanto trabalhos atuais têm despertado a atenção para o envolvimento das ERO como um dos maiores fatores envolvidos nesta patologia<sup>41</sup>. Existem muitas evidências de que os leucócitos (principalmente os Granulócitos Polimorfonucleares) são considerados a maior fonte produtora de ERO no plasma seminal<sup>31,42,43,44,45</sup>. A geração de elevados níveis de ERO pelos leucócitos pode exercer um efeito deletério importante na função dos espermatozoides como indicado por uma redução importante na motilidade espermática e capacidade de penetração oocitária<sup>46,47,48</sup>. Tortolero *et al.*, reportam a associação da leucospermia com redução do número e da motilidade dos espermatozoides<sup>49</sup>.

O dano causado aos espermatozoides pode ser moderado se a infiltração leucocitária ficar confinada à próstata ou às vesículas seminais. Nestas circunstâncias, o espermatozoide apenas entra em contato com as ERO geradas pelos leucócitos no momento da ejaculação. Entretanto, se eles foram originados no epidídimo ou testículo, as ERO poderão interagir com a membrana espermática por um longo período, aumentando as possibilidades de danificar os espermatozoides.

## Efeito das espécies reativas de oxigênio no espermatozoide

Em condições normais, as células somáticas contêm substâncias antioxidantes em seu citoplasma. Porém o espermatozoide, durante o período de maturação, perde a maioria de seu citoplasma, e, com isto, perde parte dos antioxidantes endógenos, ficando vulnerável à ação das ERO<sup>40</sup>. Quando a espermatogênese se apresenta prejudicada, os mecanismos de extrusão citoplasmática tornam-se defeituosos e o espermatozoide liberado pelo epitélio germinativo possui uma grande quantidade de citoplasma residual<sup>50,51</sup>. Acredita-se que a retenção de citoplasma residual pelo espermatozoide humano esteja correlacionada positivamente com a geração de ERO por meio de mecanismos mediados pela enzima citosólica glicose-6-fosfato desidrogenase, que regula a taxa do influxo de glicose pelo movimento da hexose monofosfato, a qual, por sua vez, controla a disponibilidade do NADPH intracelular<sup>36</sup>.

O espermatozoide humano é altamente susceptível ao estresse oxidativo. Este processo induz a fragmentação do DNA em ambos os genomas, nuclear e mitocondrial além de desencadear o fenômeno da Peroxidação Lipídica (LPO)<sup>26,29,39</sup>, afetando primariamente a estrutura e a função da membrana celular e, conseqüentemente, causar alterações importantes nas proteínas<sup>52, 53,54</sup>. O peróxido de hidrogênio é a principal ERO tóxica para os espermatozoides humanos. As concentrações moderadamente altas de peróxido de hidrogênio não afetam a viabilidade dos espermatozoides, porém os imobilizam, geralmente por esgotamento do ATP intracelular e diminuição na fosforilação das proteínas do axonema. As altas concentrações de peróxido de hidrogênio induzem a peroxidação lipídica e produzem a morte celular<sup>31</sup>.

As membranas celulares estão sujeitas ao ataque das ER por possuírem grande conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados nos fosfolípidios, os quais são particularmente sensíveis a reações oxidativas<sup>54</sup>. A natureza insaturada das moléculas (ligação dupla) predispõe os espermatozoides ao ataque das espécies reativas e a peroxidação lipídica (LPO) da membrana plasmática. Com a LPO, existe uma perda na fluidez da membrana espermática, prejudicando o bom funcionamento de espermatozoide e a sua fusão com o oócito<sup>26, 29, 46, 55</sup>. Além disso, a LPO prejudica a troca iônica realizada pela membrana do espermatozoide, danificando a motilidade espermática normal<sup>35, 41, 56</sup>, e sendo correlacionada com defeitos morfológicos do corpo dos gametas masculinos<sup>57</sup>. Os danos peroxidativos induzem a formação de ERO, sendo uma das maiores causas da redução da viabilidade e fertilidade dos espermatozoides<sup>58</sup>.

Os espermatozoides possuem mitocôndrias abundantes, estas organelas são uma fonte habitual de ERO, nas mitocôndrias com disfunções a produção de ERO aumenta significativamente e estas moléculas por sua vez afetam a função mitocondrial dos espermatozoides. Esta relação pode se dar devido a dois fenômenos interconectados mutuamente: as ERO que lesam a membrana mitocondrial, e a membrana mitocondrial lesionada que aumenta a produção de ERO<sup>35</sup>.

As bases do DNA e as ligações fosfodiester são suscetíveis ao estresse oxidativo e a peroxidação destas estruturas pode causar quebras e *cross-linkings* do DNA e resultar em interrupção da transcrição, tradução, e replicação do DNA. A quantidade de produtos da oxidação do DNA tem sido reportada como aumentando com a idade em certos órgãos e o dano oxidativo ao DNA tem sido citada por estar envolvido na patogênese do câncer, doença de Alzheimer, e mutações herdáveis. Kodama *et al.*, sugeriram que o dano genômico ao DNA do espermatozóide pode ser transmitido para a prole e levar ao aumento da incidência de abortos, anomalias fetais, e defeitos de nascimento<sup>59</sup>. Portanto, um alto nível de dano oxidativo ao DNA do espermatozóide pode formar uma etiologia bioquímica potencialmente importante e estar envolvido no mecanismo da infertilidade masculina. Entretanto, existem ainda muito poucas informações disponíveis sobre os níveis de dano endógeno ao DNA em espermatozoides humanos, e permanece a ser determinado se um elevado nível de dano oxidativo ao DNA do esperma está associado com o processo patológico da infertilidade masculina.

Os exames seminais de rotina, os quais medem a concentração de espermatozoides, percentagem de motilidade e morfologia, não identificam defeitos sutis na arquitetura da cromatina do espermatozóide. Porém a integridade do DNA do espermatozóide é crucial para a correta transmissão da informação genética às futuras gerações. Evidências acumuladas sugerem que distúrbios na organização do material genômico no núcleo do espermatozóide são negativamente correlacionados com o potencial de fertilidade do espermatozóide. Uma série de estudos tem revelado que os níveis de quebras duplas do DNA estão aumentados em pacientes inférteis com parâmetros anormais de sêmen quando comparados a homens férteis. A mesma diferença foi também detectada em homens com infertilidade idiopática com uma rotina normal dos parâmetros de sêmen que tiveram um alto índice de fragmentação de DNA. Em recente estudo Sharma *et al.*, mostraram que espermatozoides de homens inférteis apresentam alta frequência de anormalidades cromossômicas, deficiência qualidade de empacotamento do DNA, aumento de quebras duplas e maior suscetibilidade para induzir a desnaturação por ácidos *in situ* do que espermatozoides de homens férteis<sup>60</sup>. Estes achados corroboram com a preocupação de que doenças genéticas possam ser transmitidas via técnicas de reprodução assistida, intensificando assim o foco na integridade genômica.

Diversos ensaios têm sido desenvolvidos para avaliar a integridade do DNA e a maturidade da cromatina espermática. Estes ensaios baseiam-se no fato de que defeitos na estrutura da cromatina podem levar ao aumento da instabilidade do DNA e suscetibilidade a desnaturação por estresse. Atualmente, os ensaios mais usados para medir a fragmentação do DNA são: Túnel, Cometa e o ensaio da estrutura da cromatina do esperma (SCSA). Tentativas têm sido feitas para padronizar o ensaio cometa com sêmen humano e estabelecer sua relação com os dados dos ensaios SCSA e túnel. Espermatozoides de uma mesma alíquota foram analisados com os três ensaios e uma correlação significativa entre os resultados foi observada<sup>60</sup>. O ensaio cometa permite uma avaliação da quantidade de fragmentação do DNA em células individuais. Sendo uma téc-

nica rápida, simples, sensível e de baixo custo para mensurar e analisar as lesões além de detectar efeitos de reparo no DNA<sup>61</sup>. Nesta técnica pequenos fragmentos de DNA migram para fora do núcleo e o número de quebras por célula pode ser estimado através da extensão da migração. O teste do cometa alcalino provou ser muito mais sensível na detecção de baixos níveis de danos de DNA em espermatozóide humano<sup>62</sup>.

Muitos estudos têm detectado anomalias no núcleo de espermatozoides do ejaculados, embora a extensão do dano esteja minuciosamente relacionada com a função espermática e infertilidade masculina, a origem de tal dano é ainda controversa<sup>60</sup>.

Três fatores podem estar envolvidos na etiologia do dano ao DNA na linhagem germinativa: estresse oxidativo, deficiências em processos naturais como empacotamento da cromatina e apoptose abortiva<sup>60</sup>.

Apoptose, também descrita como morte celular programada é um fenômeno fisiológico caracterizado por alterações morfológicas e bioquímicas que culminam no suicídio da célula<sup>63</sup>, a ocorrência da apoptose na vida adulta ajuda no descarte de células com alterações. No contexto da reprodução masculina, a apoptose é responsável pelo controle da superprodução de gametas masculinos<sup>64,65</sup>, sendo a chave reguladora da espermatogênese em estágios normais e patológicos. Contudo a questão a ser respondida é se a apoptose no espermatozóide é o resultado de um processo iniciado no nível de espermatogônia ou se isto ocorre durante a última fase da espermatogênese ou mesmo a nível testicular<sup>66</sup>. Gandini *et al* demonstraram que a porcentagem de apoptose em homens normozoospermicos foi significativamente menor do que em homens com oligoasthenoteratozoospermia, doença de Hodgkin e neoplasia de testículo<sup>67</sup>. Outro estudo mostrou significativa correlação entre níveis de apoptose em espermatozoides maduros e níveis de ERO no sêmen. Sentman *et al.*<sup>68</sup> sugeriram que a apoptose pode depender das ERO, baseados no achado de que o peróxido de hidrogênio induz apoptose em culturas celulares. Portanto existem evidências suficientes para sugerir que altos níveis de ERO resultam na liberação da proteína citocromo-C da mitocôndria, que ativa as caspases e induz a apoptose, por outro lado, Bcl-2 (gene inibidor da morte celular programada) protege as células da apoptose, provavelmente por um mecanismo que reduz a produção de ERO<sup>69</sup>.

Estas evidências sugerem que em homens subfértéis, a liberação do espermatozóide via apoptose não esta ocorrendo corretamente, portanto homens com parâmetros seminais alterados (morfologia, função bioquímica ou dano no DNA nuclear) podem apresentar uma apoptose imperfeita<sup>64,70</sup>.

Muito embora na infertilidade masculina as ERO sejam conhecidas principalmente por seus efeitos deletérios na função espermática, existem evidências suficientes para apoiar a hipótese de que, em baixas e controladas concentrações, as espécies reativas participam nos mecanismos de sinalização da transdução<sup>71</sup>. Um aumento na concentração de  $O_2^-$  é um dos primeiros passos necessários para que aconteçam à indução e o desenvolvimento dos movimentos de hiperativação e o fenômeno de capacitação do espermatozóide<sup>72</sup>. As ERO facilitam a reação acrossômica por meio de um efeito estimulatório na fosfolipase

A<sub>2</sub> presente no espermatozóide humano<sup>73</sup>. Esta enzima é estimulada pelo íon cálcio e peróxidos lipídicos presentes na membrana plasmática. Além disso, as ERO auxiliam na ativação da fosforilação da tirosina, desempenhando papel importante na mediação da ligação do espermatozóide ao oócito<sup>36</sup>.

Estes achados mostram a importância do equilíbrio adequado entre antioxidantes e baixos níveis de ERO que são necessários para função espermática normal<sup>40</sup>.

## Espécies reativas de oxigênio em homens férteis e inférteis

A função espermática prejudicada é uma causa geral e óbvia da infertilidade masculina, no entanto o descontrole e produção excessiva de ERO parecem ter um papel significativo como um dos maiores fatores que conduzem a um estado de infertilidade<sup>36,74,75,76,77</sup>. Gil-Gusman *et al.*, mostraram que existe uma significativa variação de célula para célula com relação à produção de ERO, em razão da presença de espermatozoides em diferentes estágios de maturação, e que o dano oxidativo causado aos espermatozoides maduros pelas ERO produzidas por espermatozoides imaturos durante a migração pelos túbulos seminíferos para o epidídimo pode ser uma importante causa de infertilidade masculina<sup>51</sup>.

Estudos mostraram que níveis aumentados de ERO têm sido encontrados no sêmen de homens inférteis<sup>46,75,78</sup>, e estes têm sido correlacionados com a diminuição da morfologia do espermatozóide, como indicado por uma baixa proporção de espermatozoides com morfologia normal no sêmen<sup>79,80</sup>. Em recente estudo, Nallella *et al.*, mostrou forte correlação negativa entre qualidade seminal (derivada de parâmetros seminais) e níveis de ERO em todos os pacientes com fatores masculinos de infertilidade<sup>3</sup>. A correlação aumenta significativamente com o aumento dos espermatozoides anormais e com a diminuição da motilidade<sup>76</sup>. Isto vem de acordo com alguns pesquisadores que acreditam que as concentrações patológicas de ERO detectadas no sêmen de homens inférteis se devem mais provavelmente ao aumento da produção de ERO e não pela deficiência de enzimas antioxidantes no plasma seminal (Sod e Cat)<sup>31,40</sup>. Entretanto outros estudos<sup>74,75,81</sup>, sugerem que EO deve ser resultado da deficiente capacidade antioxidante seminal. Tendo em vista que, os níveis de Sod e Cat apresentaram correlação positiva com a concentração espermática e negativa com níveis de leucócitos seminais, e estes últimos apresentaram correlação inversa com motilidade<sup>82</sup>.

Um estudo prospectivo demonstrou que homens com altos níveis de ERO tinham sete vezes menos chance de estabelecer uma gravidez comparado àqueles com baixa geração<sup>46</sup>. Sendo o dano oxidativo ao espermatozóide a maior causa de disfunção espermática. As defesas antioxidantes não enzimáticas totais foram inversamente relacionadas com LPO<sup>81</sup> e os altos níveis de ERO associados com significativo aumento da produção de MDA<sup>76</sup>.

Estudos sugerem a inclusão da avaliação rotineira da medida de ERO-CAT (espécies reativas de oxigênio-capacidade antioxidante total) como um novo parâmetro do EO, ten-

do em vista que a associação destes demonstrou significância superior na separação de homens férteis e inférteis do que a avaliação dos parâmetros em separado foi demonstrado que homens inférteis, independente da forma de diagnóstico idiopática ou fatores masculinos, possuíam níveis significativamente mais baixos de ERO-CAT, do que os controles<sup>83</sup>. Servindo com importante fator de identificação dos pacientes inférteis com diagnóstico clínico de infertilidade masculina<sup>83</sup>.

Portanto, os níveis de ERO no sêmen, são uma real preocupação, pois eles quando presentes em altos níveis são potencialmente tóxicos à qualidade e função do espermatozóide.

## Conclusão

Aparentemente, existe uma relação direta entre níveis elevados de ERO e infertilidade masculina. Portanto o entendimento dos mecanismos envolvidos e pesquisas para alterar a relação entre produção e neutralização das ERO são de grande importância para que consigamos aumentar as chances de um casal vir a estabelecer gravidez.

## ABSTRACT

Male infertility is a multifactorial entity covering a great variety of alterations. It may be congenital or acquired. Idiopathic infertility may be caused by excess production of reactive oxygen species in seminal plasma, leading to oxidative stress. Studies have shown that human sperm can generate reactive oxygen species when incubated in aerobic environments, and the main sources of reactive oxygen species in semen are leukocytes, sperm with residual cytoplasm and immature sperm. The plasma membrane of sperm is rich in polyunsaturated fatty acids, and it is vulnerable to the lipid peroxidation process that may damage the cell structure, motility, survival and metabolic functions of the sperm. Oxidative stress may induce damage to the spermatid DNA, and could be responsible for speeding-up the process of germ cell apoptosis, leading to a reduction in the sperm concentration, and to the apparent deterioration of the seminal quality observed in the last 4 to 5 decades. However, two factors protect the sperm DNA from oxidative attack: the characteristic of DNA packaging, and the antioxidants present in the seminal plasma. Consequently, the reactive oxygen species have favorable or harmful effects on the sperm function, depending on their nature and concentration, as well as the time and place of exposure. These findings show the importance of an adequate balance between antioxidants and low levels of ROS needed for normal sperm function.

**UNITERMS:** Male infertility; reactive oxygen species; antioxidants; oxidative stress .

## Referências bibliográficas

1. World Health Organization (WHO). Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge, Cambridge University Press; 1999.
2. Galarneau GJ, Nagler HM. Cost-effective infertility therapies in the '90s: To treat or to cure? *Contemp Urol* 1999; 11: 32-45.
3. Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SSR, Agarwal A. Identification of male factor infertility using a novel semen quality score and reactive oxygen species levels. *Clinics* 2005; 60: 317-24.
4. Kadze R, Chan PJ, Jacobson JD, Corselli JU, King A. Temperature variable and the efficiency of sperm mediated transfection of HPV16 DNA into cells. *Asian J Androl* 2002; 4: 169-73.
5. Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou C, Kotronias D. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2003; 79: 1566-70.
6. Fraczek M, Kurpisz M. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2005; 59:523-34.
7. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod Biomed* 2006; 12(5):630-3.
8. De Iuliis GN, Wingate JK, Koopers AJ, McLaughlin EA, Aitken RJ. Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(5):1968-75.
9. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press: New York 2000; 936.
10. Salvador M, Henriques JAP. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. In: Garcez M, Bordin D, Peres W, Salvador M. Radicais livres e espécies reativas. Ed. Ulbra: Canoas 2004.
11. Bonnefoy M, Patricot MC, Lacour JR. Relation between physical activity, muscle function and IGF-1, testosterone and DHEAS concentrations in the elderly. *Rev Med Interne* 2002; 23(10):819-27.
12. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Experimental Physiology* 1997; 82(2): 291-5.
13. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987; 8: 338-48.
14. Meier B, Habermehl GG. Evidence for superoxide dismutase and catalase in mollicutes and release of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 1990; 15: 74-9.
15. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 1998; 201: 1203-1209.
16. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu-Zn-Sod (Sod1), Mn-Sod (Sod2) and EC-Sod (Sod3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Méd* 2002; 33(3): 337-49.
17. Crapo JD, Tierney DF. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* 1974; 226: 1401-1407.
18. Foote RH, Hare E. High catalase content of rabbit semen appears to be inherited. *J Androl* 2000; 21: 664- 8.
19. Lodato RF. Oxygen Toxicity. In: Tobin, M.J. Principles and Practice of Mechanical Ventilation. Mc Graw-Hill 1994: 837- 855.
20. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem* 1997; 69(3):1330-1.
21. Sánchez-Moreno S, Laurrauri JÁ, Calixito-Saura F. Free radical scavenger capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grapes juices and related polyphenolic constituents. *Food Res Internat.* 1999; 32: 407-412.
22. Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci* 1996; 1: 78-86.
23. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *J Androl* 2001; 22: 316-22.
24. Pasqualotto FF, Sharma RK, Kobayashy H, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Poor semen quality and ROS-TAC scores in patients with idiopathic infertility. *Pôster - 97° Encontro anual da Associação Americana de Urologia* 2001; Anaheim, CA, EUA, junho 2-7.
25. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative Stress and Male Infertility: From Research Bench to Clinical Practice. *J Androl* 2002; 23:6.
26. Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol* 2005; 43(11):963-74.
27. Aitken RJ, Krausz C. DNA damage and Y chromosome. *Reproduction* 2001; 122: 497-506.
28. Aitken RJ. The Amoroso lecture. The human spermatozoon – a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999; 115:1-7.
29. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250(1-2):66-9.
30. Comhaire F, Zalata A, Christophe A, Mahmoud A, Depuydt C, Dhooze W. Which efforts towards conservative treatment of male infertility will be successful? Reactive oxygen species, antioxidants, and sperm phospholipids. *Androl* 1999; 31: 295-6.
31. Potts RJ, Jefferies TM, Notarianni LJ. Antioxidant capacity of epididymis. *Hum Reprod* 2001; 14(10): 2513-16.

