

AVALIAÇÃO CLÍNICA

Lidio Jair Ribas Centa

Anamnese

A cuidadosa e meticulosa tomada da história clínica do paciente com infertilidade é de importância relevante na constatação da etiologia da infertilidade masculina, pois através dela podemos ter um diagnóstico presuntivo de até um quarto dos casos. Devemos realizá-la na presença da esposa e ser simples e objetiva, tomando os dados de importância cronologicamente, desde antecedentes familiares até a história conjugal. Entre estes, a idade dos pais quando nasceu este indivíduo (maior frequência de cromossopatias em pais com idade avançada), parentesco entre os pais (presença de alterações hereditárias entre os progenitores), além do estado de saúde dos pais, irmãos e presença de alguma patologia relacionada com a constituição: enfermidades infecciosas, metabólicas e endócrinas.

Quanto a antecedentes pessoais, a criptorquidia é o achado mais importante na infância; a sua presença e quando os testículos tiveram o seu descenso até a bolsa escrotal deve ser considerado. Alguns pacientes referem que tiveram os seus testículos ao nascer na bolsa, mas que em algumas semanas eles subiram para a região inguinal ou desapareceram. Este dado é importante para discernir uma criptorquidia falsa de uma verdadeira e tem grande valor no prognóstico da infertilidade.

A torção do cordão espermático é uma causa rara de infertilidade ou esterilidade. A presença de dores, inchaço testicular durante a adolescência ou antes da puberdade pode levar a suspeita de sua presença. Traumatismos testiculares somente tem importância quando ocorreram com aumento de volume, hematoma com posterior atrofia testicular.

Os processos infecciosos agudos ou crônicos podem estar relacionados a uma deficiência da fertilidade. O aumento das infecções por Chlamydia podem ir de uma simples uretrite até uma epididimite desencadeando um processo imunológico ou de obstrução do epidídimo ou das vias seminais. A orquite pós parotidite, menos freqüente atualmente, quando manifesta após a puberdade, é responsável pela falência exócrina testicular.

Interrogar sobre cirurgias, principalmente as realizadas sobre escroto e/ou trajeto dos cordões espermáticos.

A quimio ou a radioterapia são tratamentos médicos que levam até a uma esterilidade irreversível dependendo da dose e do tempo de uso. Outras substâncias com as sulfasalazina, espirolactona, nitrofurantoina, nidrazole, e a colchicina podem afetar diretamente a espermatogênese resultando numa teratozoospermia e, algumas vezes, oligozoospermia. Anabolizantes deprimem a espermatogênese.

A varicocele, pela sua importância relacionada à infertilidade deve ser valorizada: tipo de tratamento para a sua cura, quando foi realizado e seu seguimento.

No histórico sexual, avalia-se a presença do libido, tipo de coito, qualidade da ereção e do ejaculado.

Mal-formações penianas (epispadia ou hipospadia) podem causar esterilidade por fator coital.

Fatores ambientais e ocupacional podem também interferir com a capacidade reprodutiva. Exposição crônica a metais pesados como o chumbo, cádmio e mercúrio ou outras

substâncias como pesticidas, inseticidas, etileno ou ésteres fenólicos reduzem a fertilidade. Etilismo, tabagismo ou uso de drogas não lícitas também tem seus efeitos deletéricos sobre a espermatogênese.

Exame Físico

Recomenda-se que o exame físico seja realizado em um ambiente adequado, a sós com o paciente. Aproveita-se a ocasião para além do exame físico propriamente dito, perguntar o que não se deve na presença da esposa, como doenças sexualmente transmissíveis, outros relacionamentos, principalmente com presença de gravidez. É uma ocasião para estreitar o relacionamento médico-paciente.

O exame físico deve ser realizado com o intuito de detectar anormalidades não só referentes ao aparelho genital mas também de outros sistemas que possam interferir na capacidade espermatogênese do paciente.

Peso, relação envergadura/altura, distribuição do tecido adiposo e dos pêlos, desenvolvimento muscular e característica da pele são dados importantes na avaliação física geral. A presença de ginecomastia é outro dado importante que pode refletir em causa hormonal, tumoral ou até o de diferentes drogas que causam o seu aparecimento.

No exame físico do pênis deve-se observar a presença de fimose, aparência da mucosa balânica, presença de doença de Peyronie, situação do meato uretral e presença de secreção uretral.

Na bolsa escrotal, observar a presença de cicatrizes, a sua espessura bem como a sua rugosidade e coloração; a manobra de Valsalva para detectar varicocele clínica e a palpação dos deferentes. Os deferentes são facilmente palpáveis, em todo o seu trajeto na bolsa escrotal.

Quanto aos testículos, atentar para:

Sensibilidade e superfície: a sensibilidade à palpação faz com que geralmente o paciente manifeste o reflexo da defesa. Não há relação do aumento da sensibilidade testicular com patologia testicular. A superfície deve ser lisa e sem irregularidades.

Situação: devem estar livres na bolsa escrotal e não ascender além do anel inguinal superficial.

Consistência: deve ser firme e elástica. Testículos com aumento ou diminuição da consistência são sempre patológicos.

Volume: mede-se utilizando-se de orquidômetros ou simplesmente os três diâmetros utilizando-se de um paquímetro ou ecografia escrotal. Existe uma estreita relação com o volume testicular e o número de espermatozóides: deve ser superior a 20 cm³.

Os epidídimos aparecem na região crânio-dorsal em relação com os testículos. Inchaço com dor à palpação pode refletir um processo inflamatório agudo ou crônico. Aumento da cabeça pode ser decorrente de cistos ou de obstrução ou agnesia do corpo ou da cauda epidídimo. Nódulos entre os epidídimos e os deferentes palpáveis devem ser verificados.

No exame da próstata deve-se observar a sensibilidade, superfície, consistência e limites. As vesículas seminais normalmente não são palpáveis.

Após a realização da anamnese e do exame físico, iniciamos a investigação solicitando um espermograma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Behre HM, Yeung CH, Holstein AF, Weinbauer GF, Gassner P, Nieschlag E. Diagnosis of Male Infertility and Hypogonadism, in: Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction. 2ª Edição. New York: Springer, 2000
- 2- Bortoluzzo C. História e exame físico. In: Neves PA, Netto Jr. NR. Infertilidade Masculina. São Paulo; Atheneu, p. 51-55, 2002
- 3- Lipshultz LI, Howards SS. Infertility in the male. New York; Churchill Livingstone, 1983
- 4- Lipshultz LI, Howards SS. Infertility in the male. Boston: Mosby, Third Edition, p. 173-190, 1997
- 5- Nieschlag E, Behre HM. Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction. Germany: Springer, p. 88-110, 1997
- 6- Pomerol JM, Egozcue J, Elizalde C, Jimenez F, Marina, S, Matz JA, Pinto B, Zungri ER. Actas de La Asociacion Espanola de Urologia. San Sebastian: La Tipografica, V. 1, p. 59-62, 1973

ESPERMOGRAMA

Lidio Jair Ribas Centa

O espermograma é uma análise que, rotineiramente, é realizada em todo o laboratório de Reprodução Humana. É o "termômetro" para avaliação da fertilidade do indivíduo.