32. Lewis MES, Sterling LSE, Young SI, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1997; 67(1): 142-7.
33. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biomed* 1999; 26(7-8): 1034-53.
34. Agarwal A. Role of antioxidants in the treatment of men infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed* 2004; 8: 616-27.
35. Agarwal A, Ferreira R. Estrés oxidativo y administración de antioxidantes en la esterilidad masculina. *Antioxidantes y Calidad de Vida* 2004; 8:4-11.
36. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48: 835-50.
37. Ombelet W, Wouters E, Boels L, Cox A, Janssen M, Spiessens C, Vereecken A, Bosmans E, Steeno O. Sperm morphology assessment: diagnostic potential and comparative analysis of strict or WHO criteria in a fertile and a subfertile population. *Int J Androl* 1997; 20(6):367-72.
38. Birkhead T. The role of sperm competition in reproduction. In: Glover T D, Barratt CLR. Ed. *Male fertility and infertility*, Cambridge, UK, Cambridge University Press 1999; 18-33.
39. Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *Int J Androl* 2006; 29(1):69-75.
40. Zini A, Garrels K, Phang D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology* 2000; 55(6): 922-6.
41. Dokmeci, D. Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. *Folha Med (Plovdiv)*, 2005; 47(1):26-30.
42. Oschendorff FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update* 1999; 5(5): 399-420.
43. Pasqualotto FF, Kobayashi H, Daitch JA, Agarwal A, Thomas AJ Jr. Detection of testicular cancer in men presenting with infertility. *Urology Times* 2000; 28: 24.
44. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl* 2001; 22: 575-83.
45. Lemkecher T, Dartigues S, Vaysse J, Kulski O, Barraud-Lange V, Gattegno L, Wolf JP. Leucocytospermia, oxidative stress and male infertility: facts and hypotheses. *Gynecol Obstet Fertil* 2005; 33(1-2): 2-10.
46. Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 542-51.
47. Sharma RK, Pasqualotto FF, Goyal K, Thomas AJ Jr, Nelson DR, Agarwal A. Relationship between oxidative stress and semen quality in infertile men. In *annual meeting*, 95. Abstract. p.1349. Dallas, 1999.
48. Baker MA, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 29(3):67.
49. Tortolero I, Duarte OJM, Pamplona CM, Alvarez GE, Arata-Bellabarba G, Regadera J, Leiva GO. The effect of seminal leukocytes on semen quality in subfertile males with and without varicocele. *Arch Esp Urol* 2004; 57(9): 921-28.
50. Zini A, Buckspan M, Jamal M, Jarvi K. Effect of varicolectomy on the abnormal retention of residual cytoplasm by human spermatozoa. *Hum Reprod* 1999; 14(7): 1791-3.
51. Gil-Guzman E, Ollero M, Sharma RK, Lopez MC, Alvarez JG, Agarwal A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1922-30.
52. Twigg J, Fulton N, Gómez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 1998; 13: 1429-36.
53. Zalata AA, Christophe AB, Depuydt CE, Schoonjans F, Comhaire FH. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 111-8.
54. Storey BT, Alvarez JG, Thompson KA. Human sperm glutathione reductase activity in situ reveals limitation in the glutathione antioxidant defense system due to supply of NADPH. *Mol Reprod Dev* 1998; 49: 400-7.
55. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa. *J Androl* 1997; 20:61-9.
56. Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum Reprod* 1991; 6(7): 987-91.
57. Zayas LEA, Benítez GM, Ynez LAP, Pérez YQ. Papel del estresse oxidativo en la infertilidad masculina. *Rev Cubana Invest Biomed* 2000; 19(3): 202-05.
58. Alvarez CA, Moraes GV. Efeitos da Selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. *Sábios* 2006; 1(1): 42-51.
59. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 2001; 68(3):519-24.
60. Sharma RK, Said A, Agarwal A. Sperm Dna damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl* 2004; 6: 139-148.
61. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175(1):184-91.

62. Duty SM, Singh NP, Ryan L, Chen Z, Lewis C, Hunag T. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Human Reprod* 2001;17: 1274-80.
63. Vaux DL, Flavell RA. Apoptosis genes and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12: 719-24.
64. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi P, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999;4:31-7.
65. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999;4: 38-47.
66. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of Hum Reprod. *Fertil Steril* 2003; 79:829-843.
67. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15:830-9.
68. Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991;67:879-88.
69. Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993;262:1274-7.
70. Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod* 1997;56: 1020-4.
71. Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci* 1996; 1:78-86.
72. Miesel R, Drzejczak PJ, Kurpisz M. Oxidative stress during the interaction of gametes. *Biol Reprod* 1993; 49: 918-23.
73. Riley JC, Behrman HR. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 198: 781-91.
74. Alkan I, Simsek F, Haklar G, Kervancioglu E, Ozveri H, Yalcin S, Akdas A. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol* 1997; 157: 140-3.
75. Lewis SEM, Boyle PMB, McKinney KA. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1995; 64:868-70.
76. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction* 1989; 40: 183-97.
77. Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril* 1997; 67:1150-20.
78. Zini A, De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl* 1993; 16:183-8.
79. Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 1996; 17: 276- 87.
80. Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Agarwal A. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril* 2004; 81: 349-54.
81. Smith R, Vantman D, Ponce J. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum Reprod* 1996; 11: 1655-60.
82. Pasqualotto FF, Pasqualotto EB, Umezu FM, Salvador M. Níveis de antioxidantes enzimáticos no plasma seminal de homens férteis e inférteis. *Reproducción Humana* 2006; 11-18.
83. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod* 1999; 14(11): 2801-07.

# Tibolone in the perimenopause for the treatment of androgen deficiency

O uso da tibolone na perimenopausa para tratar deficiência androgênica

Hugo Maia Filho, Julio Casoy, Kleber Pimentel, Tânia Correia, Luiz A Freitas, Célia Athayde, Elsimar M Coutinho



Prof.º Hugo Maia Filho

O Professor Hugo Maia Filho é professor de Reprodução Humana, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Diretor de Pesquisa do Centro de Pesquisa e Assistência em Reprodução Humana (CEPARH) e atualmente Diretor Científico da Sociedade Brasileira de Ginecologia Endócrina (SOBRAGE). Sua área de pesquisa atual inclui o efeito de hormônios no endométrio, especialmente sobre a expressão da aromatase.

## RESUMO

A tibolona pode ser usada para tratar a deficiência androgênica na mulher na perimenopausa. O mecanismo de ação mais importante da tibolona é a redução dos níveis de SHBG e o aumento da testosterona livre. A tibolona também ativa a COX-2 no endométrio aumentando o risco de formação de pólipos endometriais. O aumento da testosterona livre com o uso da tibolona leva a um aumento de produção tecidual de estrogênios nos tecidos que expressam aromatase.

**UNITERMOS:** Tibolona; Perimenopausa; Esteroidogênese.

## Androgen Deficiency in Women

Androgen deficiency is a syndrome characterized by a variety of symptoms that include loss of libido, fatigue, loss of energy, osteopenia, decreased muscular mass and premenstrual syndrome. These symptoms start in many patients in the perimenopause, well before complete cessation of ovarian function and are caused by a decline in testosterone production that results in blood levels approximately half those of women in their early 20s<sup>1</sup>. Although circulating androgen levels are substantially lower in women than in men, a syndrome of androgen deficiency can be characterized both clinically and by laboratory measurements of total and free testosterone and SHBG levels<sup>2</sup>. It is generally accepted that the lower blood levels of androgen during menopause, caused either by ovarian failure or an aging-associated reduction in adrenal

androgen production, further aggravate the loss of sexual desire, bone and muscle mass and the sensation of well being; however, the magnitude of these problems can be ameliorated in symptomatic women by androgen supplementation<sup>3</sup>. The age-related decline in androgen production affects both androstenedione and testosterone, with a reduction in blood levels following the cessation of menses to half those present in women of reproductive age. However, most studies on testosterone production during the climacteric years have failed to demonstrate a persistent fall with advancing age, with the possible exception of a reduction around the time of the menopause compared to testosterone levels in the second decade of life<sup>4,5</sup>. Low testosterone levels during this period closely correlate with reduced coital frequency, sexual fantasies and the aggravation of symptoms of the premenstrual syndrome. Treatment with testosterone implants not only reverses the negative effect of androgen insufficiency on sexual desire but also enhances the sensation of well being<sup>5</sup>. Because these symptoms may commence during the perimenopause, well before complete cessation of ovarian function, androgen therapy may be beneficial in ameliorating symptomatology even in patients with normal estrogen levels and regular menstrual cycles.

Centro de Pesquisa e Assistência em Reprodução Humana (CEPARH), Salvador, Bahia.

Correspondência para:  
Professor Hugo Maia Filho  
Diretor de Pesquisas  
Centro de Pesquisa e Assistência em Reprodução Humana (CEPARH)  
Rua Caetano Moura, 35  
40210-340 Salvador, BA.

Whether the reduction in testosterone production during perimenopause actually contributes to the symptoms that occur during this period is controversial. SHBG levels may also play a pivotal role in modulating androgen action by limiting the bioavailability of free testosterone to the tissue. This will ultimately determine the amount of testosterone and estrogens present in the tissues since a part of testosterone is converted into estrogens through the action of aromatases<sup>6,7</sup>. The effects of androgen on tissues correlate inversely with SHBG plasma levels. Thereby, the salivary levels of testosterone, for instance, are higher when SHBG levels in the blood are lower<sup>8</sup>. SHBG levels can thus regulate the action of androgen by increasing the availability of free testosterone to the tissues without affecting total testosterone levels in circulation. Free testosterone can also be aromatized to estradiol in tissues expressing the aromatase p450 enzyme, and this mechanism is important for the extraglandular production of estrogens in the years following the menopause when estrogen production by the ovary ceases<sup>6</sup>. This opens the possibility of treating androgen deficiency during the perimenopause by simply using medications that decrease SHBG levels, thereby augmenting the availability of free testosterone to the tissues. Tibolone may prove to be one of these therapeutic possibilities.

## Effect of tibolone in the perimenopause

Tibolone at the dose of 2.5 mg has been used to alleviate symptoms related to the premenstrual syndrome (PMS) in premenopausal patients. In a placebo-controlled study, patients using tibolone 2.5 mg reported a marked improvement in all symptoms by the end of the second month of treatment when compared to the placebo group. The amelioration of PMS in tibolone users correlated positively with the increase in circulating beta-endorphin levels<sup>9</sup>. Lower doses of tibolone (1.25mg) were also found to be effective in treating the symptoms of PMS and decreased libido in premenopausal patients. This effect was already observed at the end of the first month of treatment. No major effect on menstrual pattern was observed during the treatment period with the 1.25 mg dose and the increase in libido and in the sensation of well-being was significantly greater in the tibolone group when compared to the placebo vitamin group at the end of the third month of treatment<sup>10</sup>. Some of these effects of tibolone are superimposed on those observed with testosterone, and it is possible that they may result from the increase in free testosterone in tibolone users.

## Mechanism of action of tibolone

Following oral administration of tibolone, there is a rapid formation of three metabolites after the first hepatic passage<sup>11</sup>. One of the metabolites, delta-4-tibolone, binds to the androgen receptor in the liver cells, leading to a decrease

in SHBG synthesis. The other two metabolites, alpha and beta hydroxy-tibolone, have a slight affinity to the estrogen receptor and are transported in the circulation in the biologically inactive sulfated form<sup>12</sup>. The tissue-specific action of tibolone is attributed to the different effects of these metabolites. However, it is unlikely that this is the most important mechanism of action of tibolone since these metabolites are transported in the blood in an inactive sulfated form. The mechanism of action of tibolone may be more easily understood if we consider its main action to be through its delta-4 metabolite in the liver, lowering SHBG levels and increasing free testosterone levels in the blood<sup>13</sup>. This will not only increase tissue levels of testosterone but will also result in an increased production of estradiol in the tissues that express aromatase. In perimenopausal patients, this may be one of the mechanisms by which tibolone is able to correct androgen deficiency. On the other hand, organs or tissues such as the bone, brain, skin and vagina normally express aromatase during the aging process, allowing them to produce estrogens from free testosterone, while the normal endometrium is unable to produce them due to the lack of this enzyme<sup>14</sup>. As a consequence of the higher free testosterone levels achieved with tibolone administration, and because of aromatization to estradiol, there will be greater estrogenic action in organs such as the brain, bone and vagina compared to the normal endometrium<sup>15,16</sup>. Endometrial polyps, however, express aromatase and are therefore able to metabolize free testosterone into estradiol<sup>17</sup>. Consequently, endometrial polyps are more commonly seen following tibolone use than after the use of other forms of hormone therapy because they are able to produce estradiol using free testosterone as the precursor hormone<sup>18,19</sup>. Endometrial polyps also express Cox-2 and this expression is upregulated by tibolone<sup>20</sup>. In menopausal patients using tibolone, there was a significant increase in Cox-2 expression in the glandular epithelium that was not associated with any effect on either cell proliferation or on bcl-2 expression as shown in Table I. This argues against the hypothesis that tibolone acts as a progestin on the endometrium. The atrophic endometrium following tibolone use is therefore exposed to chronic elevated levels of Cox-2 expression, which by itself does not stimulate proliferation but may cause bleeding or may ultimately lead to aromatase induction in susceptible patients in response to the high levels of prostaglandins<sup>16</sup>. The activation of aromatase will increase local estrogen production and development of polyps and other proliferative disorders, as shown in Figure 1. In this menopausal patient, there was a focal expression of aromatase in the glands of the basal layer in response to tibolone use, causing a localized area of higher proliferation in the basal layer that may constitute the first hit for the development of an endometrial polyp or other proliferative disorders. The upregulation of Cox-2 expression in the atrophic endometrium of tibolone users may be one of the mechanisms related to the presence of irregular bleeding in these patients.

**Table 1** - Ki-67, Bcl-2 and Cox-2 levels in Tibolone users and never-users

	Tibolone		P*
	User	Never-User	
	Mean ± SD(median)	Mean ± SD(median)	
Ki-67	2.27 ± 1.68% (2%)	2.2 ± 2.3% (2%)	0.817
Bcl-2	2.09 ± 1.4% (3%)	2.6 ± 0.84% (3%)	0.357
Cox-2	1.09 ± 0.83 (1%)	2.7 ± 0.48 (3%)	0.0002

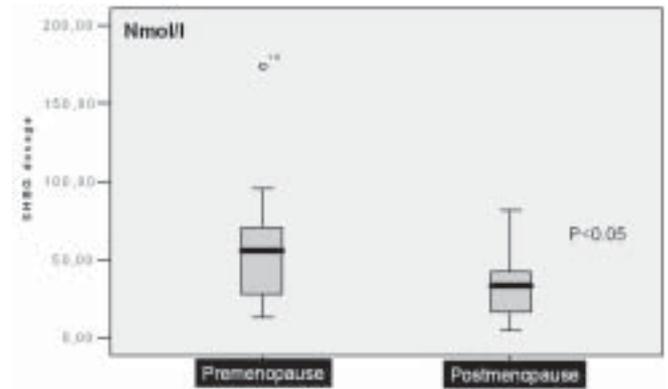
\* Mann-Whitney test.



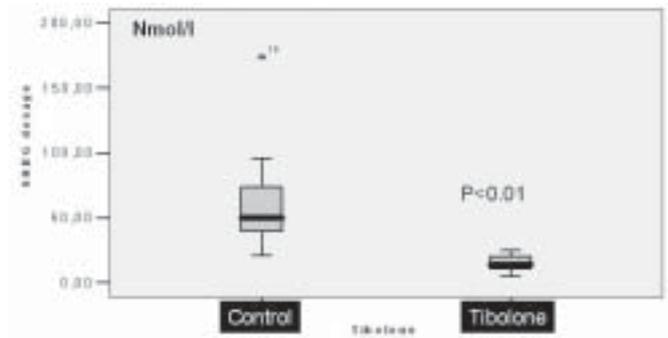
**Figure 1** - Aromatase expression in the endometrial basal layer of a patient using tibolone.

### Effect of low-dose tibolone on SHBG levels

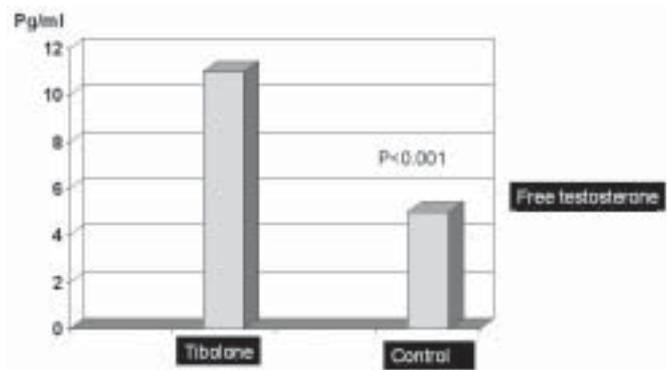
At the dose of 2.5 mg, tibolone was found to be effective in lowering SHBG levels and increasing levels of free testosterone in menopausal patients; however, the effects of lower doses are not yet well-established<sup>13</sup>. In menopausal patients, there is a direct correlation between circulating SHBG levels and the risk of developing osteoporosis<sup>21</sup>. Because lower doses of tibolone are effective in preventing osteoporosis<sup>22</sup>, it is important to determine whether tibolone is effective in reducing SHBG levels in menopausal patients at the dose of 1.25 mg, resulting, therefore, in higher blood levels of free testosterone. There is an age-related reduction in SHBG production by the liver, resulting in lower levels in older patients. This was also observed in our population, and this reduction remained significant even when it was corrected for body mass in order to compensate for its increase during aging (Figure 2). Low doses of tibolone (1.25 mg) were effective in reducing SHBG levels in menopausal patients, leading to a reduction of more than 50% in their blood levels when compared to controls (Figure 3). The drop in SHBG levels was accompanied by a rise in blood levels of free testosterone with no major increase in total testosterone levels (Figure 4). These findings may explain the effectiveness of low doses of tibolone in treating menopausal symptoms and preventing osteoporosis<sup>22</sup>.



**Figure 2** - SHBG levels in pre- and postmenopausal patients.



**Figure 3** - Effect of low dose tibolone (1.25mg) on SHBG levels.



**Figure 4** - Effect of low dose tibolone (1.25mg) on free testosterone levels.

## Conclusions

Tibolone is an alternative for treating mood-related symptoms during the perimenopause in patients who still have ovulatory cycles<sup>9,10</sup>. One important mechanism by which tibolone is clinically effective in controlling mood changes is by lowering SHBG levels and increasing circulating free testosterone levels<sup>13</sup>. This results not only in higher brain levels of testosterone, but also in an increase in estrogens through the action of aromatase p450. It was recently reported that testosterone can prevent Alzheimer's disease, and one likely explanation is its aromatization to estradiol in brain tissue<sup>23</sup>. Lower levels of SHBG in circulation are also associated with a decreased risk of developing Alzheimer's disease. In perimenopausal patients with symptoms related to androgen deficiency, the use of tibolone can ameliorate these symptoms by increasing free testosterone levels in circulation<sup>24</sup>. Testosterone has a positive impact on the sensation of well-being and this is caused by the increase in endorphin levels in the brain<sup>25, 26, 27</sup>. There is evidence that in order to raise estrogen levels in the brain it may be more effective to give women testosterone rather than estrogens<sup>27</sup>. In this context, drugs such as tibolone, which greatly increase free testosterone levels, should be the first line of treatment. Interesting therapeutic possibilities that merit further investigation include the association of tibolone with testosterone in the form of subdermal implants or vaginal suppositories. By lowering SHBG levels, tibolone would act synergistically with the supplementary testosterone, thereby increasing tissue levels of both estrogens and androgens. This may prove beneficial not only to patients in greater need of regaining bone and muscle mass but also in achieving a faster response in boosting mood and libido. In addition, vaginal administration of testosterone may be useful in increasing the strength of pelvic muscular ligaments, which may be beneficial not only in ameliorating stress urinary incontinence but also in improving genital sexual arousal. Tibolone may represent the form of hormone therapy that most closely mimics nature during the climacteric. With aging, there is a decrease in circulating SHBG levels and an increase in aromatase activity in certain tissues in order to permit tissue production of estrogens from androgen precursors. This mechanism is the predominant pathway of estrogen production during menopause and consequently one effective way of replacing ovarian steroids in both peri- and postmenopausal women is by increasing the bioavailability of androgen precursors rather than giving exogenous estrogens<sup>27</sup>. The stimulation of estrogen tissue production by increasing the availability of unbound androgens should be the physiological way of replacing estrogens in the menopause, and in this respect tibolone given alone or in association with low doses of testosterone is certainly one of the effective ways of accomplishing this therapeutic goal. The beneficial effects of tibolone on the premenstrual syndrome also open new therapeutic possibilities, and suggest a pivotal role for testosterone and endorphins in the amelioration of these

symptoms<sup>9,25</sup>. Low androgen levels also play a role in the occurrence of hot flashes during perimenopause, and androgen receptors have been found in brain areas related to the regulation of hot flashes. Perimenopause is a critical period because androgen levels drop to half of those found in the second decade of life, although they remain rather stable thereafter. Therefore, the clinical manifestations of androgen insufficiency, especially loss of libido, fatigue and mood disorders may precede menopause and may be alleviated with the use of tibolone. For this reason, tibolone should be prescribed to symptomatic patients during the perimenopause.

---

## ABSTRACT

Tibolone may be used to treat androgen deficiency in women in the perimenopause. The most important mechanism of action is the reduction in SHBG levels and an increase in free testosterone levels. Tibolone also activates COX-2 in the endometrium, increasing the risk of forming endometrial polyps. The increase in free testosterone with the use of tibolone leads to an increase in the production of estrogens in the tissues that express aromatase.

**UNITERMS:** Tibolone; Perimenopause; Steroidogenesis

---

### *Acknowledgment*

*Tibolone 1.25 mg is manufactured in Brazil by Libbs Farmacêutica Ltda.*

---

## Referências Bibliográficas

1. Mazer NA. Testosterone deficiency in women: Etiologies, Diagnosis and Emerging Treatments. *Int J Fertil Womens Med.* 2002; 47:77-86.
2. Zumoff B, Strain GW, Miller LK, Rosner W. Twenty-four-hour mean plasma testosterone concentration declines with age in normal premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:1429-30.
3. Papalia MA, Davis SR. What is the rationale for androgen therapy for women? *Treat Endocrinol.* 2003; 2:77-84.
4. Longcope C, Baker S. Androgen and estrogen dynamics: relationships with age, weight and menopausal status. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 76:601-4.
5. Davis SR, Tran J. Testosterone influences libido and well being in women. *Trends Endocrinol Metab.* 2001; 12:33-7.