Para estandarização dos métodos laboratoriais e os seus resultados, o exame do ejaculado deve ser sempre realizado de acordo com o guia da Organização Mundial da Saúde, o qual é explicado em detalhes no WHO Manual Laboratorial para Exame do Ejaculado Humano e Interação do Muco Cervical (WHO 1999).

O plasma seminal é composto pelas secreções dos testículos, epidídimo e glândulas acessórias responsáveis pela atividade metabólica do espermatozóide.

COLETA DO EJACULADO

A amostra é obtida através da masturbação, de preferência na clínica em ambiente próprio, conforme RDC 33, ANVISA, ou no domicílio. Deve ser encaminhada ao laboratório dentro da primeira hora após a ejaculação. A coleta é feita em frasco plástico neutro, com boca larga, fornecido pelo laboratório e após um período de abstinência sexual de 2 a 5 dias.

EXAME FÍSICO

VOLUME – O volume do fluido produzido pelas glândulas anexas varia de indivíduo para indivíduo e num mesmo indivíduo dependendo da estimulação androgênica, do tamanho e constituição das glândulas e dos dias de abstinência sexual. Deve ser medido em tubo graduado e considera-se normal um volume superior ou igual à 2 ml.

COAGULAÇÃO – LIQUEFAÇÃO – Logo de sua emissão o esperma sofre um processo de coagulação apresentando-se como uma massa firme, de superfície amorfa. Dentro de 10-20 minutos este coágulo é liquefeito num sêmen normal tomando um aspecto opalescente, translúcido ou semi-translúcido dependendo da concentração das células que possui. Este processo depende da ação da testosterona e os substratos responsáveis pela coagulação provêm das vesículas seminais enquanto as enzimas responsáveis pela liquefação encontram-se na glândula prostática. Toda e qualquer análise é realizada somente após completada a liquefação ou seja dentro da primeira hora pós a ejaculação.

VISCOSIDADE – Pode ser determinada semi-quantitativamente, introduzindo um bastão de vidro na amostra e medindo o comprimento do filamento que se forma quando mesmo é levantado; ou ainda com auxílio de seringa (contendo a mostra) e agulha observa-se o comprimento do filamento formando ao empurrar o êmbolo que não deve ultrapassar 2 cm.

pH – Em condições normais o pH do esperma é ligeiramente alcalino, variando de 7.2 a 7.8 quando avaliado dentro da primeira hora após a ejaculação. Valores superiores podem ser

indicativos de infecção e valores inferiores pode revelar uma disfunção ou aplasia das vesículas seminais ou obstrução dos ductos ejaculatórios.

ODOR – Normalmente o sêmen possui odor forte e pungente característica devido a oxidação de espermina (base nitrogenada) produzida pela glândula prostática. Um odor pútrido pode indicar um processo infeccioso.

EXAME CITOMORFOLÓGICO

Realizado ao microscópio este exame nos informará da presença ou ausência de espermatozóides como também da sua motilidade.

Estudo da Motilidade Espermática

O estudo da motilidade espermática se baseia a observação subjetiva de uma gota de sêmen colocada entre lâmina e lamínula à temperatura ambiente. Vários campos são examinados para se determinar a porcentagem de formas móveis e o tipo de motilidade dos espermatozóides. Segundo a OMS classifica-se a motilidade de acordo com as seguintes categorias:

- a) Espermatozóides com motilidade rápida e linear (Velocidade linear maior ou igual a 22 um/seg.)
- b) Espermatozóides com motilidade lenta, linear ou não linear. (Velocidade menor que 22um/seg.)
- c) Espermatozóides com motilidade não progressiva. (Velocidade menor que 5 um/seg.)
- d) Espermatozóides imóveis.

Um sêmen dentro da normalidade deve apresentar 50% ou mais de espermatozóides pertencentes as categorias **a** e **b** ou no mínimo 25% pertencentes a categoria **a**.

Um estudo mais preciso pode ser realizado utilizando-se métodos objetivos como a técnica da fotografia de exposição múltipla (MEP) e mais recentemente o sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), totalmente automatizado.

Vitalidade

Esta prova tem como objetivo a avaliação de proporção entre células vivas e mortas. É realizada uma coloração supravital (solução de Eosina a 0.5 % em soro fisiológico ou solução de Eosina a 1 % e em seguida contrastados com nigrosina a 10% em água destilada) onde as células mortas se mostram coradas, devido à perda da seletividade de sua membrana permitindo a entrada destes corantes. Um sêmen considerado normal deve apresentar no mínimo 50% de espermatozóides vivos (não corados).

Determinação da Concentração de Espermatozóides

Pode ser realizada utilizando hemocitômetros ou com auxílio da Câmara de Makler. Na Câmara de Makler uma gota de sêmen (10µl) não diluído e bem homogeneizado e previamente imobilizado é colocada no centro e coberta com a lamínula adequada. Dependendo da quantidade de espermatozóides contam-se 10 quadradinhos multiplicando o resultado por 1.000.000 ou 100 quadradinhos multiplicando o número encontrado por 100.000.

Quando se utiliza hemocitômetros é necessário realizar uma diluição que dependerá da primeira estimativa feita entre lâmina e lamínula. No hemocitômetro de NEUBAUER geralmente se contam e quadrados da área central e o número encontrado será multiplicado por um fator que vai depender da diluição realizada.

Valores considerados normais não devem ser inferiores a 20.000.000 espermatozóides/ml.

A contagem é realizada em microscópio de fase com aumento de 200x.

Exame Morfológico

Prepara-se uma extensão do esperma numa lâmina limpa. A preparação é corada pelo método Shorr, de Diff-Quik, ou de preferência pelo método Papanicolaou e examinada ao microscópio sob objetiva imersão. O espermatozóide normal apresentar-se-á com uma cabeça oval com contornos regulares, núcleo e acrossoma facilmente reconhecíveis; a peça intermediária situada no prolongamento da cabeça pouco visível ao microscópico segue-se o flagelo propriamente dito.

Cabeça oval – medindo de 4,0 a 5,0 µm de comprimento e 2,5 a 3,5 µm de largura.

A região do acrossoma deve compreender entre 40 a 70% da área da cabeça.

A peça intermediária deve medir menos que 1µm de largura.

A cauda ou flagelo situado no seguimento da peça intermediária deve medir aproximadamente 4.5 µm de comprimento.

Um critério estrito deve ser aplicado para se analisar a morfologia do espermatozóide.