6. Simpson ER. Aromatization of androgens in women: current concepts and findings. *Fertil Steril*. 2002; 77 Suppl 4:S6-S10.
7. Fortunati N. Sex hormone-binding globulin: not only a transport protein. What news is around the corner? *J Endocrinol Invest*. 1999; 22:223-34.
8. Orozco P, Navarro MA, Nolla JM. Salivary testosterone is associated with higher lumbar bone mass in premenopausal healthy women with normal levels of serum testosterone. *Eur J Epidemiol*. 2000; 16:907-12.
9. Taskin O, Gokdeniz R, Yalcinoglu A, Buhur A, Burak F, Atmaca R, Ozekici U. Placebo-controlled cross-over study of effects of tibolone on premenstrual symptoms and peripheral beta-endorphin concentrations in premenstrual syndrome. *Hum Reprod*. 1998; 13:2402-05.
10. Maia Jr H, Athayde C, Coutinho EM. Effect of Low Dose Tibolone in Perimenopausal Patients. *Climacteric & Suppl* (2), pp80, 2005.
11. Vos RM, Krebbers S, Verhoeven C, Delbressine L. The in vivo human metabolism of tibolone. *Drug Metab Dispos* 30:106-12, 2002.
12. Kloosterboer HJ. Tibolone: a steroid with tissue-specific mode of action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76:231-238, 2001.
13. Odmark IS, Carlstrom K, Jonsson B, Jonasson AF. Conjugated estrogen/progestogen versus tibolone hormone replacement therapy in postmenopausal women. Effects on carbohydrate metabolism and serum sex hormone binding globulin. *Maturitas* 53:89-96, 2006.
14. Attar E. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. *Hum Reprod Update* 12:49-56, 2006.
15. Zeitoun K, Bulun SE. Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target. *Fertil Steril* 72: 961-69, 1999.
16. Purohit A, Ghilchik MW, Leese MP, Potter BV, Reed MJ. Regulation of aromatase activity by cytokines, PGE2 and 2-methoxyoestrone-3-O-sulphamate in fibroblasts derived from normal and malignant breast tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94:167-72, 2005.
17. Maia H Jr, Pimentel K, Correia T, Freitas LA, Zausner B, Athayde C, Coutinho EM. Aromatase and Cox-2 expression in endometrial polyps during the menstrual cycle. *Gynecol Endocrinology* 22(4):219-224, 2006.
18. Maia H, Machado S, Borges S, Chagas A, Maltez A, Coutinho EM. Hysteroscopic findings in postmenopausal patients using tibolone. *Gynaecological Endoscopy* 11:2-3, 131-135, 2002.
19. Perez-Medina T, Bajo-Arenas J, Haya J, Sanfrutos L, Iniesta S, Bueno B, Castelo-Branco C. Tibolone and risk of endometrial polyps: a prospective, comparative study with hormone therapy. *Menopause* 10:534-7, 2003.
20. Maia H Jr, Correia T, Freitas LA, Athayde C, Coutinho E. Cyclooxygenase-2 expression in endometrial polyps during menopause. *Gynecological Endocrinology* 21:336-9, 2005
21. Chapurlat RD, Garnero P, Breart G, Meunier PJ, Delmas PD. Serum estradiol and sex hormone-binding globulin and the risk of hip fracture in elderly women: the EPIDOS study. *J Bone Miner Res* 15(9):1835-41, 2000.
22. Gambacciani M, Ciapponi M, Cappagli B, Monteleone P, Benussi C, Bevilacqua G, Genazzani AR. A longitudinal evaluation of the effect of two doses of tibolone on bone density and metabolism in early postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 18(1): 9-16, 2004.
23. Carruthers M. *Androgen Deficiency in the Adult Male*. Taylor & Francis, London and New York pp 179-82, 2004
24. Davis SR. The effects of tibolone on mood and libido. *Menopause* 9:162-70, 2002.
25. Genazzani AR, Petraglia F, Facchinetti F, Grasso A, Volpe A. Steroid replacement treatment increases beta-endorphin and beta-lipotropin plasma levels in postmenopausal women. *Gynecol Obstet Invest* 26:153-9, 1988.
26. Adams LA, Vician L, Clifton DK, Steiner RA. Testosterone regulates pro-opiomelanocortin gene expression in the primate brain. *Endocrinology* 128(4):1881-6, 1991.
27. Coutinho EM, Erdens C, Maltez A, Maia Jr H. Long term testosterone replacement therapy with slow release silastic implants. In: Genazzani A (Eds): *Advances in Gynecological Endocrinology*. Parthenon Publishing Group, London, p259-66, 2002.

# O laboratório de Andrologia como ajuda diagnóstica para casais pesquisando infertilidade

Andrology laboratory as a diagnostic help in infertility work-up

Luana Venturin Lara, Cláudia Concer Viero, Eleonora Bedin Pasqualotto, Fabio Firmbach Pasqualotto



Dr. Fabio Pasqualotto

O Dr. Fabio Pasqualotto possui graduação em Medicina pela Universidade de Caxias do Sul (1993), Fellowship em Andrologia e Infertilidade Masculina pela Cleveland Clinic Foundation (1999), mestrado em Urologia pela Universidade de São Paulo (2001) e doutorado em Urologia pela Universidade de São Paulo (2002). Atualmente é Professor Titular da Universidade de Caxias do Sul. Tem inúmeras publicações sobre infertilidade masculina no Brasil e no exterior.

## RESUMO

Toda alteração da função endócrina ou exócrina do testículo se reflete de alguma maneira em modificações no espermograma, tanto em seus aspectos morfológicos quanto nos funcionais. Daí a importância de um estudo exaustivo do sêmen para avaliar a capacidade reprodutiva do homem.

Ao espermograma, que ainda segue sendo a pedra angular para o estudo do homem, tem sido incorporando novos testes diagnósticos. O conceito de que uma boa análise do sêmen é de fundamental importância para a avaliação da fertilidade masculina ainda permanece, apesar de sabermos que o espermograma não pode ser considerado um “teste de fertilidade”, e sim o primeiro indicador de que o ciclo hormonal e da espermatogênese está sem maiores alterações.

**UNITERMOS:** sêmen, espermatozóide, andrologia, infertilidade masculina

## Introdução

A ausência de critério de alguns investigadores e a falta de padrões internacionais adequados para administrar tem influído negativamente no desenvolvimento desta especialidade bioquímica. Ao avaliar a motilidade e morfologia espermática observa-se que existem dificuldades na avaliação dos variados métodos de coleta do sêmen e na eleição da abstinência sexual. Desta forma, é necessário ter um critério amplo para unificar os distintos conceitos sustentados pelos investigadores ligados a este tema, como ocorreu, por exem-

plo, para a definição do espermatozóide considerado “normal”<sup>1</sup>. O mesmo tem ocorrido com o estudo bioquímico do plasma seminal, assim como outros parâmetros do ejaculado.

Freqüentemente, o dilema central que deve afrontar o andrologista ou ginecologista ao avaliar um casal infértil é a impossibilidade de realizar uma adequada avaliação da capacidade do homem para estabelecer gravidez na parceira. Desta forma, a análise de sêmen, realizada de forma convencional, foi desenvolvida com o intuito de contribuir com informação diagnóstica e se passou a crer que a concepção *in vivo* se produz somente se há no ejaculado um certo número de espermatozóides móveis e morfológicamente normais. Associado a isto, existe também a intenção de igualar o termo anormal com o de infértil ou subfértil (1). Na realidade, a anormalidade de uma variável seminal significa simplesmente que o parâmetro em questão está desviado do normal. Essa determinação poderia ser causa de infertilidade dependendo de outros fatores, como por exemplo, da magnitude e gravidade do estado reprodutivo da esposa.

É importante destacar que a fertilidade não existe simplesmente porque uma variável do sêmen é anormal<sup>2</sup>. Como

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Caxias do Sul, RS e CONCEPTION – Centro de Reprodução Humana, Caxias do Sul, RS, Brasil

Endereço para correspondência:

Fabio Firmbach Pasqualotto

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Caxias do Sul, Rua Pinheiro Machado, 2569, sl 23, Bairro São Pelegrino, Caxias do Sul, RS, Brasil

Fone 54 3214 4095, FAX: 54 3215 1695

e-mail: pasquaf@hotmail.com

Fabio@conception-rs.com.br

por exemplo, podemos mencionar as variações detectadas em 2 ejaculados consecutivos (intervalo de 15 dias entre as coletas) do mesmo paciente. Além disso, existem algumas anormalidades que têm um efeito superior às demais sobre a fertilidade. Assim sendo, um valor anormal em qualquer variável seminal não significa necessariamente infertilidade, e sim que a amostra difere de outra normal e que suas possibilidades de ser fértil talvez possam estar diminuídas<sup>3</sup>. Podemos então afirmar que somente quando um ou mais indicadores se enquadram dentro desta categoria, o ejaculado poderia ser considerado realmente como infértil.

Quando falamos de um espermograma convencional, estamos nos referindo a 2 práticas, a saber:

**Análise seminal básica**, com as seguintes determinações: a) volume, cor, viscosidade e pH, b) concentração de espermatozoides por mL e no volume total; b) motilidade espermática; c) viabilidade (teste de eosina ou edema hiposmótico).

**Análise seminal completa**, no que ao anterior se agregam: d) estudo morfológico de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS); e) número e diferenciação de células redondas e f) estudo bioquímico do plasma seminal (2 parâmetros pelo menos). Além disto, testes de Função espermática, como o estudo da morfologia pelo critério estrito de Kruger, as Espécies Reativas de Oxigênio, Antioxidantes (estes dois últimos ainda em fase de estudos).

A concentração de gametas na análise seminal convencional se realiza comumente de forma manual utilizando hematocitômetros ou câmaras específicas como a de Makler. É necessário que a análise seminal contenha, além disso, algum teste de viabilidade espermática. Em geral são correlações vitais que se efetuam sobre preparados frescos<sup>4</sup>. O ejaculado contém também outros elementos, além de espermatozoides, como por exemplo, células epiteliais, leucócitos e aquele produto da escamação do epitélio germinal. A diferenciação desta população celular se pode realizar de forma simples por qualquer técnica de peroxidase (Endtz)<sup>6</sup>. Este método de coloração tem demonstrado sua eficácia na diferenciação dos leucócitos polimorfonucleares (peroxidase positivos) das células germinativas imaturas e linfócitos que são peroxidase negativos.

Outro aspecto importante contemplado na análise seminal é o estudo da bioquímica seminal (avaliação do plasma seminal). Como se tem estabelecido, as glândulas anexas ao aparato sexual masculino possuem uma estrutura muito especializada que se encontram sob controle endócrino (andrógenos) e neural. Apesar do papel fisiológico desta secreção não estar totalmente esclarecido ainda, é racional pensar que uma secreção de tão alta complexidade exista somente como veículo de transporte dos espermatozoides. Por outro lado, existe uma grande quantidade de estudos publicados sobre as disfunções das glândulas anexas, as quais estão associadas a infecções tanto clínicas como subclínicas que podem causar prejuízos na fertilidade conjugal<sup>2,3,6</sup>. Como detectores da funcionalidade das vesículas seminais, se utiliza comumente a avaliação da frutose ou então a determinação de prostaglandinas; por sua vez, para a funcionalidade prostática pode-se usar a fosfatase ácida, o ácido cítrico ou a

determinação de zinco e para o epidídimo, a carnitina, o glicerilfosforilcolina e a alfa glicosidase.

## Morfologia

Desde muitos anos se conhecem as freqüentes divergências nos resultados produzidos por diferentes laboratórios, e ainda entre técnicos que trabalham em um mesmo laboratório<sup>7</sup>. É por isso que o estudo da morfologia espermática é uma das determinações seminais que requerem grande experiência por parte do técnico e um grande cuidado, não só na realização do estudo, mas também na eleição do sistema de expressão dos resultados. Os pesquisadores têm realizado verdadeiros esforços com o objetivo de obter dados reproduzíveis e precisos. A incorporação dos estudos que utilizam “critérios estritos como o de Kruger” como diagnóstico morfológico tem permitido um avanço importante e tem dado um novo impulso ao desenvolvimento dessa especialidade<sup>8</sup>.

Nos últimos anos o tema da morfologia espermática tem merecido uma atenção especial entre os profissionais dedicados a esta área da reprodução humana<sup>9</sup>. Comprova-se a importância da morfologia quando se avalia estudo recente, o qual demonstrou que dentre as três características seminais mais importantes do sêmen (concentração, motilidade e morfologia) a morfologia de Kruger é a mais importante para prever fertilidade<sup>9</sup>.

Existem na literatura numerosos trabalhos demonstrando que a citologia seminal em humanos é um expoente real das características morfológicas do epitélio germinativo e é, além disso, um indicador das mudanças produzidas no epitélio. Logo, em condições fisiológicas, os componentes celulares do ejaculado representam qualitativamente e quantitativamente o epitélio germinativo. É sabido que o sêmen humano contém um certo número de espermatozoides anormais. Estas anormalidades podem compreender em alguns casos somente certos componentes celulares, e em outros toda a célula com modificações da cabeça, peça intermediária e cauda.

Por último, devemos destacar que a introdução dos critérios estritos no estudo da morfologia espermática apon-tou um novo conceito no campo da avaliação morfológica e permitiu, pela primeira vez, que a descrição de um espermatozói-de normal fosse realizada com base em evidências biológicas<sup>10</sup>. Na realidade, a denominação de estrito não se refere somente à medida, mas também à rigorosa aplicação das categorias permitidas para avaliar os gametas normais.

O primeiro detalhe a levar em conta quando se estuda uma amostra é a estrutura dos espermatozoides normais, re-presentando suma importância que nunca será suficientemente enfatizada. Um espermatozói-de com boa morfologia (especialmente do seu acrossoma) parece ter uma importância principal para prever êxito na fertilização *in vitro*<sup>11</sup>. O tamanho do acrossoma desempenha um papel preponderante no momento de definir um espermatozói-de como considerado “idealmente normal”. Isto se deve à capacidade fertilizante que implica seu conteúdo de acrosina. Os espermatozoides

com alongamento grave não se encontram unidos à zona, enquanto que os ligeiramente ovais ou piriformes podem fazê-lo sempre que apresentem uma região acrossômica similar a dos normais<sup>12</sup>.

Tem-se demonstrado que a morfologia espermática, considerada em termos da proporção de formas normais está significativamente relacionada com a concepção *in vivo*, com a fertilização *in vitro* e com alguns testes de função espermática<sup>13,14</sup>. Recentemente alguns autores opinaram que é desvantajoso estudar o tamanho da cabeça espermática em colorações fixadas, já que se desconhece a viabilidade e a motilidade das células em estudo.

## Testes de função espermática

Com o advento dos métodos de reprodução assistida de baixa e alta complexidade, o laboratório de Andrologia deve realizar muitos esforços para desenvolver novos testes que revelem melhor a função espermática. Lamentavelmente, um único teste não é capaz de determinar a funcionalidade do gameta masculino. Faz-se necessário implementar uma série de determinações dirigidas a diferentes organelas do gameta, de tal maneira que componham uma bateria de determinações para alcançar esse objetivo. Entretanto, muitas vezes, por motivos eminentemente práticos, nos vemos impossibilitados de realizar várias determinações em todos os pacientes. Todos os espermatozoides de um ejaculado não são iguais do ponto de vista funcional, mas até o presente não se conhecem quais são os atributos que diferenciam um espermatozoide fértil daquele que não o é.

Sabemos que existe um grande número de defeitos ou diferenças que fazem com que um espermatozoide possa ser subfértil. Se uma proporção apreciável destes gametas defeituosos está presente em determinada amostra seminal, poderíamos estar em presença de uma subfertilidade ou então interpretar que a amostra tem uma probabilidade menor de fertilizar o óvulo.

Um teste muito importante é que determina a viabilidade celular. Geralmente se aconselha a realização de um teste hiposmótico com o objetivo de completar o estudo da integridade anátomo-funcional da membrana plasmática<sup>15</sup>. Este método se baseia na capacidade que tem a cauda do espermatozoide maduro normal de se edemaciar. Os gametas que evidenciam modificações (por microscopia óptica com contraste de fase) são considerados reativos e íntegros desde o ponto de vista funcional<sup>15,16</sup>.

Um dos parâmetros bioquímicos que tem sido muito estudado nos últimos anos são as Espécies Reativas de Oxigênio. Radical livre pode ser definido como qualquer molécula que possua um ou mais elétrons não-pareados<sup>17,18</sup>. A toxicidade ao oxigênio é um fenômeno inerente a todas as espécies que necessitam de ambiente aeróbio para a sua sobrevivência. Assim como outras células que vivem em condições aeróbias, a produção de ERO pelos espermatozoides origina-se principalmente da atividade metabólica normal. O espermatozoide

humano produz  $O_2^{\cdot-}$  o qual, espontaneamente ou por meio de enzimas, se transforma em  $H_2O_2$ . Devido à sua baixa reatividade e meia-vida, o  $O_2^{\cdot-}$  não é muito prejudicial aos espermatozoides. Entretanto, o  $H_2O_2$  é relativamente estável e possui um grande potencial oxidativo, podendo atravessar livremente as membranas dos espermatozoides.

Estresse Oxidativo (OS), é definido como uma situação onde existe uma concentração elevada de ERO devido à sua hiperprodução ou diminuição dos mecanismos de defesa denominados antioxidantes. Desta forma, para que exista o estresse oxidativo é necessário um desequilíbrio entre produção de ERO e neutralização das ERO<sup>19-25</sup>. Um aumento nas ERO no sêmen e secreção vaginal pode induzir o Estresse Oxidativo; concomitantemente, uma diminuição na atividade antioxidante correlaciona-se com infertilidade idiopática.

Estresse Oxidativo moderado ou até mesmo baixo por um longo período pode alterar o estado de condensação do DNA do espermatozoide, um efeito que pode não ser observado antes da fertilização. Efeitos diretos e indiretos das Espécies Reativas de Oxigênio nas células podem ser resumidos em três categorias distintas, que incluem: o Ácido Ribonucleico (RNA) e Ácido Desoxirribonucleico (DNA), Peroxidação Lipídica - afetando primariamente a estrutura e a função da membrana celular - e as proteínas.

Os níveis do Estresse Oxidativo dependem do sítio de produção das ERO envolvidas, ou seja, se elas são produzidas pelos neutrófilos (extracelular) ou pelos espermatozoides (intracelular). É importante destacar que apenas 30% das ERO produzidas pelos espermatozoides são liberadas no meio extracelular. O envolvimento de uma determinada espécie reativa de oxigênio pode depender de condições de incubação (por exemplo, meio e indutor) e do espermatozoide. Além disso, o sítio de produção e o momento no qual o espermatozoide entra em contato com as ERO determinam a presença ou não de infertilidade. Todavia, é importante destacar que existe grande variabilidade nos níveis do Estresse Oxidativo mesmo em homens inférteis.

As membranas celulares estão sujeitas ao ataque das ERO por possuírem grande conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados nos fosfolípidios, os quais são particularmente sensíveis a reações oxidativas. A natureza insaturada das moléculas (ligação dupla) predispõe os espermatozoides ao ataque das ERO e a Peroxidação Lipídica da membrana plasmática<sup>26</sup>. Devido à presença de oxigênio ser abundante nas membranas em virtude do seu caráter hidrofóbico, a rápida adição de oxigênio leva à formação de radicais peroxila. A propagação da LPO acontece por causa da abstração de hidrogênio dos grupos metileno de outro ácido graxo poliinsaturado pelos radicais peroxila, levando a uma reação em cadeia, culminando na geração de hidroperóxidos lipídicos. Uma vez iniciado tal processo, o acúmulo de peróxidos lipídicos ocorre na superfície levando à disfunção ou até à morte do espermatozoide. A Peroxidação Lipídica está geralmente associada com uma diminuição da função e viabilidade espermática, mas igualmente apresenta um efeito potencializador na habilidade do espermatozoide para se ligar a zonas pelúcidas homólogas.

Enzimas que neutralizam as ações das ERO incluem a superóxido dismutase (SOD) e a catalase, as quais também são detectadas em espermatozoides de diferentes espécies. De maneira similar, um sistema antioxidante de enzimas neutralizantes contendo selênio - a Glutathione Peroxidase (GPX)/Glutathione Redutase (GRD) - existe nos espermatozoides de diferentes espécies animais, incluindo os humanos<sup>21</sup>. Este sistema tem a capacidade de atuar diretamente como antioxidante ou inibidor da LPO. De fato, os antioxidantes, neutralizadores das ERO geralmente encontrados, tais como a catalase e a SOD, embora muito efetivos quando as ERO são produzidas no nível extracelular, são relativamente ineficazes quando a produção de ERO é intracelular.

Outras substâncias no sêmen podem igualmente agir como neutralizadoras das ERO. Proteínas como a albumina e pequenas moléculas, tais como a hipotaurina, taurina, piruvato e glutathione e vitaminas E e C também podem proteger os tecidos contra o Estresse Oxidativo<sup>27</sup>.

O papel benéfico da terapia medicamentosa relacionada à interferência das ERO na infertilidade masculina tem recebido muita atenção nos últimos anos. Ainda que existam muitas evidências revelando o papel desempenhado pelas ERO em pacientes com infertilidade, o debate em relação ao valor dos antioxidantes na melhora dos parâmetros seminais permanece. A concentração e o tipo do antioxidante a ser administrado nos pacientes inférteis permanecem por serem estabelecidos. Antioxidantes talvez sejam benéficos apenas nos casos de infertilidade, onde a etiologia da infertilidade seja o Estresse Oxidativo.

Um outro aspecto que tem sido muito estudado nos últimos anos é o conteúdo nuclear dos espermatozoides. No processo de fertilização, o espermatozoide necessita que seu DNA seja capaz de descondensar-se no momento oportuno. Recentemente, muita atenção tem sido dada na elevada porcentagem de espermatozoides com alterações na estrutura do DNA, e este fato teria valor preditivo de fertilidade ou subfertilidade. A integridade da estrutura da cromatina espermática depende de fatores endógenos, incluindo a maturação espermática e fatores exógenos como o dano oxidativo do DNA, que pode aumentar por infecções ou agentes tóxicos. Nos últimos anos, se tem desenvolvido métodos como o de eletroforese em gel das células (COMETA), o desoxinucleotídeo transferase terminal, mediante a determinação de encaixes terminais (TUNEL) e o ensaio de estrutura da cromatina espermática (SCSA)<sup>3</sup>.

O laboratório de andrologia continua hoje aplicando métodos mais simples que os mencionados, como testes que permitem um diagnóstico aceitável com um custo compatível às necessidades atuais<sup>2,3,28,29</sup>.

## Conclusão

Devido ao fato de que 40 a 50% das causas de infertilidade conjugal o homem é o responsável, o laboratório de andrologia tem dobrado seus esforços para incorporar ao

arsenal analítico alguns testes simples e práticos, que permitam ao especialista em medicina reprodutiva ter um conhecimento do paciente que facilite o diagnóstico.

Com o intuito de responder a alguns questionamentos ainda não solucionados, a incorporação nos laboratórios modernos de andrologia de técnicas moleculares tem ocorrido em poucas instituições de ensino/pesquisa/vida privada, apesar de ser incontestável que o futuro se dirija para esta direção. É por isso que cremos que o andrologista clínico pode necessitar de uma informação mais completa possível e esta se obterá por meio do laboratório de Andrologia, de genética, do patologista que realiza microscopia eletrônica das amostras, assim como dos estudos hormonais realizados pelo laboratório de análises clínicas.

Infelizmente, todos que trabalham com reprodução humana possuem pleno conhecimento de que nem todos os laboratórios ajustam seus métodos às regras difundidas periodicamente pela OMS por meio de seus manuais ou ESHRE com suas atualizações ou cursos de aperfeiçoamento. Além disso, muitos nem realizam controle de qualidade, nem efetuam verificações intra e interobservador nem possuem normas de aprendizagem para os encarregados de realizar estas práticas. Por isso, é aconselhável dedicar um tempo a estes controles que, sem dúvida, beneficiam a andrologia.

---

## ABSTRACT

Any abnormality in the endocrine or exocrine function of the testis reflects in a way modification in the semen analysis, either in the morphological or functional aspects.

To the semen analysis, that is the cornerstone for the male evaluation, new diagnostic tests have been incorporated. The concept that a good semen analysis is of fundamental importance for the evaluation of male fertility is still correct, despite of the fact that the semen analysis is not considered a fertility test, but the first indicator that the hormonal cycle and the spermatogenesis doesn't have important abnormalities.

**UNITERMS:** semen, sperm, andrology, male infertility

---

## Referências Bibliográficas

1. Jeyendran RS. Interpretation of semen analysis results. Cambridge: Univ. Press UK; 2000.
2. Pasqualotto FF, Pasqualotto EB. Infertilidade masculina. In Pinotti JA, Fonseca M, e Bagnolli VR., editores. Tratado de Ginecologia. São Paulo: Revinter; 2004.p. 405-425.

3. Pasqualotto FF, Hallak J, Pagani RL. Avanços na investigação do homem infértil - Testes de função espermática. In: Wroclawski ER, Borges E Jr, Torres LO. II Consenso Brasileiro de Infertilidade Masculina. 2003. p. 35-44.
4. WHO World Organization Laboratory Manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge :Univ. Press. UK; 1996.
5. Shekarriz M, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12: 70-4.
6. Pasqualotto FF, Zanettini LA. Infertilidade de causa masculina. In: Boff R, Kavanagh J. *Ginecologia e Mastologia - um guia prático*. Caxias do Sul, 2002. v. 1, p. 171-189.
7. Davis RO, Gravance CG. Standardization of specimen preparation, staining and sampling methods improves automated sperm-head morphology analysis. *Fertil Steril*. 1993; 59: 412-6.
8. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in "in vitro" fertilization. *Fertil Steril*. 1986; 46: 1118-22.
9. Guzik DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu F, Vogel DL. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001; 345: 1388-93.
10. Morgentaler A, Fung MY, Harris DH, Douglas Power R, Alfern MM. Sperm morphology and in vitro fertilization outcome: a direct comparison of WHO and strict criteria morphology. *Fertil Steril*. 1995; 64: 1177-81.
11. Garret C, Lin DY, Baker HWG. Selectivity of the human sperm-zona pellucida binding process to sperm head morphology. *Fertil Steril*. 1997; 67: 362-7.
12. Liu DY, Baker HWG. Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *J Reprod Fertil*. 1992; 94: 71-6.
13. Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Interrelation among the characteristics of human semen and a new system for classification of male infertility. *Fertil Steril*. 1984; 41: 95-9.
14. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JR, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in "in vitro" fertilization. *Fertil Steril*. 1988; 49: 112-7.
15. Jeyendran RS, Zaneveld LJD. Controversies in the development and validation of new sperm assays. *Fertil Steril*. 1993; 59: 726-30.
16. Jeyendran RS, van der Ven HH, Perez Pelaez M, Crabo B and Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*. 1984; 70: 219-22.
17. Pasqualotto FF. O papel do estresse oxidativo em pacientes inférteis com varicocele. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2001, p. 150.
18. Pasqualotto FF. Relação do estresse oxidativo, características seminais e diagnósticos clínicos em homens submetidos à investigação infertilidade masculina. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2002, p. 130.
19. Kolettis P, Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Elevated seminal reactive oxygen species and depressed total antioxidant capacity in infertile men after vasectomy reversal. *Fertil Steril*. 1999; 71: 249-55.
20. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. ROS-TAC is a novel marker of oxidative stress. *Hum Reprod* 1999; 14: 2801-7.
21. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril* 2000; 73: 459-64.
22. Potts JM, Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Agarwal A. Association of *Ureaplasma urealyticum* infection with abnormal seminal reactive oxygen species and absence of leukocytospermia. *J Urol* 2000; 163: 1775-8.
23. Pasqualotto FF, Sharma RK, Kobayashi H, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Oxidative stress in normospermic men undergoing fertility evaluation. *J Androl*. 2001; 22(2): 316-22.
24. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Role of leukocytospermia in oxidative stress. *J Androl*. 2001; 22: 575-83.
25. Nallella KP, Allamaneni SSR, Pasqualotto FF, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship of Interleukin-6 with Semen Characteristics and Oxidative Stress in Patients with Varicocele. *Urology* 2004; 64: 1010-13.
26. Pasqualotto FF, Pasqualotto EB. The role of biochemical markers in male reproduction. *OBS & GYNNAE Today* 2004; 9: 301-7.
27. Kessopoulou E, Powers HJ, Sharma KK, Pearson MJ, Russell JM, Cooke ID, and Barrat CLR. A double-blind randomized placebo crossover controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated with male infertility. *Fertil Steril* 1995; 64: 825-31.
28. Pasqualotto FF, Pasqualotto EB. Tratamento clínico da astenozoospermia. In: Wroclawski ER, Bendhack DA, Damião R, Ortiz V. *Guia Prático de Urologia*. São Paulo; 2003. v. I, p. 149-150.
29. Pasqualotto FF, Locambo CV, Athayde KS, Arap S. Measuring male infertility: epidemiological aspects. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 2003; 58: 173-178.

# Anti-Müllerian hormone: biomarker of ovarian reserve

Hormônio anti-mulleriano: biomarcador da reserva ovariana

Juliano Augusto Brum Scheffer, Renato Fanchin, René Frydman



Dr. Scheffer

O Dr. Scheffer possui Fellowship em Reprodução Humana no Instituto Valenciano de Infertilidade – IVI- Madrid, Espanha, e pós-graduação em Reprodução Humana no Serviço de Medicina da Reprodução do Hospital Antoine Béchère, Paris, França. É especialista em Reprodução Humana pela Universidade Paris V, membro do Serviço de Pesquisa e do Corpo Clínico do Serviço de Reprodução Humana do Hospital Antoine Béchère, Paris, França.

## RESUMO

**OBJETIVO:** Examinar a hipótese que o nível sérico do AMH reflete a reserva ovariana.

**MATERIAL E MÉTODOS:** Nós estudamos 116 candidatas à FIV-TE submetidas a estimulação ovariana controlada (COH) com agonista de GnRH e FSH. Depois de atingir a supressão da hipófise e antes da administração de FSH, o nível sérico de AMH foi avaliado. O número de folículos antrais foi determinado pelo ultra-som (folículo antral precoce; 3-10 mm).

**RESULTADOS:** O nível sérico do AMH mostrou correlação negativa com a idade ( $r=-0.21$ ;  $P<0.01$ ) e positiva com o número de folículos antrais precoce ( $r=0.64$ ;  $P<0.0001$ ).

**CONCLUSÃO:** Esse dado demonstra a associação do AMH com a quantidade de folículos antrais. Sendo assim, o AMH configura-se como um provável biomarcador do status folicular ovariano.

**UNITERMOS:** Hormônio anti-mulleriano, Quantidade de folículos antrais, Idade, Reserva ovariana

## Introduction

In adult women, the physiological role of anti-Müllerian hormone (AMH), a peptide that exclusively is produced by the granulosa cells of ovarian follicles<sup>1</sup> remains to be established. Basic research experiments suggest the involvement of AMH in the control of the primordial to primary follicle growth in mice<sup>2,3</sup>. Moreover, growing evidence indicates that AMH is also implicated in the regulation of the responsiveness of early antral follicles to FSH. Indeed, Durlinger *et al.*<sup>4</sup> have demonstrated that ovaries from 4-month-old, AMH-deficient mice contain more growing follicles as compared to those from wild-type matching controls. Later

experiments conducted by the same investigators have shown that FSH administration increases the number of follicles and their pace of growth in AMH-deficient mice as compared with their wild-type littermates<sup>5</sup>.

In regularly ovulating women, by definition, the influence of AMH on the FSH-driven growth of antral follicles, if any, is less noticeable. In addition, in these women, serum AMH levels measured on day 3 of the menstrual cycle have been positively associated to the strength of a subsequent ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation (COH)<sup>6,7</sup>. However, these clinical data themselves do not contradict the hypothesis that AMH attenuates antral follicle responsiveness to FSH. Indeed, the intensity of the ovarian response to COH is determined by, at least, two variables. One of them is the pretreatment size of the antral follicle pool. Women endowed with more antral follicles at baseline tend to produce, in response to FSH administration, more mature follicles and fertilizable eggs. The second variable is the inherent ability of early antral follicles to reach the preovulatory

Hôpital Antoine Béchère / Universidade Paris XI - Serviço de Reprodução Assistida – Paris/França

Correspondência: Juliano Augusto Brum Scheffer

Email: [julianoscheffer@hotmail.com](mailto:julianoscheffer@hotmail.com)

Endereço:

Hôpital Antoine Béchère, 157, rue de la Porte de Trivaux, 92141, Clamart, France

stage in response to FSH. Only follicles with adequate sensitivity to gonadotropins and developmental competence undergo final maturation. Therefore, the quantitative relationship between AMH and ovarian response to COH may merely result from the positive correlation that exists between peripheral AMH levels and the number of early antral follicles on day 3<sup>8,9,10,11,12</sup> and does not itself attest to the status of responsiveness of early antral follicles to FSH treatment.

Recent clinical evidence is in keeping with the hypothesis that AMH might be a more sensitive predictive parameter of ovarian status than the usual markers. Some investigators<sup>8,13</sup> have demonstrated that serum AMH concentrations on cycle day 3 decrease progressively along with age and become undetectable after menopause. This suggests that peripheral AMH concentrations are a valuable parameter to monitor the relative follicular exhaustion due to ovarian ageing. Consistently, clinical data have indicated that peripheral AMH concentration, during the early follicular phase of the menstrual cycle, is a useful reflector of the number of oocytes retrieved in subsequent ovarian stimulation cycles<sup>6</sup>.

Hence, the objective of our study was to demonstrate the value of AMH as an indicator of ovarian reserve.

## Materials and Methods

### Subjects

We prospectively studied 116 infertile women, 21 to 41 years of age. All of them met the following inclusion criteria: 1) both ovaries present, deprived of morphological abnormalities, and adequately visualized in transvaginal ultrasound scans; 2) regular menstrual cycle lengths ranging between 25 and 35 days; 3) no current or past diseases affecting ovaries or gonadotropin or sex steroid secretion, clearance, or excretion; 4) no clinical signs of hyperandrogenism; 5) body mass indexes (BMI) ranging from 18-25 kg/m<sup>2</sup>; 6) number of early antral follicles (3-10 mm in diameter) <24; 7) no endometriosis. Infertility was due to sperm abnormalities (54%), tubal abnormalities (29%), or was unexplained (17%). An informed consent was obtained from all women and this investigation received the approval of our internal Institutional Review Board.

### Controlled ovarian hyperstimulation protocol

All women received a time-release gonadotropin releasing-hormone (GnRH) agonist, triptorelin (3 mg/day IM, Decapeptyl, Beaufour Ipsen Pharma, Paris, France) on cycle day 1. Three weeks later, complete pituitary desensitization was confirmed by the detection of low serum levels of E<sub>2</sub> and gonadotropins. Patients also underwent a conventional ultrasound examination to exclude ovarian cysts and to verify that endometrial thickness was <5 mm. Recombinant FSH therapy (Gonal-F, Serono Pharmaceuticals, Boulogne, France) was then initiated at a dosage of 225 IU/day and continued until the day of hCG administration (Gonadotrophine Chorionique "Endo", Organon Pharmaceuticals, Saint-Denis, France, 10,000 IU, IM). After the 6<sup>th</sup> day of recombinant FSH therapy, daily FSH doses were adjusted according to the

number of growing follicles. Administration of hCG was performed when at least four follicles exceeded 16 mm in diameter and E<sub>2</sub> levels per mature follicle (e ≥16 mm in diameter) were >200 pg/mL. Women who did not meet these criteria had their cycles cancelled. Oocytes were retrieved 36 hours after hCG administration by transvaginal ultrasound-guided aspiration. All ETs were performed 2 days after oocyte retrieval using Frydman catheters (CCD Laboratories, Paris, France). Luteal phase was supported with micronized progesterone (P<sub>4</sub>) (Estima, Effik Pharmaceuticals, Bièvres, France, 600 mg/day) administered daily by vaginal route starting on the evening of ET.

### Hormonal and follicular measurements

For the purposes of the present study, we considered blood samples obtained on the day in which pituitary desensitization was confirmed (baseline) and on the day of hCG administration (dhCG). All blood samples were obtained by venipuncture and serum was separated and frozen in aliquots at -20 C for subsequent centralized analysis. At baseline, serum AMH levels were determined using a "second generation" enzyme-linked immunosorbent assay (reference A16507; Immunotech Beckman Coulter Laboratories, Villepinte, France). Intra- and interassay coefficients of variation were <6% and <10%, respectively, lower detection limit at 0.13 ng/mL, and linearity up to 21 ng/mL for AMH. At baseline and dhCG, serum E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> levels were determined by an automated multi-analysis system using a chemiluminescence technique (Advia-Centaur, Bayer Diagnostics, Puteaux, France). For E<sub>2</sub>, lower detection limit was 15 pg/mL, linearity up to 1,000 pg/mL, and intra- and interassay coefficients of variation were 8% and 9%, respectively. For P<sub>4</sub>, lower detection limit was 0.1 ng/mL, linearity up to 60 ng/mL, and intra- and interassay coefficients of variation were 8% and 9%, respectively.

At baseline and dhCG, ovarian ultrasound scans were performed using a 5.0-9.0 MHz multi-frequency transvaginal probe (Voluson 730 Expert, General Electric Medical Systems, Paris, France) to evaluate the number and sizes of ovarian antral follicles. We determined, at baseline, the number and mean diameters of all follicles measuring 3-10 mm for both ovaries and, on dhCG, the number and mean diameters of all follicles measuring from 12-22 mm. On dhCG, follicles measuring 16-22 mm in diameter were considered mature follicles.

### Statistics

Measures of central tendency and variability used were, respectively, the mean and standard error of the mean when data distribution was normal, and the median and the ranges when normality could not be ascertained. For menstrual cycle duration, we used the mode and the ranges. Relationship between two continuous variables was assessed by correlation when they were independent from each other and by simple regression when there was a dependency relationship. The Spearman's test was used to determine if coefficients of correlation (r) were significantly different from zero. A P value <0.05 was considered statistically significant.

## Results

### *Hormonal and follicular relationships*

At baseline, median (ranges) serum AMH, E<sub>2</sub>, and P<sub>4</sub> levels were 3.53 (0.71-8.59) ng/mL, 31 (30-50) pg/mL, and 0.25 (0.1-1.6) ng/mL, and median number of early antral follicles were 17±0.25. Serum AMH levels showed a negative correlation with age ( $r=-0.21$ ;  $P<0.01$ ) and positive correlation with the number of early antral follicles ( $r=0.64$ ;  $P<0.0001$ ).

### *Overall population characteristics and COH results*

Mean women's ages and menstrual cycle lengths were 33.0±0.37 years 28.7±0.17 days. Mean body mass index was 22.7±0.37 kg/m<sup>2</sup>. Serum AMH levels at baseline were comparable in patients whose infertility was due to sperm or tubal abnormalities, or it was unexplained.

## Discussion

The prevailing concept of female reproductive aging suggests that the decline of the oocyte/follicle pool determines the age-dependent loss of female fertility<sup>9</sup>. Because chronological age at the final stage of reproductive aging (i.e., the occurrence of menopause) shows a considerable individual variation, it is most likely that women differ with regard to the status of the oocyte/follicle pool at a given age. Because it is not feasible to directly assess the oocyte/follicle pool, endocrinological and sonographic markers are used as an indirect measure of the oocyte/follicle pool. The requirements for the ideal marker reflecting the decline of reproductive function are: first, it must be biologically plausible that the marker is related to the extent of the oocyte/follicle pool; second, the marker should be clearly associated with age; third, it should demonstrate a change over time, preferably from approximately 30 until 50 years of age and not only during or just before the episode of menopausal transition. In contrast to AFC and inhibin B<sup>14,15</sup>, AMH may not only reflect the number of early and developing antral follicles, but also earlier stages of follicle development, as was shown both in animal and human studies<sup>16,17</sup>.

At 40 years and even more so at 45 years of age, FSH started to increase substantially, and the highest levels were mainly contributed by women with an irregular cycle. These endocrine changes seem only to occur when follicle numbers are strongly reduced just before or during the menopausal transition. Even at younger ages a significant decline in AMH levels is present, confirming earlier findings in which AMH was the only marker changing longitudinally in younger women<sup>18</sup>. The FSH levels increased and the inhibin B levels decreased over time, but the significant changes were only seen in women over 40 years of age. AMH serum levels decline in all age classes it appears to be the best marker of the gradual dwindling of follicle numbers. More important, as the changes over time in

individuals show consistency with regard to the mean decline, AMH gives the most reliable reflection of individual reproductive aging and is expected to give better predictions with regard to the extent of decline in the future. Because AFC and AMH are highly correlated, it is plausible that both provide a good reflection of the declining follicle pool<sup>9,11</sup>.

Serum AMH levels may be of value in clinical practice. The AMH has been shown to be a predictor of ovarian response in patients undergoing IVF, which can be regarded as a reflection of ovarian reserve<sup>19</sup>. With AFC a similar prediction of ovarian response was obtained<sup>9</sup>. It would be useful to investigate whether AMH or AFC could differentiate in the prognosis of women who are normally denied IVF treatment because of advanced age. Older patients with a normal response might still perform well in IVF, and AMH or AFC levels have the potential to detect such women.

In summary, we consider serum AMH levels to be the best marker reflecting the decline of reproductive aging. Useful clinical applications of AMH seem feasible.

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** To examine the hypothesis that serum AMH levels reflect the ovarian reserve.

**MATERIALS AND METHODS:** We studied 116 IVF-ET candidates undergoing controlled ovarian hyperstimulation (COH) with GnRH agonist and FSH. After the achievement of pituitary suppression and before FSH administration (baseline), serum AMH levels were measured. The number of antral follicles was determined by ultrasound at baseline (early antral follicles; 3-10 mm).

**RESULTS:** Serum AMH levels showed a negative correlation with age ( $r=-0.21$ ;  $P<0.01$ ) and positive correlation with the number of early antral follicles ( $r=0.64$ ;  $P<0.0001$ ).

**CONCLUSIONS:** The data demonstrate an association between AMH and antral follicular counts. Therefore AMH is probable biomarker of ovarian follicular status.

**UNITERMS:** Anti-Müllerian hormone, Antral Follicular Counts, Age, Ovarian reserve

## Referências bibliográficas

1. Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* 1984; 114:1315-20.

2. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002; 143: 1076-84.
3. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:77-83.
4. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999;140: 5789-96.
5. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001; 142: 4891-9.
6. Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Shelden RM. Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2002; 77:468-71.
7. Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM, Cohen-Bacrie P. Serum antimullerian hormone/mullerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril* 2004; 82:1323-9.
8. De Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen, AP, Fauser, BC (2002) Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002; 77: 357-62.
9. van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, Themmen AP. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002; 17:3065-71.
10. Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:5957-62.
11. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 2003; 18:328-3.
12. Fanchin R, Schonauer, LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003; 18:323-7.
13. van Rooij IA, Tonkelaar I, Broekmans FJ *et al.* Anti-mullerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause* 2004; 11: 601–606.
14. Welt CK, McNicholl DJ, Taylor AE, Hall JE. Female reproductive aging is marked by decreased secretion of dimeric inhibin. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:105–11.
15. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, de Velde ER. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril* 1999;72:845–51.
16. Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction* 2002;124:601–9.
17. Rey R, Sabourin JC, Venara M, Long WQ, Jaubert F, Zeller WP, et al. Anti-Müllerian hormone is a specific marker of sertoli- and granulosa cell origin in gonadal tumors. *Hum Pathol* 2000; 31:1202–8.
18. De Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update* 2002;8:141–54
19. Beckers NG, Macklon NS, Eijkemans MJ, Fauser BC. Women with regular menstrual cycles and a poor response to ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization exhibit follicular phase characteristics suggestive of ovarian aging. *Fertil Steril* 2002;78:291–7.