As variações de forma em qualquer das partes do espermatozóide são observadas e sua percentagem deve ser determinada. Um sêmen normal deve apresentar no mínimo 15% de formas normais.

OUTRAS CÉLULAS – Na extensão preparada pode-se visualizar outras células distintas dos espermatozóides; elas provêm do trato genital (células germinativas, epiteliais prostáticas ou vesiculares) células epiteliais provenientes da uretra e mesmo leucócitos. Normalmente se apresentam em pequena quantidade (1 a 2%) e um aumento de qualquer uma delas exige uma investigação minuciosa. Valores superiores a 1.000.000 de leucócitos/ml podem ser indicativos de um processo infeccioso.

EXAME BIOQUÍMICO

Diferentes substâncias podem ser mensuradas no ejaculado, as quais são secretadas por órgãos específicos (próstatas e vesículas seminais), ou outras estruturas do aparelho reprodutor (epidídimos) que serve como marcadores da sua função. Como princípio geral a diminuição dos marcadores das suas funções significa deficiência nas suas secreções ou obstrução distal dos deferentes.

Realizado no plasma seminal, isto é, os espermatozóides devem ser removidos por centrifugação, pois suas enzimas metabolizam vários constituintes seminais. São feitas determinações como: dosagem de frutose (onde se avalia as funções das vesículas seminais); dosagem do ácido cítrico (as funções da próstata são avaliadas).

Valores de referência:

Para a frutose:

- método de Roe: de 200 a 380 mg%

Segundo a OMS: 13 umol por ejaculado.

Para o ácido cítrico:

- método de Chambom: de 310 a 620 mg%

Segundo a OMS: 52 umol (10 mg ou mais por ejaculado).

Ainda podem ser avaliadas outras substâncias como o zinco, a fosfatase ácida prostática, a glicerilfosforilcolina, a N carnitina, as prostaglandinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 7- Hafez, Techniques of human andrology, North-Holland Publishing Company – New York, 1977
- 8- Kell, Brooks A & Webster, Bobby W; CRC Handbook of the Laboratory Diagnosis on Treatment of Infertility. Boston, 1990.
- 9- Neves PA, Sampaio FJB, Vanucchi EH. Espermograma (análise seminal), in: Infertilidade Masculina - I Consenso Brasileiro. São Paulo: BG Cultura., 1999.
- 10- III Congresso Nacional de Andrologia. Zagaroza, abril 1987 ASES
- 11- Waart JV, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structures literature review. In: Human Reproduction Update, Vol. 7, nº 5 pp. 495-500, 2001
- 12- WHO, Laboratory Manual for the examination of human sêmen and sêmen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, 1999

PROVAS E TESTES DE FUNÇÃO ESPERMÁTICA

Fábio Firmbach Pasqualotto

PROVAS DE FUNÇÃO ESPERMÁTICA

Análise Computadorizada dos Parâmetros Seminais (CASA)

O principal objetivo da análise computadorizada na avaliação do sêmen é de fazer com que os resultados sejam iguais em diferentes situações e em diferentes laboratórios, principalmente em relação aos sub-parâmetros da motilidade espermática.

A tecnologia empregada nestes sistemas utiliza videomicrografia na determinação das variáveis da motilidade, por meio do monitoramento constante e da análise seqüencial do movimento dos espermatozóides. Sistemas CASA medem a concentração espermática, e parâmetros da motilidade como, velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear (VL), linearidade (LIN), e amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ADL). Ainda existem alguns problemas na utilização de sistemas automatizados, particularmente com concentração espermática menor que 20 milhões/ml ou maior que 100 milhões/ml. Sempre que houver disparidade superior a 10% entre a análise manual e computadorizada, a manual deve prevalecer.

Teste de Vitalidade dos Espermatozóides pela Eosina-Nigrosina

O teste de vitalidade pelo método de coloração com Eosina-Nigrosina deverá ser efetuado em toda amostra de sêmen onde a motilidade é igual ou inferior a 30%. O teste da Eosina-Nigrosina é realizado imediatamente após a verificação manual da motilidade e tem como valores de normalidade > 50% de viabilidade em amostras normais. Em amostras com motilidade inferior a 30%, a viabilidade deve ser igual ou superior à motilidade da amostra na análise seminal. Tem como objetivo auxiliar na identificação de espermatozóides vivos, mesmo na ausência de motilidade, e pode ser um auxiliar importante no diagnóstico de outras causas de alterações na motilidade como: necrozoospermia, síndrome dos cílios imóveis, problemas genéticos, etc.

Teste do edema hiposmótico (HOS)

O teste do edema hiposmótico é um teste de vitalidade espermática. A integridade funcional da membrana do espermatozóide pode ser demonstrada quando os mesmos são submetidos a uma situação de estresse hiposmolar. O objetivo deste teste é avaliar a capacidade dos espermatozóides de sofrerem edema na cauda quando colocados em uma solução

hiposmótica. Este teste deve ser solicitado quando o paciente apresenta uma astenozoospermia importante (motilidade espermática inferior a 30%). Além disso, é importante quando o paciente apresenta ausência de motilidade espermática e está sendo submetido ao ICSI porque devemos diferenciar entre o espermatozóide com ausência de motilidade e o espermatozóide morto. Quando mais de 60% dos espermatozóides apresentam edema de cauda é considerado resultado normal; indeterminado quando edema de cauda está presente em 51-59% dos espermatozóides e alterado quando o edema de cauda está presente em 50% ou menos dos espermatozóides.

Estudos demonstram que o teste de HOS é fidedigno quando avaliamos sêmen fresco; entretanto, o teste de HOS não é um bom indicador da viabilidade espermática em amostras criopreservadas

Teste de Leucitospermia (Teste de Endtz)

Estima-se que até 20% dos laboratórios que realizam a análise seminal apresentam leucospermia. A presença de células redondas no sêmen deve ser cuidadosamente interpretada, pois significa células imaturas da linhagem germinativa e/ou leucócitos. Para o diagnóstico correto de infecção seminal, é necessária a realização de um teste específico para identificar leucócitos, o teste da peroxidase ou teste de Endtz. Este teste é realizado em células suspensas em sêmen liquefeito e quantificado pela contagem de células marcadas em uma câmara de contagem de Makler. Granulócitos positivos para peroxidase (leucócitos polimorfonucleares) são identificados por colorações com imunohistoquímica e contagens leucocitárias superiores a 1 milhão por ml são consideradas anormais. Este teste é frequentemente referido como teste da mieloperoxidase. Um dos parâmetros tradicionais mais relacionados com o teste de Endtz é a motilidade espermática. O teste de Endtz fornece informações sobre o tratamento de uma possível infecção, evitando o uso excessivo de antibióticos quando da presença de somente espermatozóides imaturos. As consequências advindas da leucospermia dependem da composição celular da população de leucócitos; natureza do estímulo patogênico que induz à infiltração leucocitária; estado de ativação da população leucocitária e da habilidade das secreções das glândulas acessórias em proteger os espermatozóides das citoquinas tóxicas e ERO geradas pelos leucócitos.