# Estudo comparativo da viabilidade de ovário criopreservado por congelamento lento e vitrificação em ratas

Comparative study of ovarian cryopreservation by slow freezing and vitrification in mice

Alvaro Pigatto Ceschin, Beatriz Angélica Charlotte Thomaz, Luciana Marques de Oliveira, Carlos Gilberto Almodin, Osvaldo Malafaia, Sergio Ossamu Ioshii



Dr. Alvaro Ceschin

O Dr. Alvaro Ceschin possui graduação em Medicina pela Universidade Federal do Paraná (1986), especialização em Reprodução Humana pela Huntington Reproductive Center (1991), mestrado em Princípios da Cirurgia pela Faculdade Evangélica do Paraná (2002) e doutorado em Clínica Cirúrgica pela Faculdade Evangélica do Paraná (2005). Concluiu a residência médica no Hospital e Maternidade Santa Brígida (1989). Atua principalmente nas áreas de criopreservação e técnicas de reprodução assistida.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A criopreservação de células e tecidos germinativos objetiva proteger o potencial fértil em pacientes submetidas a tratamentos que induzam à infertilidade. Objetivo: Comparar congelamento lento e vitrificação de tecido ovariano e verificar o tipo folicular com maior viabilidade no tecido criopreservado.

**MATERIAL E MÉTODOS:** 58 ratas tiveram seus ovários ressecados, dissecados e fragmentados e divididos em dois grupos: A (27 ratas): criopreservados por congelamento lento; e B (31 ratas) - vitrificados. As amostras foram submetidas à avaliação histológica geral pela coloração com H/E, e à avaliação imunohistoquímica com anti-Ki-67.

**RESULTADOS:** Para análise estatística, os testes paramétricos “Qui-quadrado de Student” e o teste não-paramétrico de “Wilcoxon”, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). No momento 0 todas as amostras de ambos os grupos apresentaram histologia normal. Após a criopreservação, todas as amostras do Grupo A apresentaram alterações histológicas em diferentes níveis e, em 55,6% dos fragmentos houve sinais de necrose. Das amostras do Grupo B, 22,6% apresentaram alterações histológicas reversíveis e não houve necrose. A análise imunohistoquímica demonstrou que, na comparação entre os momentos, com relação à positividade para o Ki-67 em folículos primordiais, somente foi observada diferença significativa para o Grupo B. No momento 1, o Grupo B apresentou diferença significativa para a marcação em folículos primordiais ( $p = 0,026$ ) e probabilidade limítrofe em folículos primários ( $p = 0,082$ ).

**CONCLUSÃO:** A vitrificação demonstrou menor grau de degeneração tissular e maior índice de viabilidade folicular. Folículos primordiais são os que apresentam maior viabilidade após a criopreservação.

**UNITERMOS:** Criopreservação; Ovário; Antígeno Ki-67; Ratos; Sobrevivência Celular.

## Introdução

Com o advento da tecnologia em reprodução assistida e a melhor compreensão da criobiologia, estratégias foram

desenvolvidas permitindo o armazenamento, em longo prazo, dos gametas e dos embriões. Esse fato possibilitou uma chance de proteção do potencial fértil em pacientes que serão submetidos a tratamentos como quimio ou radioterapia, os quais frequentemente levam à infertilidade.

Enquanto a criopreservação do sêmen está disponível para homens, os métodos de preservação de oócitos permanecem aquém do desejado e ainda não há método apropriado para crianças pré-púberes. As pesquisas estão voltadas, con-

Correspondência para:  
Alvaro Pigatto Ceschin  
Rua Conselheiro Dantas 1154  
CEP: 80.220-191 – Curitiba - PRa

seqüentemente, para bancos de criopreservação de células germinativas imaturas a fim de restaurar, se possível, a fertilidade natural ou, alternativamente, fazer uso de tecnologia de cultura para produzir gametas maduros para concepção assistida. Enquanto não houver método universal para manutenção da fertilidade, o banco de tecido gonadal criopreservado é, na teoria, alternativa prática ao armazenamento de gametas, que pode ser utilizado por adultos e por crianças.<sup>1,2</sup>

O congelamento do tecido ovariano em animais tem sido feito, recentemente, com resultados muito satisfatórios, mantendo a viabilidade do tecido germinativo<sup>3,4,5,6,7</sup>. Em 2005, obteve-se a primeira gestação humana após criopreservação de tecido ovariano e posterior fertilização *in vitro*<sup>8</sup>.

A restauração da fertilidade com o uso do tecido criopreservado é ainda hipotética, sem um protocolo consensual<sup>9</sup>. Três alternativas foram descritas como possíveis: autotransplante ovariano<sup>7,8,10</sup>, transplante heterólogo ovariano<sup>11</sup>, e maturação de folículos ovarianos primordiais *in vitro*<sup>1,12</sup>.

Atualmente, duas técnicas diferentes têm sido utilizadas na criopreservação de células e tecidos germinativos: o congelamento lento, que requer rampas de resfriamento<sup>4,5</sup>, e a vitrificação,<sup>12,13</sup> refrigeração ultra-rápida baseada no contato direto entre a solução com agentes crioprotetores altamente concentrados e o nitrogênio líquido.

Este trabalho tem como objetivo comparar, pela análise histológica convencional e imunohistoquímica com Ki-67, as alterações histológicas induzidas e a viabilidade folicular em tecido ovariano após congelamento lento e vitrificação. O estudo em ratos visa aplicação futura em tecido ovariano humano com intuito de preservação tecidual e, conseqüentemente, da fertilidade.

## Material e métodos

Cinquenta e oito ratas (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem *Wistar*, fêmeas virgens, foram anestesiadas com éter sulfúrico (MERCK, Darmstadt, Germany).

Os animais foram divididos em dois grupos: grupo A (27 ratas), cujas secções ovarianas submetidas à criopreservação por congelamento lento e grupo B (31 ratas), cujas secções foram vitrificadas.

Os animais foram submetidos à laparotomia mediana com uma incisão de aproximadamente 5 cm; avaliou-se a cavidade abdominal, os ovários foram identificados, e efetuou-se ooforectomia bilateral. Após a remoção, os ovários foram dissecados mantendo-se o córtex com a espessura de, aproximadamente, 1,5 milímetros; e lavado diversas vezes em solução salina tamponada fosfatada de Dulbecco's (DPBS - Gibco, Grand Island, USA) à temperatura ambiente a fim de se remover o excesso de sangue. O tecido foi fragmentado em pequenas secções de aproximadamente 1mm<sup>2</sup> cada. Dois segmentos de cada ovário foram reservados para estudo histológico e imunohistoquímico e o restante foi criopreservado de acordo

com o protocolo de congelamento lento/rápido descongelamento<sup>3</sup> ou por técnica de vitrificação<sup>12</sup> modificada. Esse instante foi descrito como momento 0 para ambos os grupos. O tecido não-congelado foi utilizado como controle.

### a) Congelamento lento/rápido descongelamento

As secções foram colocadas em solução de PBS com 1,000 mg/l de D-glucose e 36-mg/l de piruvato (Gibco, Grand Island, USA) contendo dimetilsulfoxido a 1,5 M (DMSO - Merck, Munich, Germany) e soro bovino fetal a 10% (Cultilab, Campinas, Brazil). Fez-se a homogeneização (1HZ) por 30 minutos a 4°C para promover rápido equilíbrio entre as secções e os crioprotetores. As secções foram introduzidas em *cryovials* de 2,0 ml (Corning, Cambridge, Canada). Iniciou-se o congelamento a 4°C e atingiu-se a temperatura de -9°C em um *freezer* programável (Biocool® - Model BCIV40A, New York, USA), com diminuição da temperatura em 2°C por minuto. Seguiu-se a indução da cristalização com o toque de um dos lados do *cryovial* com fórceps previamente refrigerado em nitrogênio líquido e, após 5 minutos, continuou-se o processo com diminuição da temperatura até -40°C, a 0,3°C por minuto. O tecido foi então transferido a nitrogênio líquido a -196°C.

Após 43 dias, os *cryovials* foram retirados do nitrogênio líquido, colocados à temperatura ambiente por 2 minutos e imersos em água a temperatura de 37°C até a fusão do gelo (dois a três minutos). Retiraram-se as secções de tecido dos *cryovials* e removeu-se a solução crioprotetora com repetidos banhos de meio PBS com 1,000 mg/L de D-glucose e 36-mg/L de piruvato (7 vezes, 1 minuto cada lavagem). Duas amostras do tecido criopreservado por congelamento lento foram separadas para posterior estudo histológico e imunohistoquímico. Esse instante foi definido como momento 1 para o grupo A.

### b) Criopreservação por vitrificação

As secções foram lavadas conforme descrito na técnica de congelamento e colocadas em solução de equilíbrio contendo 7,5% de etilenoglicol - EG (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 7,5% de dimetilsulfoxido (DMSO, MERCK, Darmstadt, Germany) e 20% de soro sintético em meio M199-H (CULTILAB, Campinas, SP, Brasil). Em seguida, foram transferidas para a solução de vitrificação, compostas de 15,0% de EG; 15,0% de DMSO; 0,5 molar de sacarose e 20% de soro sintético em meio M199-H, introduzidas em *payettes* os quais foram colocados imediatamente em nitrogênio líquido a -196°C.

Após 43 dias do processo de vitrificação, efetuou-se a retirada das secções vitrificadas do N<sub>2</sub> líquido. Diluíram-se os crioprotetores por intermédio de transferência das secções para meio de devitrificação composto por 1,0 molar de sacarose e 20% de soro sintético em meio M199-H e, em seguida, para meio de diluição: 0,5 molar de sacarose e 20% de soro sintético em meio M199-H. Após esse processo, realizou-se a lavagem final das secções em meio M199-H com 20% de soro sintético. Prepararam-se duas amostras para posterior estudo histológico e imunohistoquímico. Esse instante foi definido como momento 1 para o grupo B.

*c) Preparação histológica*

Amostras de tecido ovariano não-congelado, criopreservadas por congelamento lento e por vitrificação foram fixadas por dois dias em formalina tamponada a 10%. Seguiu-se a preparação dos blocos de parafina dos quais se obtiveram cortes com três micrômetros de espessura e montaram-se estes cortes histológicos em lâminas. Procedeu-se à coloração pela hematoxilina-eosina para estudo histológico geral e ao método imunohistoquímico para avaliação da preservação e desenvolvimento folicular através da técnica de Ki-67. Utilizou-se o método da estreptavidina-biotina, usando-se o anticorpo anti-Ki-67, clone MM1-A (Novocasta – diluição: 1:200).

*d) Análise histológica geral*

As secções coradas com hematoxilina-eosina foram analisadas com microscópio óptico comum com magnificação final de 400 vezes (Nikon-Eclipse® E200). Estudaram-se as características nucleares e citoplasmáticas das células foliculares, da camada lútea e do estroma. Observaram-se preservação tecidual; presença de alterações iniciais de degeneração, identificadas por tumefação citoplasmática e edema do tecido conjuntivo de sustentação; sinais de lesão tissular grave, determinada por fragmentação citoplasmática e nuclear; sinais definitivos de lesões irreversíveis do tecido, caracterizadas por desaparecimentos dos contornos celulares e dos núcleos.

*e) Análise Imunohistoquímica*

Quantificou-se o índice de expressão do Ki-67 pela observação dos núcleos celulares marcados com anticorpo monoclonal anti-Ki-67, clone MM1-A, de todos os cortes histológicos, sendo consideradas Ki-67-positivas todas as células com coloração nuclear acastanhada. A varredura foi realizada utilizando microscópio óptico comum com magnificação final de 400 vezes (Nikon-Eclipse® E200). Calculou-se a porcentagem de células Ki-67 positivas nos diferentes folículos, classificados em primordiais, primários e secundários. O *software Image Tool*, versão 3.0 foi utilizado para a contagem precisa do número de células.

*f) Análise Estatística*

Para a análise estatística dos dados foram utilizados os testes paramétricos “Qui-quadrado de Student” e o teste não-paramétrico de “Wilcoxon”. O nível de significância adotado foi de 5% (p<0,05).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade Evangélica do Paraná.

**Resultados**

*Análise histológica geral*

Na avaliação da viabilidade tissular do ovário não congelado (momento 0), todas as amostras, de ambos os grupos apresentaram histologia dentro da normalidade. Após o processo de criopreservação, todos os animais do Grupo A (con-

gelamento lento) apresentaram alteração histológica, sendo que, em 81,5% das amostras houve degeneração hidrópica; em 74,1% verificou-se dissociação das células e 55,6% apresentaram sinais de necrose. Já no Grupo B (vitrificação), 77,4% das lâminas indicaram tecido histologicamente normal e 22,6% apresentaram degeneração hidrópica como alteração tissular. A tabela 1 descreve as características histológicas encontradas nos tecidos nos momentos 0 e 1.

**Tabela 1** - Características histológicas encontradas nos grupos, em ambos os momentos

MOMENTOS	GRUPO A (n = 27)		GRUPO B (n = 31)		TOTAL (n = 58)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
MOMENTO 0						
- Aspecto Normal	27	100,0	31	100,0	58	100,0
MOMENTO 1						
- Aspecto Normal	-	-	24	77,4	24	41,4
- Degeneração Hidrópica	22	81,5	07	22,6	29	50,0
- Dissociação das Células	20	74,1	-	-	20	34,5
- Tecido com Necrose	15	55,6	-	-	15	25,6

NOTA: Momento 1 (Normal x Alterado) → p < 0,0001 (Qui-Quadrado).

*Análise imunohistoquímica*

Na comparação entre os grupos, em relação à positividade para marcação do Ki67, não foi observada diferença significativa no momento 0.

No momento 1, o Grupo B apresentou diferença significativa para a marcação em folículos primordiais (p=0,026) e probabilidade limítrofe para a positividade em folículos primários (p=0,082).

Na comparação entre os momentos, em relação à positividade para o Ki-67 nos diferentes folículos, observou-se diferença significativa para marcação em folículos primário e secundário, para ambos os grupos.

Em relação à positividade imunohistoquímica para os folículos primordiais, foi observada diferença apenas no Grupo B, onde houve aumento percentual no momento 1 (p< 0,0001). Esses dados são indicados na tabela 2.

**Discussão**

A criopreservação de tecido ovariano apresenta-se como uma alternativa menos controversa ao congelamento de embriões, técnica já bem descrita, mas que implica em questionamentos de ordem moral e ética.

Com intuito de verificar a melhor técnica de criopreservação do tecido ovariano, nesse estudo realizou-se a comparação de análise histológica e imunohistoquímica de fragmentos de ovário submetidos ao congelamento lento e à vitrificação.

**Tabela 2** - Análise comparativa entre os momentos 0 e 1 em relação à positividade para o Ki-67 entre os folículos

GRUPOS	FOLÍCULOS					
	Primordial		Primário		Secundário	
	Mediana	VALOR DE p <sup>(1)</sup>	Mediana	VALOR DE p <sup>(1)</sup>	Mediana	VALOR DE p <sup>(1)</sup>
GRUPO A	n: 17	0,546	n: 10	0,009	n: 10	0,003
- Momento 0	10		26		55	
- Momento 1	10		0		0	
GRUPO B	n: 27	<0,035	n:19	<0,0001	n: 12	<0,0001
- Momento 0	8		32		47	
- Momento 1	14		3		3	

NOTA: Desvio padrão muito elevado - recomenda-se utilizar a mediana. (1) Wilcoxon.

A técnica de congelamento lento foi apresentada por diversos autores e o tecido ovariano apresenta boa tolerância ao processo de criopreservação.<sup>3,4</sup>

De maneira geral, o bom protocolo de congelamento celular é aquele que propicia a estabilidade das reações cruzadas entre as moléculas no ambiente intracelular e também permite a sobrevivência celular após o descongelamento. O tecido deverá não somente permitir a sobrevivência celular, como também exibir a mesma arquitetura inicial, com as mesmas junções intercelulares, interações e ligações moleculares.<sup>17,18</sup>

Estudos de criobiologia demonstraram que tipos diferentes de células, ainda se congeladas na mesma solução, exibem condições de descongelamento diferentes. Devido à alta complexidade da arquitetura ovariana, a sobrevivência do tecido criopreservado depende, não somente das rampas de congelamento e descongelamento, mas também dos métodos de remoção dos crioprotetores.<sup>17</sup>

A dificuldade para conseguir a permeabilidade adequada dos fragmentos de tecido ao crioprotetor pode ser superada utilizando secções finas de tecido, com aproximadamente 1 a 2 milímetros de espessura, que fornecem maior área de contato para a penetração do soluto.<sup>3,17,19,20</sup>

Estudos com animais têm demonstrado altas taxas de sucesso após diferentes metodologias de transplante de tecido ovariano criopreservado. Entretanto, mais pesquisas são necessárias para que se cheguem a resultados conclusivos, uma vez que muitas variáveis ainda estão sob investigação.<sup>7,10,14,15</sup> Apesar dos resultados da técnica apresentarem-se promissores, apenas duas gestações foram obtidas até o presente momento: uma delas foi alcançada após a criopreservação e transplante ortotópico de tecido ovariano<sup>16</sup> e a outra após fertilização *in vitro* de oócitos aspirados de tecido ovariano criopreservado.<sup>8</sup>

A outra técnica de criopreservação ovariana utilizada nesse estudo foi a vitrificação. Nesse processo ocorre eliminação total da formação do cristal de gelo, tanto no meio intracelular quanto na solução extracelular.<sup>13</sup> Os protocolos para vitrificação permitem às células e tecidos serem colocados rapidamente em contato com os crioprotetores e mergulhados diretamente em nitrogênio líquido. Os *freezers*

programáveis não são requeridos para a vitrificação e o tempo real para criopreservar os espécimes é diminuído significativamente.<sup>12,13</sup>

Apesar dessas aparentes vantagens, a elevada toxicidade devido à alta concentração de crioprotetores usados em protocolos de vitrificação pode causar choque osmótico severo e comprometer a sua sobrevivência após o descongelamento.<sup>21,22,23</sup>

A redução da toxicidade pode ser conseguida ao se utilizar combinação de dois crioprotetores e uma exposição gradativa das células às soluções concentradas antes do resfriamento. Essa técnica foi utilizada nesse estudo, à semelhança de outras pesquisas<sup>12,13,22,24</sup>. Também é necessário o acondicionamento das amostras com o mínimo volume de solução possível, a fim de facilitar a técnica com taxas de refrigeração elevadas e uniformes<sup>13</sup>. A incorporação de sacarose à solução de vitrificação e a incubação das células nessa solução, antes do processo em si, ajudam na desidratação e na diminuição do tempo de exposição das células aos efeitos tóxicos dos crioprotetores.<sup>12,13,24</sup>

Nesse trabalho, a avaliação histológica foi feita no intuito de determinar os níveis de comprometimento tissular após o processo de criopreservação por congelamento lento e vitrificação em comparação com o tecido não-congelado, que serviu como controle.

Verificou-se que, no momento 0, todas as amostras apresentaram tecido preservado. No momento 1 foram encontrados tecidos com degeneração hidrópica, amostras com fragmentação citoplasmática, fragmentação dos núcleos e dissociação das células e tecidos com necrose caracterizada por sombras eosinofílicas e amorfas das estruturas celulares. Essas alterações histológicas também foram vistas de forma associada em algumas amostras. Os resultados estão de acordo com os encontrados em estudo anterior o qual identificou alterações histológicas reversíveis (vacuolização citoplasmática, lise estromal e oócitos com contornos irregulares) no tecido ovariano após o descongelamento.<sup>25</sup> A outra alteração encontrada nas amostras analisadas foi necrose.

Houve maior preservação tecidual nos fragmentos de tecido ovariano submetidos à criopreservação por vitrificação

em comparação aos por congelamento lento. Isso pode ser justificado por alguns fatores decorrentes do processo de congelamento lento, como o choque osmótico a que são submetidas as células durante o processo, a formação cristais de gelo intracelulares e a utilização de rampas de congelamento.

O marcador imunohistoquímico Ki-67 foi usado como índice proliferativo na demonstração indireta de viabilidade folicular após a criopreservação. Observou-se maior positividade para Ki-67 em folículos primordiais, com diferença estatisticamente significativa entre a população folicular. Isso indica que folículos primordiais apresentam maior sobrevida ao processo de criopreservação por congelamento lento ou por vitrificação.<sup>26</sup>

Em relação à positividade para o Ki-67 nos diferentes folículos, comparando-se momentos 0 e 1, foi observada diferença significativa para os folículos primário e secundário, confirmando que a maioria desses folículos não resiste ao processo de criopreservação, tanto no congelamento lento quanto na vitrificação.

Isso se justifica pelo fato de os folículos primordiais serem menores e metabolicamente menos ativos, portanto mais tolerantes ao processo de criopreservação. Os oócitos imaturos, presentes nos folículos primordiais, não apresentam polimerização dos microtúbulos e formação de fusos mitóticos, assim a criopreservação de pequenos oócitos nesses folículos pode livrar as células da grande maioria dos efeitos deletérios ao DNA<sup>17</sup>.

Nos resultados para imunorreatividade ao Ki-67 comparativos entre os grupos, no momento 1, o Grupo B apresentou diferença significativa para a marcação em folículos primordiais e probabilidade limítrofe em folículos primários, ou seja, houve um número maior de amostras Ki-67 positivas nesse grupo, indicando, indiretamente, melhor viabilidade folicular.

A maior positividade imunohistoquímica em amostras vitrificadas apresenta-se de acordo com os resultados encontrados e justificados na análise histológica desse experimento. Em conclusão, as análises histológica geral e imunohistoquímica demonstraram que, embora ambos os métodos de criopreservação ovariana sejam viáveis, a vitrificação apresentou menor grau de degeneração tecidual e manteve maior número de folículos primordiais potencialmente funcionantes, sendo portanto considerada, nesse estudo, a melhor técnica de criopreservação de tecido ovariano, em ratas. Os folículos primordiais são os que apresentam maior viabilidade após a criopreservação.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The aim of cells and germinative tissue cryopreservation is to protect the fertility on patients submitted to treatments that may induce infertility.

**OBJECTIVES:** to compare slow freezing and vitrification of ovarian tissue, and to determine the follicle type showing the best viability after cryopreservation.

**MATERIAL AND METHODS:** The ovaries of 58 female rats were resected, dissected and fragmented. Group A (27 rats) was the slow freezing group; and group B (31 rats), vitrified. All the samples of moment 0, on day of oophorectomy, and from moment 1, frozen and thawed and devitrified ones were stained with eosin-hematoxylin for general histological assessment, and treated with Ki-67 immunohistochemical technique for follicular viability assessment.

**RESULTS:** For the demonstration of the objective of this work, the non-parametric Chi-Square and Wilcoxon tests were used. For the level of nullity rejection hypothesis, *p* was established at 0.05 or 5%. At moment 0 all samples presented normal histology. At moment 1, all samples from group A presented different levels of histological alterations, with 55.6% of the fragments showing signs of necrosis. In Group B, 22.6% of the samples presented reversible alterations, without necrosis. Ki-67 assessment showed a significant difference only for group B, with *p* = 0.026 for primordial follicles and *p* = 0.082 for primary follicles.

**CONCLUSION:** Vitrification induced a lower degree of tissue degeneration and a better index of follicular viability. Primordial follicles showed better viability after cryopreservation.

**UNITERMS:** Cryopreservation; Ovary; Ki-67 Antigen; Rats; Cell Survival.

## Referências Bibliográficas

1. Picton HM, Gosden RG. In vitro growth of human primordial follicles from frozen-banked ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 166:27-35.
2. Beerendonk CC, Braat DD. Present and future options for the preservation of fertility in female adolescents with cancer. *Endocr Dev* 2005; 8:166-75.
3. Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996; 11:1487-91.
4. Gosden R.G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163:125-9.
5. Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrere S, Donnez J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril* 2004; 82:1390-4.
6. Imhof M, Hofstetter G, Bergmeister H, Rudas M, Kain R, Lipovac M, Huber J. Cryopreservation of a whole ovary as a strategy for restoring ovarian function. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21:459-65.
7. Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Meister H, Ceschin AP, Kriger E, Ferreira JOHR. Recovery of natural fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in ewes subjected to radiotherapy. *Fertil Steril* 2004; 81:160-4.

8. Meiorow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, Schiff E, Dor J. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 2005; 353:318-21, 2005.
9. Salle B, Demirci B, Franck M, Rudigoz RC, Gruerin JF, Lomage J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil Steril* 2002; 77:403-8.
10. Aubard Y, Lavignac C, Grandjean MH, Piver P and Teissier MP. Autograftes orthotopiques de fragments ovariens chez le rat avec grossesse. *Contracept Fertil Sex* 1996; 24:852-5.
11. Oktay K, Newton H, Gosden RG. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle of frozen growth initiation in SCID mice. *Fertil Steril* 2000, 73:599-603.
12. Hasegawa A, Hamada Y, Mehandjiev T, Koyama K. In vitro growth and maturation as well as fertilization of mouse preantral oocytes from vitrified ovaries. *Fertil Steril* 2004; 81:824-30.
13. Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. Potential Importance of Vitrification in Reproductive Medicine. *Biol Reprod* 2002; 67:1671 – 80.
14. Poirot C, Vacher-Lavenu MC, Helardot P, Guibert J, Brugières L, Jouannet P. Human ovarian tissue cryopreservation: indications and feasibility. *Hum Reprod* 2002; 17:1447-52.
15. Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Meister H, Ferreira JOHR, Franco RL, Cavalcante AA, Radaelli MRM, Bahls AS, Moron AF, Murta CGV: Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radiotherapy. *Hum Reprod* 2004; 19:1287-93.
16. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, van Langendonck A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 364:1405-10.
17. Hovatta O, Silver R, Krausz T, Abir R, Margara R, Trew G, Lass A, Winston RM. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Reprod* 1996; 11: 1268-72.
18. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963; 47:347–9.
19. Lee RK, Ho HY, Yu SL, Lu CH. Blastocyst development after cryopreservation of mouse ovarian tissue. *J Assist Reprod Genet* 2005; 22:95-101.
20. Newton H. The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preserving the fertility of cancer patients. *Hum Reprod Update* 1998; 4:237-47.
21. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196 °C by vitrification. *Nature* 1985; 313:573–5.
22. Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987; 24:387–402.
23. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51:53-8.
24. Yeoman RP, Wolf DP, Lee DM. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow rate freezing. *Fertil Steril* 2005; 83:1248-54.
25. Thomaz, BAC. Aspectos histológicos do ovário de coelhas após criopreservação. Curitiba, 2005, 82 páginas. Tese (Mestrado em Ciências da Saúde) - Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
26. Lee D, Ouhibi N, Battaglia D. Cryopreservation of ovarian tissue: banking reproductive potential for the future. *Women's Health Reports* 2001; 1:152-6.

# Gravidez na adolescência: resultados obstétricos e neonatais

Adolescent pregnancy: obstetric and neonatal outcomes

Giacomo Trotta, Neil F. Novo, Yara Juliano, Dirce M. Sigulem, João C. Mantese, Alfredo C.S.D. Barros,  
Maria Cristina F.S. Cury, Mario Cavagna



Dr. Giacomo Trotta

O Dr. Giacomo Trotta é médico formado pela Universidade de Santo Amaro. É especialista em Ginecologia e Obstetrícia e Mestre em Saúde Materno Infantil pela Faculdade de Medicina da Universidade de Santo Amaro.

## RESUMO

**OBJETIVO:** verificar se houve diferenças nos resultados obstétricos e neonatais de três grupos de gestantes adolescentes atendidas em Hospital Assistencial na Região Sul de São Paulo.

**MATERIAL E MÉTODOS:** Foram estudados, retrospectivamente, os resultados obstétricos e neonatais de gestantes assim divididas:

Grupo I : 10 gestantes de 13 a 15 anos incompletos;

Grupo II: 80 gestantes de 15 a 17 anos incompletos;

Grupo III : 256 gestantes de 17 a 20 anos incompletos.

**RESULTADOS:** não foram encontradas diferenças significantes nos resultados entre os grupos estudados.

**CONCLUSÕES:** nossos resultados sugerem que os malefícios advindos da gestação na adolescência parecem ser principalmente de ordem psíquica e social; do ponto de vista biológico, não parece haver diferenças significantes nos resultados obstétricos e neonatais.

**UNITERMOS:** Gravidez na adolescência; Resultados obstétricos; Resultados neonatais.

## Introdução

A ocorrência da gravidez na adolescência é uma situação global, atingindo várias regiões do planeta, especialmente as mais pobres. Estima-se que, anualmente, nasçam no mundo 13 milhões de crianças de mães adolescentes na faixa etária de 15 a 19 anos de idade<sup>1</sup>. O amadurecimento biológico freqüentemente não é acompanhado de amadurecimento cognitivo e emocional, o que torna a gravidez na

adolescência uma situação de risco para mãe e filho<sup>2</sup>. Tal fato acarreta, também, um aumento na procura pelo aborto, que, por força da lei, deve ser clandestino. Esse fato provoca um aumento significativo na morbidade e mortalidade maternas, assumindo maior dramaticidade em se tratando de adolescentes. O Ministério da Saúde faz estimativa que, a cada 100 abortos, 25 são de adolescentes, sendo que a rede pública de saúde atende a 130 mil abortos de adolescentes por ano, provocados ou espontâneos<sup>3</sup>.

Levando-se em conta a importância que a gestação em adolescentes apresenta como problema de saúde pública, a presente investigação teve como objetivo verificar, retrospectivamente, se houve diferenças nos resultados obstétricos e neonatais de três grupos de gestantes adolescentes atendidas em Hospital Assistencial na Região Sul de São Paulo.

Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil, Faculdade de Medicina da Universidade de Santo Amaro – UNISA, São Paulo, Brasil.  
Correspondência:  
Mario Cavagna  
Faculdade de Medicina da Universidade de Santo Amaro  
Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340  
mariocavagna@yahoo.it

## Material e Métodos

Foram estudados, retrospectivamente, os resultados obstétricos e neonatais de gestantes atendidas no Hospital Escola Wladimir Arruda (HEWA), na região sul, no Grupo Técnico 2 da DIR I (corresponde à cidade de São Paulo) do Estado de São Paulo. As gestantes foram divididas em 3 grupos, de acordo com a classificação de Drake<sup>4</sup>:

Grupo I : 10 gestantes de 13 a 15 anos incompletos;

Grupo II: 80 gestantes de 15 a 17 anos incompletos;

Grupo III : 256 gestantes de 17 a 20 anos incompletos.

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

1. Realização de pré-natal (pelo menos 3 consultas);
2. Tipo de procedimento na internação: partos normais, partos com fórcepe, operações cesarianas e curetagens uterinas;
3. Indicação da operação cesariana;
4. Tipo de anestesia à qual a adolescente foi submetida;
5. Complicações obstétricas da gestação atual: abortamento, prematuridade e óbito fetal;
6. Idade gestacional pela data da última menstruação ou ultrassonografia, quando possível;
7. Índice de Capurro do recém-nascido;
8. Índice de Apgar de primeiro e quinto minuto;
9. Peso do recém-nascido.

Mesmo tratando-se de estudo retrospectivo de análise de resultados obstétricos e neonatais verificados em prontuários, o estudo foi submetido e aprovado comitê de ética da instituição.

Para a análise dos resultados foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos, levando-se em consideração a natureza das variáveis estudadas. Foram aplicados os testes de análise de variância por postos de Kruskal – Wallis e o teste da partição do Qui quadrado. Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5% o nível para a rejeição da hipótese de nulidade.

## Resultados

No grupo I, 50% das gestantes fizeram pré-natal; no grupo II, 36,3% e no grupo III, 33,6% .

No grupo I, entre as 10 internações de gestantes até 15 anos incompletos, obtivemos 1 parto normal (10,0%), 3 partos fórcepes (30,0%), 3 partos cesáreos (30,0%) e 3 abortamentos (30,0%), sendo que 2 foram submetidas à curetagem uterina. Houve 1 parto prematuro (10,0%). As indicações de parto cesáreo foram: 1 por doença hipertensiva específica da gestação (10,0%), 1 por distócia funcional (10,0%) e 1 por sofrimento fetal (10,0%). Em relação à anestesia utilizada, registramos que foram administradas 9 anestésias, sendo 5 raqui-anestésias (55,5%), 3 peridurais (33,3%) e 1 geral (11,1%). O peso dos

recém nascidos variou de 1400 até 3560 gramas. O Apgar de 1º minuto variou de 3 a 9 e o Apgar de 5º minuto variou de 7 a 10.

No grupo II, entre as 80 internações de gestantes de 15 a 17 anos incompletos, obtivemos 37 partos normais (46,3%), 21 partos cesáreos (27,3%), 16 abortamentos (20,0%), sendo que 13 foram submetidos à curetagem uterina, 6 partos fórcepe (7,8%). Foram observados 7 partos prematuros (8,7%), 1 óbito fetal (1,3%) e 2 neomortos (2,5%). As indicações de parto cesáreo foram 5 por sofrimentos fetais (6,3%), 4 por apresentação pélvica (5,0%), 4 por distócias ósseas (5,0%), 3 por doença hipertensiva específica da gestação (3,7%), 2 por distócias funcionais (2,5%), 1 por eminência de rotura uterina (1,3%), 1 por gestação prolongada (1,3%) e 1 por desproporção cefalopélvica (1,3%). Em relação à anestesia, registramos que foram administradas 63 anestésias sendo 28 raqui-anestésias (44,4%), 21 anestésias locais para realização de episiotomia (33,3%), 9 gerais (11,3%) e 5 peridurais (6,3%). O peso dos recém nascidos variou de 1080 até 3850 gramas. O Apgar de 1º minuto variou de 0 a 9 e o Apgar de 5º minuto variou de 1 a 10.

Entre as 256 internações de gestantes de 17 a 20 anos incompletos (grupo III), registramos a ocorrência de 133 partos normais (51,9%), 51 abortamentos que foram submetidos à curetagem uterina (19,9%), 50 partos cesáreos (19,5%), 22 partos fórcepe (8,6%). As complicações foram 10 óbitos fetais (3,9%), 10 partos prematuros (3,9%), e 1 deiscência de parede após operação cesariana (0,4%). As indicações de parto cesáreo obtidas foram 15 por sofrimentos fetais (5,9%), 9 por doença hipertensiva específica da gestação (3,5%), 9 por distócias funcionais (3,5%), 4 por apresentação pélvica (1,5%), 3 por distócias ósseas (1,2%), 2 por apresentação córmica (0,8%), 2 por hiperatividade uterina (0,8%), 1 por iminência de rotura uterina (0,4%), 1 por placenta prévia (0,4%), 1 por descolamento prematuro de placenta (0,4%) e 1 por oligoâmnio (0,4%). Registramos 212 anestésias, sendo 90 locais para episiotomia (42,5%), 63 raqui-anestésias (29,7%), 42 gerais (19,8%) e 17 peridurais (8,0%). Houve um caso de associação de raqui-anestesia com geral para parto cesáreo (0,5%), um de peridural com geral para parto cesáreo (0,5%) e 1 de local com raqui-anestesia para parto fórcepe (0,5%). O peso dos recém nascidos variou de 800 a 4450 gramas. O Apgar de primeiro minuto variou de 1 a 10 e o Apgar de quinto minuto variou de 4 a 10.

Os resultados obtidos são sintetizados nas tabelas 1 a 5.

**Tabela 1** - Grupos etários e realização de pré-natal

Grupo	Pré-natal		Total
	Sim	Não	
até 15 anos incompleto	N	5	5
	%	50,0%	50,0%
de 15 a 17 anos incompletos	N	29	51
	%	36,3%	63,8%
de 17 a 20 anos incompletos	N	86	170
	%	33,6%	66,4%
Total	N	120	226
	%	34,7%	65,3%

**Tabela 2** - Grupos etários e tipo de procedimento

Tipo de Procedimento		Grupo			Total
		até 15 anos	de 15 a 17 anos	de 17 a 20 anos	
Parto normal	N	1	37	133	171
	%	11,1%	48,1%	52,2%	50,1%
Parto cesáreo	N	3	21	50	74
	%	33,3%	27,3%	19,6%	21,7%
Parto Fórcepe	N	3	6	22	31
	%	33,3%	7,8%	8,6%	9,1%
Curetagem Uterina	N	2	13	50	65
	%	22,2%	16,9%	19,6%	19,1%
Total	N	9	17	255	341
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100%

**Tabela 3** - Grupos etários e prematuridade

Grupo	Prematuridade		Total
	Sim	Não	
até 15 anos	N	1	9
	%	10,0%	90,0%
de 15 a 17 anos	N	7	73
	%	8,8%	91,3%
de 17 a 20 anos	N	10	246
	%	3,9%	96,1%
Total	N	18	328
	%	5,2%	94,8%

**Tabela 4** - Grupos etários e óbito fetal

Grupo	Óbito fetal		Total
	Sim	Não	
até 15 anos	N	1	10
	%	0%	100,0%
de 15 a 17 anos	N	1	79
	%	1,3%	98,8%
de 17 a 20 anos	N	10	246
	%	3,9%	96,1%
Total	N	11	335
	%	3,2%	96,8%

## Discussão

A gravidez é um evento marcante para a mulher, independentemente de sua idade. Trata-se de um fenômeno que, embora fisiológico, acarreta uma sobrecarga física para o organismo materno, além de potenciais complicações de natureza social e psíquica. Na adolescência, mais do que em qualquer outra época da vida da mulher, a gravidez reveste-se de importância por motivos médicos, psíquicos e sociais.

Os reais problemas acarretados pela gestação em adolescentes são motivos de discussão; com este estudo, procuramos comparar os resultados obstétricos e neonatais de gestantes adolescentes de faixas etárias diferentes de um mesmo meio sócio-econômico-cultural, em Hospital Assistencial da Região Sul do município de São Paulo.

Na literatura observa-se discordância entre os autores quanto à maior incidência de riscos para a saúde materno-fetal na adolescência. Os resultados conflitantes são provenientes da falta de metodologia uniforme, falta de grupos controle com atenção à saúde semelhante e diversidade de condições dos grupos estudados<sup>5,6</sup>.

Há muitas referências de aumento de complicações em gestantes adolescentes, como prematuridade, recém-nascido de baixo peso, anemia, infecções, amniorrexe prematura, doença hipertensiva específica da gravidez e morbidade puerperal<sup>7-11</sup>. Autores como Correy et al.<sup>5</sup> reiteram que a situação socioeconômica desfavorável, a nutrição e educação inadequadas são fatores que contribuem para tornar a gestante adolescente de alto risco.

Spellacy et al.<sup>12</sup> registram maior número de partos prematuros entre as adolescentes e referem que o aumento na prematuridade estaria mais relacionado com a idade reprodutiva do que com a cronológica. Dwyer<sup>13</sup> e Hunt<sup>14</sup> também encontraram maior incidência de prematuridade nas adolescentes. Mathias et al.<sup>15</sup> relatam números maiores de partos prematuros nas gestantes adolescentes e explicam tal ocorrência por fatores como falta de assistência pré-natal, estado civil, tabagismo e doença hipertensiva específica da gestação. Em nossa inves-

**Tabela 5** - Peso, Índice de Apgar, Capurro, Idade da menarca e Idade gestacional nos diferentes grupos etários

Variáveis		Grupo			
		Até 15 anos	de 15 a 17 anos	de 17 a 20 anos	
Peso do RN	Média	2709,3	2937,7	3026,6	F calculado = 1,53
	Mediana	2775,0	2950,0	3050,0	F crítico = 3,07
	Desvio padrão	656,80	591,80	538,00	Não Significante
Apgar de primeiro Minuto	Média	6,4	7,5	7,8	H calculado = 2,78
	Mediana	8,0	8,0	8,0	H crítico = 5,99 Não Significante
Apgar de quinto Minuto	Média	8,5	8,9	9,1	H calculado = 2,09
	Mediana	9,0	9,0	9,0	H crítico = 5,99 Não Significante
Capurro Somático	Média	273,3	273,5	274,2	H calculado = 0,22
	Mediana	269,5	276,0	274,0	H crítico = 5,99 Não Significante
Capurro Sômato-Neurológico	Média	277,0	274,0	275,2	H calculado = 0,22
	Mediana	274,0	277,0	276,0	H crítico = 5,99 Não Significante
Idade da Menarca	Média	12,0	12,4	12,8	H calculado = 4,01
	Mediana	12,0	12,0	13,0	H crítico = 5,99 Não Significante
Idade Gestacional	Média	191,2	234,9	230,8	H calculado = 2,08
	Mediana	259,0	269,5	267,0	H crítico = 5,99 Não Significante

tigação, os resultados observados contradizem os referidos autores; as incidências de prematuridade foram de 10,0% nas adolescentes precoces, 8,7% nas adolescentes e 3,9% nas adolescentes tardias, sem significado estatístico e dentro da incidência esperada para a população geral. Esses dados sugerem que gestantes adolescentes em qualquer idade não apresentam incidência maior de prematuridade, como também observado por Sismondi et al.<sup>6</sup>, que não encontraram maior frequência de partos prematuros entre as adolescentes de maneira geral, e por Wilson et al.<sup>16</sup>, que relatam incidência de prematuridade de 8%. Em nosso meio, Motta<sup>17</sup> relata incidência de prematuridade entre gestantes adolescentes de 4,8%, o que está de acordo com nossos resultados. Acreditamos que outras variáveis possam ser mais importantes do que a idade da gestante, na gênese da prematuridade e, talvez, tais variáveis estejam presentes com mais frequência em alguns grupos de adolescentes, o que explicaria a divergência entre os autores.

Com relação a abortamentos, nossos resultados apontam uma incidência de 30,0% nas adolescentes precoces, 20,0% nas adolescentes de 15 a 17 anos e 19,9% nas adolescentes tardias. Também nesse ponto, os dados mostram-se compatíveis com o relatado na literatura para a população geral<sup>18</sup> sugerindo que a gestação na adolescência não acarreta maior incidência de interrupções involuntárias da gravidez. Da mesma forma, a ocorrência de óbitos intra-útero, em nossa casuística, foi de nenhum caso entre as 10 adolescentes precoces, 1,2% nas adolescentes entre 15 e 17 anos e 3,9% nas adolescentes tardias. Tais resultados não apresentam signifi-

cância estatística e também são comparáveis aos relatados na literatura para a população geral<sup>19</sup>.

A doença hipertensiva específica da gestação (DHEG), de acordo com vários autores, é uma patologia muito frequente nas adolescentes<sup>20-25</sup>. Entretanto, outros fatores que não a idade podem estar envolvidos na gênese da DHEG, como a paridade, antecedentes pessoais e assistência médica adequada. Faundes et al.<sup>23</sup> demonstraram que a frequência das síndromes hipertensivas mantinha-se constante desde 15 anos até a idade adulta (20 a 25 anos) e após essa idade aumentava. Pinto e Silva<sup>24</sup> encontrou 19,2% de hipertensas entre as adolescentes estudadas e ao separar as formas puras constatou igualdade entre as adolescentes e as adultas. Correy et al.<sup>4</sup> constatou 21,8% de DHEG nas adolescentes menores de 16 anos, 18,3% nas de 17 anos, 17% nas de 18 anos e 13,8% nas maiores de 18 anos, mostrando que quanto menor a idade maior o risco de DHEG. A incidência de doença hipertensiva específica da gravidez é de 3 a 10% nos EUA e de 9 a 10% no Brasil<sup>22,25</sup>. Nossa pesquisa revelou incidência de DHEG de 10,0% nas adolescentes precoces, 3,7% nas adolescentes de 15 a 17 anos e 3,5% nas adolescentes tardias. Dessa forma, nossos dados não podem corroborar a alta incidência de DHEG nas adolescentes, em concordância com observações de Mathias e Nobile<sup>22</sup> e Motta<sup>17</sup>, ambas em nosso meio. Mais uma vez, as gestantes adolescentes parecem estar, do ponto de vista anatômico e funcional, aptas para a puerperalidade.