Os leucócitos são considerados a principal fonte produtora de Espécies Reativas de Oxigênio no plasma seminal. De fato, apenas um PMN é capaz de produzir 1.000 a 10.000 vezes mais ERO comparado à produção de ERO por qualquer tipo de espermatozóide.

A geração de elevados níveis de espécies reativas de oxigênio pelos leucócitos pode exercer um efeito deletério importante na função dos espermatozóides como indicado por uma redução importante na motilidade espermática e capacidade de penetração oocitária. Pacientes com leucospermia geralmente apresentam elevadas quantidades de espermatozóides imaturos com alteração na morfologia, especialmente presença de espermatozóides com grande quantidade de citoplasma.

Anticorpos anti-espermatozóides

o sistema imune é uma rede complexa de células e produtos celulares para defender contra os microorganismos e corpo estranho. Vários estudos têm revelado que antígenos encontrados no plasma seminal ou ligados aos espermatozóides têm habilidade para induzir auto-imunidade específica, resultando em infertilidade. Quando este fenômeno ocorre, o espermatozóide pode não conseguir penetrar no muco cervical ou ocorre diminuição da motilidade durante o transporte dos espermatozóides em mulheres sensibilizadas. Os homens podem produzir auto-anticorpos contra os componentes seminais ou espermáticos. Os espermatozóides cobertos com tais anticorpos podem falhar tanto na migração pela cérvix uterina, como em atingir o local da fertilização e ou em fertilizar o oócito. Entretanto, alguns estudos sugerem que anticorpos anti-espermatozóides são uma causa relativa e não absoluta de infertilidade.

Os anticorpos anti-espermatozóides pertencem quase que exclusivamente às classes das imunoglobulinas IgA e IgG. Os anticorpos IgA encontrados no sêmen ou no muco cervical têm impacto clínico maior do que os anticorpos IgG. A incidência de anticorpos anti-espermatozóides em casais inférteis varia de 10 a 30%. Estudos estão sendo realizados para caracterizar os antígenos, porque nem todos os antígenos são necessariamente funcionais e nem todos necessariamente prejudicam a fertilidade. Sítios potenciais de contato dos espermatozóides com o sistema imune incluem os ductos eferentes e a “rete testis”. Talvez isto decorra da fraca junção intercelular nestas áreas.

Acredita-se que patologias alteram as barreiras que evitam o contato do espermatozóide com o sistema imune pode resultar na formação de anticorpos anti-espermatozóides.

Traumatismo gonadal, torção testicular após a puberdade, obstrução do trato seminal, varicocele e infecção seminal podem deflagar o mecanismo de formação dos anticorpos anti-espermatozóides. Os anticorpos anti-espermatozóides estão presentes em até 2/3 dos homens vasectomizados. Entretanto, tais anticorpos são geralmente vistos apenas nos primeiros meses após a vasectomia, diminuindo seus níveis com o passar do tempo.

O primeiro passo de todos os métodos de avaliação da presença de anticorpos anti-espermatozóides é a preparação das amostras. Os anticorpos podem ser pesquisados no plasma sanguíneo e no plasma seminal. Além disso, os testes diretos têm a capacidade de mostrar anticorpos aderidos na à superfície do espermatozóide. Os testes mais comumente utilizados para detectar atividade antiespermática são o *mixed antiglobulin* teste (*MAR*) e o *immunobead* teste (*IBT*).

O *MAR* teste baseia-se em uma modificação do teste de Coombs e tem condições de mostrar, no líquido seminal, os anticorpos da classe IgG aderidos à superfície do espermatozóide. São consideradas positivas as amostras que apresentam percentual de ligação igual ou superior a 10%.

O *IBT* baseia-se na utilização de esferas de poliacrilamida revestidas com anti-imunoglobulinas G, A e M. Consideram-se positivas as amostras que têm percentual de ligação igual ou superior a 20%. Além da detecção da IgG, esta técnica possui como vantagem ao *MAR* teste a possibilidade de detecção adicional da IgM e IgA.

Ambos os métodos para avaliação dos anticorpos aderidos à superfície dos espermatozoides são simples e rápidos. Suas limitações estão ligadas ao fato de que não podem ser executados em amostras seminais com oligozoospermia grave e/ou astenozoospermia importante (motilidade igual ou inferior a 30%).

TESTES DE FUNÇÃO ESPERMÁTICA

Experiências clínicas revelaram que não é exatamente o número absoluto de espermatozoides que prediz o prognóstico de fertilidade, mas a sua capacidade funcional. O desenvolvimento de um teste com grande poder para prever a fertilização pelos espermatozoides é o objetivo primordial de qualquer laboratório de pesquisa em andrologia.

Apenas as provas de função espermática - como reação acrossômica, receptores de manose na superfície dos espermatozoides, interação espermatozoide-muco cervical, testes de penetração espermática e hemizona, níveis de Creatina Quinase (CK), Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), Capacidade Antioxidante Total (CATS) e Peroxidação Lipídica (LPO) - podem dar informações referentes à probabilidade de esse homem vir a engravidar a sua parceira. Alguns destes testes, como a aferição das Espécies Reativas de Oxigênio estão sendo rotineiramente realizados por alguns laboratórios americanos nos pacientes com queixas de infertilidade. Estes testes podem auxiliar na indicação de cirurgias para infertilidade masculina, até ajudar a escolher a técnica mais apropriada para reprodução assistida, com uma boa relação custo-benefício.

Teste da creatina-quinase (CK)

Anomalias nos processos bioquímicos, que são a base energética e de motilidade dos espermatozoides, poderiam também levar a uma deficiência no potencial de fertilização. A creatina quinase (CK) pode ser considerada uma enzima-chave na produção e utilização de energia nas células porque facilita a manutenção de níveis intracelulares de ATP. Recentes estudos têm mostrado que os espermatozoides com citoplasma residual em excesso possuem defeitos funcionais e estão associados à redução na motilidade. Os níveis de CK correlacionam-se positivamente com o grau de oligozoospermia, independentemente do diagnóstico clínico da infertilidade, sendo, desta forma, considerada um indicador mais sensível da qualidade seminal e maturidade dos espermatozoides. Recentemente, estudos mostraram uma associação entre altos níveis de CK e ERO em pacientes inférteis, especialmente aqueles com alteração na morfologia dos espermatozoides. Desta forma, a CK é um importante marcador importante de teratozoospermia, especialmente quando se avalia pacientes com varicocele. Altos níveis de CK são inversamente relacionados ao potencial de fertilização do espermatozoide, indicando o grau de maturação celular do espermatozoide.