Muitos estudos apontam maior incidência de recém-nascidos de baixo peso em gestantes adolescentes<sup>26-28</sup>. Ou-

tros autores não encontram diferença entre adolescentes e a população geral ou grupo controle<sup>29</sup>. É possível que o baixo peso ao nascimento possa ser devido a fatores outros que não a idade, como a ausência ou deficiência de assistência pré-natal, infecções, tabagismo e biótipo das adolescentes<sup>30</sup>. Em nossa investigação, encontramos peso médio do neonato nas adolescentes precoces de 2709,3 gramas, nas adolescentes entre 15 e 17 anos de 2937,7 gramas, e nas adolescentes tardias de 3026,5 gramas. Portanto, não observamos maior incidência de recém-nascidos de baixo peso, não obstante as condições socioeconômicas desfavoráveis da população estudada. Reiteramos que os fatores envolvidos na gênese do baixo peso ao nascimento possivelmente sejam múltiplos e variem com o grupo estudado; seria necessária, portanto, uma casuística muito maior e, também, estudos delineados prospectivamente, para uma avaliação adequada dos fatores que levam a tal complicação. Entretanto, nossos resultados apontam para o fato de que a idade da gestante, isoladamente, não parece influir na ocorrência do baixo peso ao nascimento.

Em nosso estudo, não observamos diferenças significantes na incidência de complicações obstétricas e neonatais entre as gestantes adolescentes estudadas. Ressalte-se que o grupo de adolescentes tardias, com idade compreendida entre 17 e 20 anos, apresenta-se, do ponto de vista obstétrico, em perfeitas condições de apresentar evolução satisfatória do ciclo grávido-puerperal, devendo ser considerado como grupo adulto, conforme registrado por Mathias et al.<sup>15</sup>. Nossas observações sugerem que as adolescentes mais jovens, apresentando resultados semelhantes ao grupo de adolescentes tardias, também estejam aptas, do ponto de vista anatômico e funcional, a suportar a sobrecarga da puerperalidade. Igualmente em nosso meio, Motta<sup>17</sup> registra que a idade ginecológica, definida como a diferença entre a idade cronológica e a idade da menarca, também não apresenta relação com nenhum tipo de complicação da gravidez e do parto. Embora nossa investigação tenha sido retrospectiva, e com pequeno tamanho da amostra de gestantes adolescentes precoces, em virtude de sua baixa incidência, acreditamos poder colocar em discussão a eventual imaturidade biológica para a gravidez que teriam as adolescentes. Os malefícios advindos da gestação na adolescência parecem ser, portanto, principalmente de ordem psíquica e social; a adolescente, imatura, sem nenhuma dúvida, do ponto de vista emocional, e ainda sem definição do papel que lhe cabe na sociedade, reage negativamente frente à gravidez, amiúde indesejada, que acaba por deixar sua marca indelével na evolução psíquica e social da jovem mãe.

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** To verify whether there are differences in obstetric and neonatal outcomes in three groups of adolescent pregnant.

**MATERIAL AND METHODS:** We studied retrospectively the obstetric and neonatal outcomes in adolescent as follows: Group I : 10 pregnant adolescents between 13 and 15 years old;

Group II: 80 pregnant adolescents between 15 and 17 years old;

Group III : 256 pregnant adolescents between 17 and 20 years old.

**RESULTS:** There were no significant differences among the groups studied.

**CONCLUSIONS:** Our results suggest that the the bad effects of adolescent pregnancy are related to social and psychological aspects. From the biological point of view, it seems that there are no differences between younger and older patients, regarding obstetric and neonatal outcomes.

**UNITERMS:** Adolescent pregnancy; Obstetric outcomes; Neonatal outcomes.

## Referências Bibliográficas

1. Bhering CA, Bhering JA, Mendonça EG. Estudo descritivo e comparativo de adolescentes grávidas e seus conceitos no município de Barra Mansa-RJ. *Arq Bras Pediatr.* 1994;1 (2): 47-52.
2. Scaramella LV, Conger RD, Simons RL, Whitbeck LB. Predicting risk for pregnancy by late adolescence: A social contextual perspective. *Dev Psychology* 1998; 34(6): 1233-45.
3. Oliveira MW. Gravidez na adolescência: Dimensões do problema. *Cad CEDES* 1998; 19: 48-70.
4. Drake P. Addressing developmental needs of pregnant adolescents. *Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 1996; 25:518-24.
5. Correy JF, Kwok PC, Newman MN, Curran JT. Adolescent pregnancy in Tasmania. *Med J Australia* 1984; 141: 150-4.
6. Sismondi FAA, Volante R, Giai M. El embarazo y el parto en la adolescente. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 1984; 49: 41-5.
7. Mussio TJ. Primigravidae under age 14. *Am J Obstet Gynecol.* 1962; 84: 442-8.
8. Wallace HM. Teenage pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1965; 92: 1125-28.
9. Duenhoelter JH, Himenez J, Baumann G. Pregnancy performance of patients under fifteen years of age. *Obstet Gynecol.* 1975; 46: 49-53.
10. Osofsky JD, Osofsky HJ. Teenage pregnancy: psychosocial considerations. *Clin Obstet Gynecol.* 1978; 21 (4): 1161-73.
11. Felice MF, James M, Shragg P, Hollingsworth DR. Observations related to chronologic and gynecologic age in pregnant adolescents. *Yale J Biol Med.* 1984; 57:777-85.
12. Spellacy NW, Mahan SC, Cruz CA. The adolescent's first pregnancy: A controlled study. *South Med J.* 1978; 71: 768-71.

13. Dwyer JF. Teenage pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1974; 118: 373-7.
14. Hunt WB. A fertilidade na adolescência: riscos e conseqüências. *Popul Rep.* 1976; 10: 157-91.
15. Mathias L, Nestarez JE, Kanas M, Neme B. Gravidez na adolescência IV - Idade limite de risco reprodutivo entre adolescentes. *J Bras Ginecol.* 1985; 95: 141-3.
16. Wilson RD, Kendrick V, Witmann BK. Spontaneous abortion and pregnancy outcome after normal first-trimester ultrasound examination. *Obstet Gynecol.* 1986; 67: 352-5.
17. Motta ML. Influência da idade materna e da idade ginecológica sobre os resultados maternos e neonatais da Gravidez na Adolescência. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, 1993.
18. Knudsen UB, Hansen V, Juul S, Secher NJ. Prognosis of a new pregnancy following previous spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol.* 1991; 39: 31-6.
19. Kubli F. Muerte fetal intrauterina em la segunda mitad del embarazo. In: Kaser O. *Ginecologia y Obstetricia.* Barcelona: Salvat; 1974.
20. Marchetti AA, Menaker JS. Pregnancy and the adolescent. *Am J Obstet Gynecol.* 1950; 59: 103.
21. Romero MIS. Embarazo, parto y recién nacido en madres adolescentes. *Rev Chil. Ped.* 1983; 54: 123-30.
22. Mathias L, Nobile L. Considerações sobre o ciclo grávido- puerperal na adolescência. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 1986; 8: 252-6.
23. Faundes A, Fanjul B, Henriquez G, Mora G, Tognola G. Influencia de la edad y la paridad sobre algunos parametros de morbilidad materna y sobre la morbimortalidad fetal. *Rev Chil Obstet Gynecol.* 1972; 37: 6-11.
24. Pinto e Silva JLC. Contribuição ao estudo da gravidez na adolescência. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, 1982.
25. Parpinelli MA, Pinto e Siva JLC, Pereira BG et al. Distúrbio hipertensivo na gravidez acompanhado por Síndrome HELLP. *Rev Bras Ginec Obstet.* 1994; 16: 129-34.
26. Mc Anarney ER. Adolescent pregnancy: A national priority. *Am J Dis Child.* 1978; 132: 125-9.
27. Moura JVC. Gravidez na Adolescência. Tese (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1991.
28. Costa C. Primiparidade precoce na maternidade Professor Monteiro de Moraes: 1977 – 1979. Aspectos obstétricos e neonatológicos. Tese – Faculdade de Ciências Médicas de Pernambuco, 1980.
29. Sarrel PM, Klerman LV. The young unwed mother. Obstetric results of a program of comprehensive care. *Am J Obstet Gynecol.* 1969; 105:575-8.
30. Lippi UG, Andrade AS, Bertagnon JRD, Melo E. Fatores obstétricos associados ao baixo peso ao nascer. *Rev Saúde Pública* 1989; 23 (5): 382-7.

# Sistema de Apoio ao Ensino de Ginecologia Endócrina através de Variáveis Clínicas na Plataforma World Wide Web

Support system to Gynecological Endocrinology teaching program through clinical variables at World Wide Web

Ana Paula Rodrigues<sup>1</sup>, Vivian Ferreira do Amaral<sup>2</sup>, Cláudia Cabral Moro<sup>1</sup>, Laudelino Cordeiro Bastos<sup>1</sup>.



Profª Vivian Ferreira do Amaral

A Professora Vivian Ferreira do Amaral é Doutora em Tocoginecologia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP. É Professora Adjunta de Ginecologia e da Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CCBS-PUCPR) e Professora Adjunta de Ginecologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

## RESUMO

Os autores desenvolvem projeto que visa estudar, especificar e implementar um sistema de apoio ao ensino de Medicina através da seleção de variáveis de um caso clínico.

**UNITERMOS:** Ensino médico; Ensino da Ginecologia.

## Introdução

A educação médica é um desafio por sua complexidade, pois engloba diferentes ciências como: biológicas, exatas e humanas.

As escolas médicas possuem a responsabilidade de formar profissionais competentes e capazes de solucionar problemas em diferentes contextos, adaptados a realidade de suas profissões.

Na busca da formação completa, as instituições de ensino têm realizado grandes investimentos e vêm modificando através dos anos a educação médica. Os primeiros regis-

tros significativos, de modificação são encontrados na publicação do relatório Flexner datado de 1910.

Esse relatório caracterizou a ciência pela fragmentação do conhecimento em áreas, nas quais pequenas partes eram desconectadas do todo para facilitar a sua transmissão. O ensino médico tradicional é focado no transmissor de conhecimentos: o professor.

Durante a década de sessenta, houve um movimento com o propósito de modificar a estrutura de preparação de profissionais da saúde. A iniciativa partiu da Universidade de McMaster, Canadá, em 1965, que estudou, desenvolveu e introduziu a metodologia do ensino PBL – Problem Based Learning, que é conhecida no Brasil como ABP - Aprendizagem Baseada em Problemas.

Esta metodologia possui como premissa a exposição antecipada dos estudantes a situações reais encontradas em sua profissão, o que incentiva o seu auto-aprendizado.

O PBL foi, e ainda é, uma quebra de paradigma no ensino da Medicina, pois evolui no sentido contrário ao ensino tradicional que apresenta os conteúdos em forma de roteiros pré-determinados.

Para a implantação desta metodologia, além da mudan-

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Correspondência:

Profa. Dra. Vivian Ferreira do Amaral

Professora Adjunta de Ginecologia e do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade do Paraná- (PPGCS-PUCPR).

E-mail: [v.amaral@pucpr.br](mailto:v.amaral@pucpr.br)

[laudelino.bastos@pucpr.pr](mailto:laudelino.bastos@pucpr.pr)

Tel.: (41) 3271-1785

ça na forma de exposição dos conteúdos, a estrutura organizacional do curso deverá ser modificada. Entre algumas alterações está a substituição de classes com grande número de estudantes por pequenos grupos de discussão, cada um acompanhado de um tutor.

Como recursos educacionais, os tutores utilizam principalmente a discussão de casos clínicos em grupo e, em momentos oportunos, é realizado o contato direto com pacientes ambulatoriais. Este contato se torna mais eficaz quando os estudantes se deparam com um paciente que apresenta o mesmo problema que o estudado nos tutoriais, possibilitando assim que eles possam colocar em prática os conhecimentos do módulo estudado.

Porém em todos os estágios do PBL a resolução do caso é construída pelo grupo, sendo os estudantes avaliados basicamente de duas formas: pela participação durante os tutoriais e através de provas construídas pelos tutores.

O processo ensino-aprendizagem e a busca por alternativas estimulantes, tem o computador e, principalmente, a plataforma WEB, como uma ferramenta auxiliar. A criação de ambientes de Aprendizagem Apoiada por Computador é o reflexo mais atual do enfoque da Aprendizagem Baseada em Problemas. Chapman e Calhoun<sup>5</sup> afirmam que os sistemas de apoio ao ensino facilitam o acesso a informação e tem sido amplamente utilizados nas escolas de Medicina.

A instrução baseada na WEB oferece muitas formas de desenvolver intrinsecamente a motivação do aprendiz, através de inúmeras oportunidades de capturar sua atenção por meio da visualização, novidade, surpresas, humor, questões provocantes e metáforas intrigantes.

### *Objetivos do Trabalho*

Este trabalho tem o intuito de estudar, especificar e implementar, um sistema de apoio ao ensino de Medicina através da seleção de variáveis de um caso clínico. Seus objetivos específicos são:

- a) desenvolver um software educacional adequado ao Programa de Aprendizagem do curso de Medicina da PUCPR
- b) Criar um sistema de seleção de variáveis de um caso clínico de Ginecologia endócrina no módulo Saúde da Mulher;
- c) Testar e avaliar a utilização dos recursos computacionais como a internet por uma amostra de estudantes de medicina e participantes dos tutoriais de Ginecologia-Saúde da Mulher
- d) Oferecer aos tutores uma visualização individual da solução dos estudantes.

## Material e Métodos

Este trabalho foi tema da dissertação de mestrado da pós graduanda Ana Paula Rodrigues. Foi desenvolvida junto ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde (PPGTS) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob a orientação do Prof. Dr. Laudelino Cordeiro Bastos. Foram co-orientadoras: a Profa. Dra. Cláudia Maria Moro Barra e Profa. Dra. Vivian Ferreira do Amaral. O projeto foi enviado e aprovado pelo Comitê de ética da PUCPR.

Para o desenvolvimento do sistema foi utilizado o modelo de ciclo de vida em Espiral, com seus ciclos evolutivos incrementais, sendo realizados dois ciclos para a conclusão e testes do sistema.

Para o levantamento de requisitos, foram realizadas reuniões com os tutores do curso de Medicina da PUCPR. Após inteiração com a metodologia de ensino PBL, definiu-se a disciplina de Ginecologia no módulo Saúde da Mulher como objeto de estudo deste trabalho. Foram elaborados casos clínicos de Ginecologia Endócrina para a aplicação do sistema.

Iniciou-se então a investigação sobre a aceitação e utilização da internet por estudantes de Medicina que participam do plano de aprendizagem selecionado.

Foi aplicado o questionário de Heinzen, além de investigar a acessibilidade, confiança e pré-disposição à utilização da internet por estudantes de Medicina.

Foi também realizada uma pesquisa na literatura para buscar outros modelos de softwares educacionais, voltados aos cursos de Medicina. Como resultado dessa pesquisa percebeu-se que a iniciativas internacionais pesquisadas como Crocodile e ALF, não se adaptavam aos requisitos do Programa de aprendizagem do módulo Saúde da Mulher (Ginecologia e Obstetrícia). Dentre as iniciativas brasileiras, a Amplia, Cardiocasediscussion, Medstudents, Clínica Atual, não possuíam a classificação necessária no domínio deste problema.

Para obter informações do paciente, o médico deve questioná-lo, com isso estudou-se as informações necessárias para a realização desses questionamentos. Nesse momento utilizou-se os resultados iniciais do trabalho de Almeida e Bastos, que realizaram o levantamento de informações necessárias para um prontuário eletrônico específico para a área de Ginecologia e Obstetrícia nos hospitais atendidos pela PUCPR.

Após a fase de levantamento de requisitos, iniciou-se o desenvolvimento do sistema, utilizando Análise e Programação Orientada a Objetos, sendo utilizada a Unified Modelling Language (UML) para a modelagem do sistema.

Para a implementação do sistema foi escolhida a plataforma .NET da empresa Microsoft. O sistema faz uso ainda de uma base de dados para o armazenamento dos usuários, casos e soluções, sendo escolhido o gerenciador de banco de dados da mesma empresa chamado de SQL Server 2000, versão de desenvolvimento.

As estruturas e definições de dados para o prontuário ginecológico foram feitas em XML, sendo as mesmas utilizadas para compor o menu de acesso aos grupos de perguntas, como, por exemplo, Antecedentes Familiares.

O sistema é gerenciado por um programa servidor, o IIS (Internet Information Server 5.0), que é o responsável por disponibilizar recursos e informações para os seus clientes. Para acesso dos usuários a necessidade é de possuir um computador com acesso a WEB e um browser.

Para a validação do sistema, participaram da solução dos casos clínicos de Ginecologia endócrina, quarenta estudantes do nono período do curso de Medicina, cursando o módulo de Saúde da Mulher. O tema do caso clínico utilizado no estudo piloto foi a Amenorréia Secundária por Hiperprolactinemia. Para a validação do sistema o tema sele-

cionado foi Sangramento Uterino Disfuncional. Todos os estudantes que participaram da validação já haviam estudado esse assunto nos tutoriais do módulo.

Para efeito de comparação foi utilizada a resolução do mesmo caso pelo tutor, como padrão ouro.

## Resultados

São apresentados aqui os Casos de Uso, o Modelo de Dados e as funcionalidades desenvolvidas.

### Casos de Uso

Os casos de Uso foram criados para representar as atividades a serem realizadas pelos atores em cada um dos módulos da aplicação. Os casos apresentam as seguintes informações:

- Breve Descrição do Caso de Uso: apresentação sucinta das finalidades do módulo;
- Ator: perfil do usuário que realizará as atividades no módulo;

A Figura 1 apresenta graficamente os casos de uso que serão descritos a seguir.



**Figura 1** - Casos de Uso do sistema.

**Caso de Uso 1 - Acessar o Sistema.** Permite o acesso dos estudantes e/ou tutores ao Sistema de discussão de casos. Registra o início das atividades do estudante. Ator: Estudante/Tutor.

**Caso de Uso 2 - Solucionar o Caso Clínico.** Interface onde os estudantes e/ou tutores iniciaram a solução do caso clínico com a seleção das variáveis do paciente. Ator: Estudante/Tutor.

**Caso de Uso 3 - Comparar Solução.** Nesta etapa os estudantes/tutores selecionam qual solução deseja comparar visualmente com a sua. Ator: Estudante/Tutor

**Caso de Uso 4 - Cadastrar Impressão Diagnóstica.** Após selecionar todas as perguntas o estudante/tutor irá informar a sua impressão diagnóstica, diagnósticos diferenciais juntamente com exames complementares e conduta a ser seguida. Ator: Estudante/Tutor.

**Caso de Uso 5 - Perguntas Complementares.** As perguntas complementares podem ser definidas pelos tutores ao montar o caso clínico e são associadas com as perguntas de nível 1 e nível 2. Ao selecionar uma pergunta de nível 1 ou nível 2 as perguntas complementares são selecionadas. Ator: Estudante/Tutor.

**Caso de Uso 6 - Acessar Estatística.** Após a solução do caso, os tutores e estudantes poderão imprimir suas soluções com todas as informações da solução. Ator: Tutor.

### Modelo de Dados

Após todos os levantamentos de requisitos, foi criado o modelo de dados para armazenar as informações e garantir todos os registros da resolução dos estudantes.

### Funcionalidades

O sistema teve como resultado final as seguintes funcionalidades:

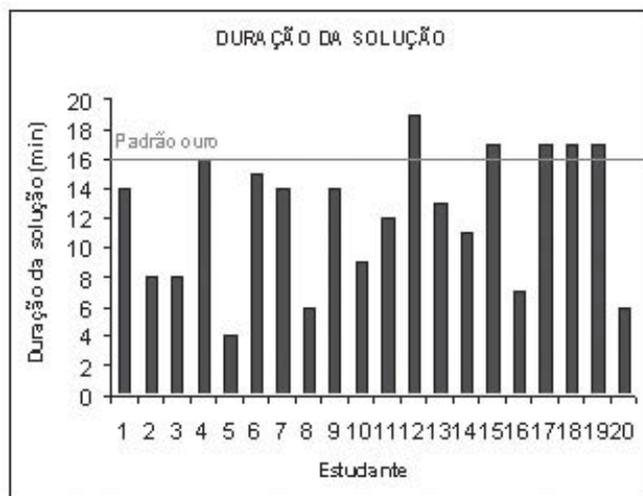
- Acesso - Login:** cada usuário (estudante ou tutor) tem suas credenciais para acesso, para registro de soluções e todas as ações realizadas na solução.
- Solução:** representação gráfica das variáveis selecionadas pelo usuário.
- Podem ser incluídas ou retiradas variáveis da sua solução.**
- Perguntas complementares podem ser definidas para estas variáveis pelo tutor ao montar o caso clínico no protótipo.**
- Impressão Diagnóstica:** campos abertos para respostas sobre hipóteses diagnósticas, diagnósticos diferenciais, conduta e exames complementares.
- Comparação:** as soluções de todos os estudantes e tutores podem ser comparadas através de uma interface gráfica.
- Impressão:** são exibidos todos os itens da solução do caso para que possam ser impressos se desejado.
- Estatística:** os resultados dos casos resolvidos são apresentados com as seguintes informações: nome do aluno, hipótese selecionada, diagnóstico diferencial, exames e conduta, duração da solução, hora de início, hora final, número de variáveis incluídas.