Experimentos avaliando a viabilidade espermática após a criopreservação demonstraram que os espermatozoides de homens inférteis talvez sejam susceptíveis às alterações induzidas pelo procedimento de congelamento seminal indicado pelos níveis reduzidos de CK. Isto talvez ocorra devido a perda do citoplasma durante a remoção da substância crioprotetora antes do processamento da amostra para a atividade da CK.

Possivelmente esta enzima pode ser utilizada para indicar cirúrgica e acompanhar pacientes tratados por problemas de infertilidade masculina. Nestas circunstâncias, ela poderia ser útil para indicar cirurgia de correção de varicocele em pacientes com qualidade seminal limítrofe para normalidade ou no adolescente solteiro que tem uma varicocele sem ainda ter manifestações laboratoriais ou clínicas de infertilidade. Como pacientes com varicocele podem apresentar morfologia alterada, estudos envolvendo a aferição da CK nesses pacientes são fundamentais.

Teste das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

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. A toxicidade ao oxigênio é um fenômeno inerente a todas as espécies que necessitam de ambiente aeróbio para a sua sobrevivência. Apesar de a geração controlada de ERO possuir efeitos fisiológicos (segundo mensageiros) em muitos diferentes tipos celulares, o Estresse Oxidativo está relacionado com condições patológicas, como infertilidade e câncer. Assim como outras células que vivem em condições aeróbias, a produção de ERO pelos espermatozoides origina-se principalmente da atividade metabólica normal.

De uma maneira geral, as ERO não são detectadas no sêmen de voluntários normais ou homens azoospermicos. Acredita-se que a retenção de citoplasma residual pelo espermatozoide humano em determinadas patologias esteja correlacionada positivamente com a geração de espécies reativas de oxigênio por meio de mecanismos mediados pela enzima citosólica Glicose-6-Fosfato desidrogenase (G-6-PDH). A motilidade espermática é o indicador mais sensível do estresse oxidativo. Baixas concentrações de ERO causam uma diminuição reversível na motilidade espermática devido à depleção do ATP intracelular e insuficiente fosforilação da proteína do axonema.

Estudos prévios detectaram que 25 a 40% das amostras seminais de homens inférteis apresentam altos níveis de ERO, enquanto que não se evidenciou a sua presença em homens azoospermicos, sugerindo que determinadas causas de infertilidade possam estar associadas com a presença de elevados níveis de ERO. AITKEN et al. mostraram que homens com níveis elevados de ERO possuem sete vezes menos chances de engravidar as parceiras comparadas a homens com baixos níveis de ERO. 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 Desoxiribonucleico (DNA), Peroxidação Lipídica - afetando primariamente a estrutura e a função da membrana celular - e as proteínas.

Estresse Oxidativo é definido como uma situação onde existe uma concentração elevada de ERO devido à sua hiperprodução ou diminuição dos mecanismos de defesa denominados antioxidantes. Os estudos revelam que a causa mais comum de desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes seja um excesso das primeiras. 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. Além disso, estudo publicado por HENDIN *et al.* revelaram que os níveis seminais de ERO são mais elevados em pacientes com varicocele, independentemente da capacidade fértil, sugerindo uma forte relação entre o efeito da disfunção espermática e a varicocele. Estudos relacionando a varicocelectomia, melhora no espermograma, gravidez e níveis de ERO pré e pós-operatório

devem ser realizados. Além destas categorias de pacientes, os estudos demonstram que o estresse oxidativo talvez esteja relacionado com o mecanismo fisiopatológico pelo qual alguns pacientes com permeabilidade da anastomose após cirurgia de reversão de vasectomia permanecem inférteis.

Se o Estresse Oxidativo na linhagem germinativa masculina é o grande responsável pela infertilidade, os mecanismos responsáveis por tal patologia necessitam ser elucidados. O Estresse Oxidativo também poderia estar associado com diminuição do efeito protetor dos antioxidantes, possivelmente relacionado com deficiências na dieta, idade ou fatores genéticos. Independente do mecanismo, a hipótese das espécies reativas serem a causadora das alterações na função testicular vem sendo cogitada.

Teste da Peroxidação Lipídica (LPO)

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 Espécies Reativas de Oxigênio e a Peroxidação Lipídica (LPO) da membrana plasmática. O radical hidroxila é um iniciador típico da reação, ao passo que o ânion superóxido ou o peróxido de hidrogênio não é considerado energético suficiente para agir como iniciador direto do fenômeno de LPO, muito embora suas conversões para radicais hidroxila pelos íons ferro ou cobre possam resultar na LPO. 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. Com a LPO, existe uma perda na fluidez da membrana espermática, prejudicando o bom funcionamento de espermatozoide e a sua fusão com o oócito. Além disso, a LPO prejudica a troca iônica realizada pela membrana do espermatozoide, danificando a motilidade espermática normal.

Teste da Capacidade Antioxidante Total (CATS)

Em situações clássicas, onde a produção de ERO é extracelular, o nível de CATS talvez possa ser indicativo da extensão do Estresse Oxidativo e os antioxidantes talvez sejam efetivos no tratamento dos doentes. Em casos de homens oligozoospermicos, onde os altos níveis de ERO são gerados pelos espermatozoides, a natureza citotóxica das Espécies Reativas de Oxigênio é freqüentemente intracelular e os níveis de CATS talvez não sejam capazes de avaliar a extensão do Estresse Oxidativo.

O nível de SOD correlaciona-se positivamente com a duração da motilidade espermática. Outra enzima igualmente detectada e que combate às ações prejudiciais do excesso de ERO é a catalase, a qual está presente no espermatozoide e plasma seminal humano, assim como em outras espécies.

De maneira similar, um sistema antioxidante de enzimas neutralizantes contendo selênio - a Glutaciona Peroxidase (GPX)/Glutaciona Redutase (GRD) - existe nos espermatozoides de diferentes espécies animais, incluindo os humanos. LENZI *et al.* verificaram que houve melhora na motilidade e morfologia espermática durante tratamento envolvendo o uso de

glutaciona, sugerindo que ela possa agir indiretamente no espermatozóide por meio da melhora nas condições metabólicas dos testículos e epidídimos.

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 por ser estabelecido. Antioxidantes talvez sejam benéficos apenas nos casos de infertilidade, onde a etiologia da infertilidade seja o Estresse Oxidativo.

Uma das estratégias para reduzir o Estresse Oxidativo é usar meios de cultura para procedimentos de fertilização *in vitro* com suplementação antioxidante. A vitamina E possui a capacidade de suprimir a LPO catalisada pelo íon ferro *in vitro* e, conseqüentemente, resgatar a capacidade do espermatozóide do ejaculado para realizar a fusão com o oócito. Entretanto, o papel desempenhado pela vitamina E usada em pacientes com infertilidade permanece contraditório. O ácido ascórbico (vitamina C) reduz e, em alguns casos, até previne a oxidação de moléculas biológicas. Ainda que o ácido ascórbico sozinho não possua a capacidade de neutralizar os radicais lipofílicos presentes no compartimento lipídico do espermatozóide, ele pode atuar de maneira sinérgica com a vitamina E para reduzir as ERO. Esse fenômeno ocorre por uma reação envolvendo a vitamina C e os radicais tocoferoxil, resultando na regeneração ativa do alfatocoferol. ROLF *et al.*, estudando pacientes astenozoospermicos e com oligoastenozoospermia moderada, não observaram melhora nos parâmetros seminais ao usarem altas doses de vitaminas C e E em estudo duplo-cego placebo-controlado. Esses autores não avaliaram os níveis do Estresse Oxidativo dos doentes antes ou após o tratamento medicamentoso. DAWSON *et al.* detectaram aumento na concentração espermática de pacientes fumantes normozoospermicos com vitamina C usada por nove meses. A pentoxifilina, um conhecido estimulador da motilidade espermática, também possui propriedades antioxidantes pela redução da geração de O_2^- pelos espermatozóides.

É difícil quantificar a efetividade de um antioxidante isoladamente em relação a outro, porque existe uma correlação e cooperação entre os antioxidantes. Assim sendo, a aferição da Capacidade Antioxidante Total (CATS) é necessária.^{63,64} A quantificação total dos antioxidantes denominados de bloqueadores da reação em cadeia no plasma seminal de várias categorias de homens inférteis é importante porque seus níveis podem estar alterados.

Considerações sobre citoquinas

Citoquinas são um grupo de proteínas solúveis secretadas por diferentes tipos de células. Basicamente, elas são produzidas por células do sistema imune (linfócitos T e B, polimorfonucleares, macrófagos), e por outras células (ex: células endoteliais e epiteliais, fibroblastos e outras). De uma maneira geral, as citoquinas apresentam duas funções:

1. ajudam na diferenciação de sistemas celulares
2. aumentar a resposta imune (via recrutamento celular (quimiotaxia), proliferação, e ativação.

Devido sua ação local e solubilidade, elas podem ser encontradas nos fluidos secretados pela próstata. O plasma seminal é considerado uma fonte ideal para a aferição das citoquinas porque a próstata contribui significativamente para o volume final do ejaculado. Pesquisas recentes demonstraram que o sêmen humano contém: fator- α de necrose tumoral (TNF- α), fator de crescimento (TGF), várias interleucinas (IL's), vários receptores solúveis para interleucinas (srIL), e antagonistas dos receptores das interleucinas (Ilra).

In vitro, as citocinas diminuem a motilidade espermática, aumentam a produção de ERO nos espermatozóides e diminuem a habilidade do espermatozóide em penetrar no oócito. Estudos *in vivo* não foram capazes de demonstrar uma correlação direta entre citocinas e concentração espermática, motilidade e morfologia. Entretanto, alguns estudos demonstraram uma correlação direta entre concentrações elevadas de citocinas no plasma seminal e diminuição da fertilidade.

Testes de penetração em muco cervical (teste pós-coito e teste de penetração em muco bovino)

A importância biológica e clínica da penetração em muco cervical e sua relação com a função espermática têm sido reconhecida por mais de 100 anos, com a ampla utilização do teste pós-coito (TPC). O TPC nos fornece informações importantes a respeito da receptividade do muco cervical e da habilidade dos espermatozóides em alcançar e sobreviver no muco cervical. A capacidade dos espermatozóides de penetrar em muco cervical correlaciona-se com os aspectos convencionais de qualidade seminal, tais como concentração e morfologia espermáticas e é altamente dependente das características do movimento das células, particularmente da velocidade do trajeto médio (VTM), linearidade e amplitude do deslocamento lateral da cabeça.

O TPC é a maneira mais popular de determinar a interação muco cervical - espermatozóide. Este teste avalia a concentração espermática e motilidade em um aspirado de muco cervical no meio do ciclo. Entretanto, a necessidade de agendar o TPC em determinados períodos do ciclo pode gerar problemas para alguns casais. A melhor época para a realização do TPC é no dia anterior à primeira elevação da temperatura da mulher. Os resultados de um TPC normal deveriam mostrar a presença de 20 ou mais espermatozóides/campo. Um teste anormal resulta mais comumente de um tempo inapropriado de coito. Outras causas incluem anticorpo anti-espermatozóide, anovulação, alterações hormonais, infecções do trato genital, baixa qualidade espermática e disfunção sexual masculina. Como o TPC baseia-se muito em fatores que estão além do controle do clínico, e a interpretação do TPC sofre grandes variações dependendo de quem o faz, a utilidade do teste pós-coito na investigação de infertilidade tem sido questionada.

O TPC não pode ser considerado um teste substituto da análise seminal. Enquanto que a presença de 20 ou mais espermatozóides/campo está quase sempre associado com uma concentração espermática superior a 20 milhões/ml, o TPC nos oferece pouca informação a respeito da morfologia dos espermatozóides no ejaculado. Existe um número consideravelmente menor de espermatozóides com formas anormais no muco cervical comparado com o ejaculado. Este fato provavelmente represente o efeito de “filtro” do muco cervical ou indica que os espermatozóides com formas alteradas talvez não tenham motilidade suficiente para penetrar no muco cervical.

O TPC sempre suscitou dúvidas sobre a limitada correlação com fertilidade, inabilidade de estabelecer uma padronização sobre os valores da normalidade e controvérsias a respeito do tratamento apropriado de um resultado anormal para o TPC. Um novo argumento contra a utilização do TPC é que o uso da inseminação intrauterina com superovulação tornou a avaliação da interação espermatozóide – muco cervical meramente acadêmica. Neste sentido, independente do resultado do TPC (normal ou alterado) o tratamento segue o mesmo.

Teste de penetração em óvulos de hamster

Este teste tem como base o fato que a zona pelúcida evita a penetração de espermatozóides não espécie-específico, e que a ligação e penetração do espermatozóide no oócito é um fenômeno específico entre cada espécie. Quando oócitos de hamster desnudados da zona pelúcida são incubados com espermatozóides humanos, há uma fusão heteróloga da membrana do oócito com a membrana do espermatozóide, seguido de descondensação nuclear. *In vivo*, somente espermatozóides que sofreram reação acrossômica conseguem se fundir com a membrana do oócito. *In vitro*, a reação acrossômica pode ser artificialmente induzida quando há estímulo de mensageiros secundários. Como todos os testes de fertilidade, o teste de penetração em oócitos de hamster não pode prever a capacidade de fertilização do espermatozóide com 100% de segurança, além de não ser o objetivo do teste. Este teste avalia várias funções espermáticas, incluindo: motilidade, hiperativação, capacitação, fusogenicidade das membranas e descondensação nuclear. Este teste deve ser indicado quando não existem alterações na análise seminal de rotina e todos os outros testes prévios de função espermática forem normais, para se diagnosticar uma possível falha na fusão espermatozóide-oócito, processamento seminal limítrofe onde possa haver uma decisão para inseminação intra-uterina simples ou fertilização *in vitro* clássica e caso haja falha de fertilização em ciclo de fertilização *in vitro*.