### Validação do sistema

Para a validação do sistema foram analisados: 1) tempo de duração da resolução dos casos, que pode ser visualizado na Figura 2; 2) facilidade de utilização; 3) acesso ao sistema; 4) adequação, cujos resultados estão na tabela 1; 5) aceitação dos estudantes e 6) avaliação da correlação do tempo de resolução (duração) com a quantidade de variáveis selecionadas.

**Tabela 1** - Adequação do sistema.

Perguntas	Frequência (%)
Você considera que o caso apresentou todas as informações que você precisava para decidir sobre a hipótese diagnóstica?	
- Sim	14 (70%)
- Não	6 (30%)
Com relação ao caso clínico respondido na ferramenta e o do tutorial você considera:	
- Mais Fácil	7 (35%)
- Difícil	0 (0%)
- Com a mesma dificuldade	13 (65%)
Você considera que a ferramenta estimula raciocinar sobre o caso a ser resolvido?	
- Sim	19 (95%)
- Não	1 (5%)

**Figura 2** - Duração da resolução do caso pelos 20 estudantes.

## Discussão

Com relação ao sistema, 47,13% dos estudantes consideraram razoavelmente fácil a sua utilização. Não houve apontamento para o uso difícil. Desta utilização, 45,45% da amostra apontou que utiliza a internet de dois a três dias na semana para buscar informações relacionadas à Medicina.

Mesmo após a utilização da ferramenta, considerou-se que a motivação dos estudantes se manteve alta, observando-se o resultado no qual 95% da amostra demonstrou o desejo de resolver outros casos. Pode-se creditar a manutenção da motivação pelo grau de adequação que se conseguiu com o método de estudos por eles utilizado. Outro aspecto positivo foi a motivação lúdica da ferramenta, que capturou a aten-

ção dos estudantes através da visualização, novidade, surpresas e questões complementares.

Percebe-se que os estudantes não apresentaram dificuldades na utilização da ferramenta. Isto pôde ser observado pela junção de três resultados, sendo eles:

- 1) Não foi realizado treinamento prévio para a utilização da ferramenta. O tempo médio para resolução do caso clínico foi de 12,2 minutos, ficando abaixo do padrão ouro considerado.
- 2) Quando questionados sobre a facilidade, 100% dos estudantes indicaram como fácil a utilização da ferramenta de apoio.
- 3) Mesmo tendo que selecionar as informações que desejavam em um menu, fora da ordenação da semiologia, 90% da amostra considerou esta atividade como fácil e 10% como confusa. Nenhum dos estudantes considerou difícil.

Para os professores e para a instituição vislumbram-se algumas possibilidades aqui colocadas como sugestões de aplicação da ferramenta. Atualmente os estudantes discutem os casos e durante as atividades práticas têm contato com pacientes. Porém, isto está vinculado à disponibilidade de pacientes versus diagnóstico, podendo ocorrer à falta dos mesmos para determinadas doenças a serem acompanhadas durante o período de realização dos tutoriais. Com a utilização da ferramenta, essa rotina poderia ser modificada para que além das atividades práticas, se resolvessem outros casos clínicos como reforço de estudo e atividades extra-aula. Utilizando a apresentação da resolução para cada um dos estudantes oferecida pela ferramenta com todas as seleções de variáveis, a hipótese diagnóstica, exames complementares e conduta indicada, acredita-se que o tutor terá outros argumentos para questionar seus estudantes durante os tutoriais e ajudá-los a sanar dúvidas ou dificuldades do caso, antes das provas de avaliação.

## ABSTRACT

The authors develop a research project aiming at studying and implementing a support system to the teaching of Medicine through variables selection of a clinical case.

**UNITERMS:** Medical teaching; Gynecology teaching.

## Referências bibliográficas

1. Albanese MA, Mitchell S. Problem-based learning: a review of literature on its outcomes and implementation issues. *Acad Med.* 1993; 68: 52-81.
2. Filho JB, Paulo LG, Barboza PR. Revisitando as aulas teóricas no curso médico. *Anais da Academia Nacional de Medicina*, 2000. v.106, p141-5.
3. Chapman DM, Calhoun JG. Validation of learningstyle measures: implications for medical education practice. *Medical Education.* 2006; 40: 576 – 583.

## Cesárea: decisão do obstetra ou da gestante?

Cesarean section: patient's choice or doctor's decision?

Affonso Renato Meira



Prof<sup>o</sup> Meira

O Professor Meira é formado em Medicina pela Escola Paulista de Medicina em 1955. Possui pós-graduação em Ciências Sociais pela Fundação Escola de Sociologia e Política de São Paulo em 1964. É Doutor pela Universidade de São Paulo em 1965, Fellow da Milbank Faculty em 1967 e tem pós-doutoramento na University of Kentucky, Medical School, USA, em 1968/69. Livre Docente em 1986 e depois Professor Titular do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 1990. Professor Emérito da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 2004. Membro da Academia de Medicina de São Paulo. Sócio fundador da Sociedade Brasileira de Bioética.

### RESUMO

O autor faz considerações sobre os aspectos éticos da decisão sobre a via de parto. Ressalta que a bioética não obriga e nem traz comportamentos a serem imitados, pois apenas levanta questões e não traz respostas. As respostas, quando possíveis, são produtos de reflexões e pensamentos.

**UNITERMOS:** Bioética; Cesárea a pedido

No dia a dia, na área da atenção à saúde, muitos fatos ocorrem com uma característica de rotina de acontecimentos que são consagrados pelo uso, sem que haja uma preocupação com os fatos através de uma análise das razões do porquê desse comportamento do médico. Isso já se estabelece desde de o momento em que se consagra a relação do profissional com o seu paciente, em que este, na maioria das vezes, procura o médico disponível e não o médico preferido. Nesse sentido a atenção a esse fato como a outros que ocorrem nessa ocasião mostrando como a tolerância da sociedade é manifesta já foi objeto de reflexões<sup>1</sup>. Reflexões que demonstram a vulnerabilidade existente nesse relacionamento. Essa vulnerabilidade, que faz com que a consulta nos termos ideais seja muito difícil de ser atingida, é preocupante quando desse encontro, entre o obstetra e a sua cliente, uma decisão sobre intervir cirurgicamente ou não por ocasião do parto tem que ser tomada, seja na consulta de pré-natal, seja quando da internação na maternidade. Apesar de movimentos procurando mostrar as vantagens financeiras e psicológicas, além da ausência de uma ferida operatória, existentes em partos domiciliares, cresce em

quase todo os países a demanda pela ida da parturiente à maternidade para dar à luz a sua criança. É sempre de hábito em cada situação considerar que a evolução do seu tempo é sempre mais rápida e mais profunda do que em tempos anteriores. Assim o costume do parto hospitalar se difundiu, e com ele a intervenção cirúrgica necessária e a eletiva.

A cesárea é uma intervenção que tem por finalidade a retirada do produto de concepção através da parede abdominal mediante incisão do útero da mulher. A origem corrente deste termo é proveniente do fato de que Júlio César teria vindo ao mundo através da via abdominal. O histórico da cesárea se inicia na mitologia quando Ovídio e Virgílio referem-se à prática da operação<sup>2</sup>. Essa técnica evoluiu absorvendo os estudos científicos realizados no fim dos anos de 1800 e se constitui em prática já no início de 1900. Apesar de que se possa considerar que o parto normal e os atos da cirurgia obstétrica devam ser realizados acatando preceitos incisos e a precisas indicações que não podem ser tomadas por interesses financeiros e nem pela conveniência, seja do médico, seja da parturiente, na realidade, no dia a dia dos tempos atuais, nem sempre isso é o que ocorre.

Geralmente a paciente procura o médico que está ao seu alcance. A organização da atenção médica nega ao paciente o direito de escolha<sup>1</sup>. Isso é verificado em todos os níveis de

Professor Emérito da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Rua Alcantarilla 206, apto. 101. São Paulo – SP. CEP 05717 – 170.  
Telefax: (11) 37439198  
[armeira@usp.br](mailto:armeira@usp.br)

atenção, desde a clínica particular, onde se encontram os médicos autônomos e liberais, passando pelos médicos conveniados, para chegar de modo mais evidente quando a atenção é realizada por médicos empregados nos sistemas mantidos pelo Estado. O primeiro sintoma desse fato é a desconfiança ou a falta de confiança da cliente em relação ao obstetra. Algumas vezes considerando que a paciente é ocasional e a ele procurou porque não conseguiu se consultar com o colega que ela desejava, o obstetra entende que o atendimento a ser oferecido deve ser cumprido com o objetivo de obter uma recompensa e considera que o modo mais fácil de obtê-la é atender ao desejo da cliente, que prefere um parto cirúrgico. Desejo esse que lhe faculta a possibilidade de estabelecer o dia e a hora do nascimento de acordo com suas conveniências. Assim muitas vezes uma cesariana fica decidida longe dos preceitos obstétricos mais corretos. A dúvida é estabelecer a quem cabe essa decisão, uma vez que ela, muitas vezes, não está baseada no que as ciências médicas preconizam para que o parto ocorra nas melhores condições para o nascituro e para a sua mãe. A decisão cabe ao obstetra ou à gestante?

Tendo surgido em um momento histórico em que o mundo recebia inúmeras inovações científicas e tecnológicas relativas à vida humana, o pensamento bioético surgiu não como uma nova disciplina ou sequer uma nova visão ou orientação da ética médica. Com a preocupação a respeito da conduta dos profissionais de saúde, em particular o médico, quando das ocorrências que envolviam a saúde, a vida e a morte, a nova percepção apresentava uma concepção abrangente, não representada pelos interesses de camadas ou categorias sociais. A bioética surgiu como um paradigma holístico, que mais do que uma relação multidisciplinar compreende na realidade uma visão transdisciplinar. É uma idéia acima das disciplinas, pois não possui conteúdo próprio, não possui metodologia estabelecida, não tem finalidade a ser atingida. Nada determina, tudo pode discutir. Não é assunto para especialistas, mas para estudiosos das mais diferentes formações. Estudiosos que levantam suas dúvidas à procura do que deve ser feito como conduta ideal para a sociedade, naquele momento de acordo com a verdade científica, com a emoção das pessoas e com os valores da cultura. Com essa visão é que a análise bioética se faz para compreender o que ocorre na sociedade, não a procura de respostas, mas levantando questões que acontecem no cotidiano ou nos momentos que fatos relevantes em termos da saúde, da vida e da morte, acontecem.

A bioética não obriga e nem traz comportamentos a serem imitados, pois na realidade levanta questões e não traz respostas. As respostas, quando possíveis, são produtos de reflexões e pensamentos. Elas vão ser encontradas em reflexões lógicas buscadas na análise do racional, nos conhecimentos das crenças e da fé, na compreensão do emocional, e no levantamento dos valores culturais que existem em todas as sociedades. Assim em cada hora e em cada lugar é possível obter respostas nem sempre coincidentes ou concordantes<sup>3</sup>.

Em um pensamento, produto da percepção bioética, a primeira análise deve ser feita de acordo com o racional oferecido pelos conhecimentos científicos. Esses conhecimentos

forneem os parâmetros pelos quais se devem conduzir os obstetras. Parâmetros que concretizam a verdade científica, a qual está sujeita a modificações ou aprimoramentos. Essas evoluções acontecem com frequência que não pode ser olvidada. Ao se refletir sobre no que se basear para tomar a decisão de se realizar uma cesárea, um primeiro aspecto, a se tomar em conta, é que ela deve estar restrita à sua necessidade de acordo com o que se encontra nos conhecimentos das ciências da saúde.

A natureza, na sua sabedoria, faz que, na normalidade, nada deve se antepor ao fato da mulher se reproduzir, até sem auxílio. Em culturas de povos ágrafos, como a dos Tupinambás, a mulher dava a luz no chão ou deitada numa tábua assistida por seu marido e parentes<sup>4</sup>. Evidente que com os atuais conhecimentos das ciências da saúde não se preconiza esse tipo de parto, mas o que se deve entender é que uma criança pode vir a nascer sem qualquer auxílio de uma técnica mais sofisticada. Essa tecnologia moderna deve chegar para o auxílio e não como primeira instância a ser tomada. Portanto, o primeiro parâmetro para a realização da cesárea é a indicação precisa estabelecida pelos conhecimentos científicos oferecidos pela obstetrícia, e não o desejo da parturiente ou do obstetra. Havendo uma decisão médica para se efetuar uma operação cesariana é extremamente improvável que a gestante a ela não queira se expor. Não existe barreira cultural alguma que se possa estabelecer para evitar essa cirurgia, e a gestante tem o seu emocional voltado para o parto que vai ocorrer e o seu desejo é que ele se conclua com o nascimento de uma criança saudável. Inclusive por ser uma prática em que a necessidade de se recompor o organismo com transfusão sanguínea é rara, nem mesmo membros de seitas que não aceitam essa terapia apresentam empecilhos.

Dentro ainda do âmbito da razão e do que ensina a Escola Médica o aspecto ético profissional precisa ser atendido. O alvo de toda atenção do médico é a saúde de seu cliente; no caso em pauta o alvo do obstetra é a saúde da gestante, para o benefício da qual deverá agir com o máximo de zelo. É, também, preceito ético a obrigação de informar ao paciente o diagnóstico, o prognóstico, os riscos e os objetivos do tratamento, seja clínico ou cirúrgico. Cabe, portanto ao obstetra informar a paciente todos os passos que são tomados em uma intervenção cirúrgica, esclarecendo os riscos que dela podem advir, e obter um consentimento depois de uma informação detalhada.

Em um segundo momento é preciso verificar como a sociedade sente o assunto, quais os aspectos emocionais que o envolve e quais são os valores culturais percebidos. Em uma sociedade urbano-industrializada, característica das sociedades ocidentais, o valor da medicina baseada nos conhecimentos das ciências da saúde é a que se considera aceita por todos. É verdade que a medicina alternativa sempre consegue ocupar um local para se estabelecer com seus conhecimentos empíricos ou místicos<sup>5</sup>. Todavia, no que se refere à decisão de decidir por uma intervenção cesariana, esses valores afastados da medicina científica não apresentam objeções.

Na sociedade contemporânea a intervenção cirúrgica na ocasião do parto é entendida pela mulher como uma solu-

ção prática que evitaria a dor do parto e as eventuais deformações físicas. Essa preferência pode ser considerada justa e compreensível em razão da angústia e da ansiedade e da crença que a cesárea evita o sofrimento causado pelo parto natural<sup>6</sup>. Esse entendimento que leva ao desejo da gestante de querer uma intervenção para dar à luz, é acompanhado muitas vezes pelo desejo da gestante de um parto cirúrgico que a possibilita a solicitar ao cirurgião que proceda a laqueadura tubária. O princípio da autonomia do paciente que é referido nas normas éticas da medicina brasileira quando considera vedado ao obstetra, ou qualquer outro médico, desrespeitar o direito da paciente de decidir livremente sobre a execução de práticas diagnósticas ou terapêuticas, salvo em caso de iminente perigo de vida, tem como finalidade o respeito à pessoa do paciente e não a obrigação do médico de atender o que queira o paciente. No caso de o obstetra ou qualquer outro médico, e o cliente ou a gestante, não estabelecerem uma concordância sobre os procedimentos a serem realizados, pode o obstetra dentro dos padrões éticos em vigor encaminhar a paciente para outro médico.

Como corolário dessas reflexões caberia saber o que deve ser definido, quando não existe uma indicação obstétrica precisa para ser efetuada a cirurgia e a gestante tem o seu emocional solicitando a realização de uma cesariana. A quem cabe decidir: ao obstetra ou à gestante? A bioética, como já foi referido, não traz normas ou respostas, somente leva a pensar e a refletir sobre as situações. Dessa análise talvez possa restar dizer que cabe ao obstetra tranquilizar a gestante e explicar as vantagens e a naturalidade do parto normal e esclarecer os riscos, inclusive os que podem ocorrer com quem se submete a uma anestesia, seja geral ou regional. A decisão de uma intervenção será produto da avaliação desses riscos em relação com a angústia e os receios da gestante convertidos no seu desejo de um parto através de uma cirurgia. Juntos, obstetra e gestante saberão avaliar o que deva ser realizado verificando na oportunidade os riscos e os benefícios da decisão a tomar frente à situação estabelecida.

Os fatores financeiros de uma recompensa melhor, ou da conveniência de estabelecer dia e hora para o nascituro vir à luz, razões muitas vezes consideradas, parecem não ter substância para uma aceitação social.

---

## ABSTRACT

The author analyses the ethical aspects about the decision regarding the ways of delivery, and stresses that the Bioethics does not determine a behavior to be imitated, but arises doubts and questions. The answers, when possible, are just consequence of reflections.

**UNITERMS:** Bioethics; Cesarean on request

---

## Referências bibliográficas

1. Meira AR. Bioética e vulnerabilidade: o médico e o paciente. *Rev Assoc Med Bras.* 2004; 50(3):249-51
2. Prado EM. Reflexões sobre a cesárea segmentar transperitonial. São Paulo: Gráfica Saraiva; 1959
3. Meira AR. Bioética: a ética da cidadania. *Cad Posgrad: Saúde Pública (Santos).* 2002; 1(1):1-32.
4. Ramos A. Introdução à Antropologia Brasileira: as culturas não européias. Rio de Janeiro: Livraria Editora da Casa do Estudante do Brasil; 1961.
5. King SH. Perceptions of illness and medical practice. New York: Russel Sage Foundation; 1962.
6. Ventura GAB. Viabilidade da redução de cesáreas em maternidade pública da cidade de São Paulo. Prêmio Abramge de Medicina, 1999.

A Revista Reprodução & Climatério publica artigos originais, artigos de atualização, opiniões, breves comunicações, relatos de caso e cartas ao editor (no máximo 500 palavras), na área de medicina reprodutiva, climatério, ginecologia endócrina e sexualidade. São aceitos artigos em português, espanhol ou inglês.

Os originais devem ser encaminhados para a SBRH, aos cuidados do editor, exclusivamente por correio eletrônico, para: [sbrh@terra.com.br](mailto:sbrh@terra.com.br)

Os originais devem ser escritos em folha A4, com espaço duplo e margens de 3 cm, em páginas numeradas. A fonte a ser utilizada é a Times New Roman, tamanho 12.

Os originais devem ser preparados na seguinte seqüência:

**Página de Rosto:** título do trabalho em português e inglês (o título não deverá ser colocado em negrito ou caixa alta), título conciso (de 2 a 4 palavras, para constar no alto da página), nome completo dos autores (exemplo: Patrick Steptoe), nome da(s) instituição(s) onde o trabalho foi desenvolvido, nome, endereço e e-mail do autor para correspondência.

**Resumo:** Deverá conter no máximo 200 palavras e ser estruturado, contendo Objetivos, Material e Métodos, Resultados, Conclusões e Unitermos. Evitar, no resumo, abreviações e referências bibliográficas. Deverá ser acrescentado um resumo conciso, de 2 ou 3 linhas com as principais conclusões do trabalho, para ser colocado no índice da revista. Para artigos de atualização, comunicações breves, opiniões e relatos de casos, não é necessário que o Resumo seja estruturado.

**Abstract:** Versão pra o inglês do texto do Resumo, acompanhado de *Uniterms*.

**Texto do trabalho:** Deverá conter Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas. As abreviações devem ser restritas e sempre definidas na primeira aparição no texto. Eventuais tabelas deverão ser numeradas em algarismos arábicos, com título explicativo do conteúdo. Não se colocam traços verticais e limita-se os horizontais a um acima da tabela e um ao final. As figuras, fotos ou desenhos devem ser limitados ao estritamente necessário, e serão numerados em algarismos arábicos, com legenda explicativa. Tabelas, fotos, figuras e desenhos devem ser enviados em páginas separadas. Nas referências bibliográficas, as citações devem obedecer às normas de Vancouver. Maiores esclarecimentos poderão ser obtidos no site: [www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). Numere as referências por ordem de entrada no trabalho e use estes números para as citações no texto. Todos os autores devem ser citados, exceto quando houver mais de 6 autores, quando se pode citar os 6 primeiros seguidos pela expressão latina et al. Observe alguns exemplos de citações:

## Artigos em periódicos:

1. Nahas EAP, Pontes A, Nahas Neto J, Traiman P, Luca L, Abbade J. Efeitos da atividade física e da tibolona sobre a densidade mineral óssea em mulheres na pós menopausa. *Reprod Clim.* 2001;16:47-52.

2. Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res.* 2002;935:40-6.

## Volume com suplemento:

3. Geraud G, Spierings EL, Keywood C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache.* 2002;42 Suppl 2:S93-9.

## Livros:

4. Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management.* 2<sup>nd</sup> ed. New York:Raven Press; 1995. p.465-78.

5. Norman IJ, Redfern SJ, editors. *Mental health care for elderly people.* New York: Churchill Livingstone; 1996.

## Cartas e Editoriais:

6. Kremer J. Yardsticks for successful donor insemination [letter]. *Fertil Steril* 1991; 55:1203-4.

7. Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994; 84:15.

Os manuscritos serão avaliados pelo Conselho Editorial de Reprodução & Climatério, podendo ser recusados, aceitos sem correções, ou aceitos com sugestões de correções, sendo neste último caso reencaminhados aos autores. Após aceitação definitiva, deverá ser feita carta assinada por todos os autores, fazendo menção que o manuscrito não foi publicado anteriormente e dizendo concordar com a publicação e transferência de *copyright* para Reprodução & Climatério. Os editores reservam-se o direito de fazer alterações gramaticais e estruturais que julgarem necessárias.