Teste de hemizona

O teste da hemizona é espécie-específico, ou seja, espermatozóides humanos requerem oócitos humanos. Estes oócitos são incisados ao meio usando-se micromanipulação. Uma hemizona é incubada com espermatozóides do paciente em estudo enquanto que a outra é incubada com espermatozóides de uma paciente com fertilidade previamente estabelecida (controle). Devido aos métodos usados para a preservação dos oócitos, este teste não serve para avaliar a fusão nuclear. Este teste deve ser usado primariamente como uma ferramenta no laboratório de pesquisas em andrologia e não como um teste rotineiro da avaliação do homem infértil. Este teste tem sido utilizado para aconselhar os pacientes sobre as reais chances de sucesso em ciclos de fertilização *in vitro*, usando-se um valor de corte de 35%.

A limitada disponibilidade de zonas pelúcidas e os requerimentos técnicos deste teste restringem a aplicação a um pequeno número de laboratórios. No futuro, o desenvolvimento de materiais que minimizam as propriedades da zona poderia levar ao desenvolvimento de testes mais simples. Entretanto, o uso indiscriminado da ICSI, este teste se torna supérfluo.

Teste dos receptores de manose e reação acrossômica

Recentemente foi demonstrado que receptores de manose aparecem na superfície do espermatozóide humano como resultado do fenômeno da capacitação. Além disso, homens inférteis podem apresentar uma redução nos receptores de manose nas superfícies de seus espermatozóides. Entretanto, a ligação dos espermatozóides à zona pelúcida não assegura a fertilização destes oócitos. A exocitose do conteúdo do acrossoma (reação acrossômica) é absolutamente necessária para a penetração do espermatozóide na zona pelúcida e posterior geração da membrana do espermatozóide capaz de fusão com o oolema. Espermatozóides humanos incapazes de sofrerem reação acrossômica não fertilizam seus oócitos após inseminação *in vitro* ou convencional.

Teste da microinjeção de espermatozóides em oócitos de hamster

Nos últimos anos, a fertilização *in vitro* com micromanipulação tornou-se o tratamento de escolha para muitos casais com infertilidade idiopática e infertilidade masculina de causa intratável. Entretanto, um dos desafios mais importantes na tecnologia da reprodução assistida é alcançar a proficiência técnica sem passar por uma fase de baixas taxas de sucesso. O teste da ICSI serve para avaliar a habilidade do embriologista assim como para avaliar os resultados do uso do espermatozóide do paciente infértil em questão oócitos de hamster.

Dano no DNA

Embora muitos métodos sejam usados para avaliar apoptose e dano no DNA dos espermatozóides, estabelecer um valor limite entre níveis normais na população fértil e os níveis mínimos na população infértil permanece extremamente desafiador. Todos os métodos atuais carecem de limites entre o normal e o patológico - exceto para o teste da estrutura da cromatina do espermatozóide (SCSA), o qual avalia a habilidade do DNA de resistir à desnaturação pelo ácido ou calor, usando citometria de fluxo. Na prática clínica, este teste não apenas distingue homens férteis dos inférteis, mas também identifica amostras que sejam compatíveis com gravidez *in vivo* e *in vitro*. Até o presente, os testes de túnel (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick end labeling) e o Cometa são usados em pesquisa. Ambos os testes se correlacionam bem com fertilidade e fertilização *in vitro*, mas a subjetividade e variabilidade dos resultados não permitem na atualidade o seu uso para identificar amostras com diminuição da fertilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pasqualotto FF, Umezu FM, Salvador M, Pasqualotto EB. Relação entre o período de abstinência sexual e estresse oxidativo em homens inférteis. *Reproduccion Humana*, Buenos Aires, 2006.
2. Pasqualotto EB, Pasqualotto FF. Espermograma e testes de função espermática. *Femina* 2006; 34: 91-98
3. Pasqualotto FF, Pasqualotto EB, Umezu FM, Salvador M. Níveis de antioxidantes enzimáticos no plasma seminal de homens férteis e inférteis. *Reproducción Humana*, 2005; 3: 11-18.
4. Potts JM, Pasqualotto FF. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Andrologia* 2003; 3(35): 304-308.
5. 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): 316-322.
6. Pasqualotto FF, Sharma RK, 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(1): 575-583.
7. Hallak J, Sharma RK, Pasqualotto FF, Ranganathan P, Thomas AJ Jr, Agarwal A. The

- role of Creatine Kinase in oligospermic infertile men. *Urology* 2001; 58(3): 446-451.
8. 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.
 9. Potts J, 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: 1775-1778.
 10. Pasqualotto FF, Sharma RK, Potts J, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Seminal Oxidative Stress in Chronic Prostatitis Patients. *Urology* 2000; 55: 881-885.
 11. 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(2): 249-255.
 12. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ, Jr., Agarwal A: ROS-TAC is a novel marker of oxidative stress. *Hum Reprod* 1999; 14: 2801-2807.
 13. Jequier AM. Clinical andrology – still a major problem in the treatment of infertility. *Hum Reprod* 2004; 19: 1245-1249.
 14. Keel BA. How reliable are results from the semen analysis? *Fertil Steril* 2004; 82: 41-4.
 15. Grecco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2004; 20(1): 226-230.
 16. Grecco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG, Ubaldi F, Rienzi L, Tesarik J. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod* 2005; 20(9): 2590-94.

ETIOLOGIA DO FATOR MASCULINO

Lidio Jair Ribas Centa

A avaliação andrológica e a determinação do fator etiológico correto é fundamental como pré-requisito para um tratamento eficaz, visto que o mesmo não é obtido sem o pleno conhecimento da fisiopatologia da doença causadora do distúrbio da fertilidade. Uma percentagem significativa da infertilidade masculina (30-40%) são catalogadas como sem causa aparente.

As causas da infertilidade masculina são localizadas em vários níveis do organismo. Os testículos, as vias seminais e as glândulas anexas, o depósito seminal bem como estruturas central como a hipófise e órgãos receptores androgênicos podem sofrer danos e ser os responsáveis pela diminuição da fertilidade. Também outros fatores, como ocupação, fatores ambientais, modo e hábito de vida e medicações podem ser fatores determinantes.

De acordo com sua localização e achados do espermograma, as causas da infertilidade podem assim ser distribuídas:

| LOCAL DA DOENÇA | DOENÇA | CAUSA | ACHADO ESPERMOGRAMA |
|-----------------------------|--|--|-----------------------|
| Hipotalâmica Hipofisária | Hipopituitarismo | Tumores, infiltrações, trauma, irradiações, isquemia, cirurgia, mutação do receptor GnRH | Azoospermia |
| | Hiperprolactemias | Adenoma, irradiações, drogas | Oligoastenozoospermia |
| | Distúrbio secreção GnRH | Tumores, irradiações, trauma, isquemia, cirurgia, mutação do receptor GnRH | Azoospermia |
| | Hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático | Distúrbio congênito na secreção do GnRH | Azoospermia |
| | Síndrome de Kallmann | Distúrbio na secreção GnRH defeito no gen Kal-X | Azoospermia |
| | Eunuco fértil | Déficit seletivo LH | Oligozoospermia |

| LOCAL DA DOENÇA | DOENÇA | CAUSA | ACHADO ESPERMOGRAMA |
|---------------------|-------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Tireóide | Hipotireoidismo | TSH elevado | Oligoastenozoospermia |
| Testicular | Anorquia congênita | Falta do testículo fetal | Azoospermia |
| | Anorquia adquirida | Trauma, torsão, tumor, infecção, cirurgia | Azoospermia |
| | Varicocele | Insuficiência venosa | Oligoastenozoospermia |
| | Orquites | Infecção e destruição do epitélio germinativo | Oligoastenozoospermia Azoospermia |
| | S. da célula de Sertoli isolada | Congênita, adquirida | Azoospermia |
| | Síndrome de Klinefelter | Não disjunção meiótica | Azoospermia |
| | 46XX masculino | Translocação cromossoma Y | Azoospermia |
| | 47 XYY | Não disjunção meiótica | Azoospermia |
| | Síndrome de Noonan | Congênita | Azoospermia |
| | Anomalias cromossômicas estruturais | Deleições, translocações | Oligozoospermia |
| | Disgenesia gonadal | Distúrbio genético da diferenciação gonadal | Azoospermia |
| | Síndrome dos cílios imóveis | Ausência do braço de dineína | Astenozoospermia |
| | Globozoospermia | Ausência da formação do acrossoma | Teratozoospermia |
| Parada da maturação | Congênita/adquirida | Azoospermia | |

| LOCAL DA DOENÇA | DOENÇA | CAUSA | ACHADO ESPERMOGRAMA |
|-----------------------------------|---|---|---------------------------------------|
| Tireóide | Hipotireoidismo | TSH elevada | Oligoastenozoospermia |
| Testicular | Pseudohermafroditismo masculino | Defeito enzimático na síntese de testosterona | Azoospermia |
| | Hermafroditismo Verdadeiro | Distúrbio genético na diferenciação gonadal | Azoospermia |
| | Doenças causadas por fatores exógenos ou doença sistêmica | Medicação, irradiação, calor, ambiental, cirrose hepática, insuficiência renal, toxinas | Oligoastenozoospermia/ Azoospermia |
| | Tumores testiculares | Congênitos/adquiridos | Oligozoospermia Azoospermia |
| | Infertilidade idiopática | ? | Oligoastenozoospermia |
| Vias seminais e ductos deferentes | Infecções | Bactérias, virose, clamidia | Oligoastenozoospermia |
| | Obstruções | Anomalias congênitas, infecções, vasectomia, herniorrafias, transplante renal | Azoospermia |
| | Fibrose cística | Mutação do gen CFTR | Azoospermia |
| | Ausência congênita dos deferentes | Mutação do gen CFTR | Azoospermia |
| | Síndrome de Young | Intoxicação por mercúrio | Oligozoospermia |
| | Distúrbio da liquefação | ? | Astenozoospermia |
| | Infertilidade imunológica | Autoimune | Oligoastenozoospermia |
| Distúrbio no depósito do sêmen | Hipospadia | Congênito | Normozoospermia |
| | Deformação peniana | Congênita/adquirida | Normozoospermia |

| LOCAL DA DOENÇA | DOENÇA | CAUSA | ACHADO ESPERMOGRAMA |
|--------------------------------|-------------------------|---|-----------------------------|
| Distúrbio no depósito do sêmen | Disfunção erétil | Origem multifatorial | Normozoospermia |
| | Disfunção ejaculatória | Congênita/adquirida | Normozoospermia/Azoospermia |
| Órgãos receptores androgênicos | Testículo feminizante | Completa ausência de receptor androgênico | Azoospermia |
| | Síndrome de Reifenstein | Incompleta | Azoospermia |

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Cedenho AP, Bortoluzzo C, Vieira M. O que é importante na propedêutica do homem infértil. In: Infertilidade Masculina - I Consenso Brasileiro. São Paulo: BG Cultural, 1999.
- 2 Centa, LJR. Fator Masculino. Tratado de Ginecologia da FEBRASGO. Vol. 1. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
- 3 Comhaire FH. Male Infertility, Clinical Investigation, Cause Evaluation and Treatment. Chapman & Hall Medical; London, p. 133-142, 1996
- 4 Nieslag E, Behre HM.. Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction. 2ª Edição. New York: Springer, 2000

VARICOCELE

Jorge Hallak

Considerações sobre varicocele

Definição

É a dilatação anormal das veias do plexo pampiniforme testicular. Existe uma associação direta entre varicocele e infertilidade masculina, muito embora 2/3 dos portadores de varicocele sejam férteis. A varicocele é a causa tratável mais comum de infertilidade masculina.

Incidência

A incidência de varicocele na população masculina é de aproximadamente 25% nos homens que apresentam qualquer alteração seminal e 11% nos homens com análise seminal normal. Na população de homens com infertilidade primária é de 35% – 40%, enquanto nos homens com infertilidade secundária este número sobe para 70% – 80%, evidenciando o caráter progressivo da lesão. Em adolescentes, este valor é semelhante ao dos adultos, sendo o pico de seu aparecimento entre os 14 e 15 anos de idade.

O conhecimento clássico sobre varicocele afirma que sua incidência no lado esquerdo ocorre em 80 a 95%, bilateralmente entre 25% a 45%, e raramente apenas no lado direito. Porém, estes dados devem ser reavaliados e até mesmo questionados quando se trata da população com infertilidade. Existem diferenças nos métodos de avaliação utilizados por diferentes examinadores (ex.: exame físico, método de classificação da varicocele), bem como diferenças nas condições utilizadas nestes estudos, como temperatura ambiente e população estudada. Utilizando-se métodos radiológicos de maior sensibilidade, alguns estudos consideram a varicocele como uma doença bilateral sugerindo que o exame físico é pouco sensível e sujeito a variações de acordo com os examinadores. Evidenciam também, que a presença de refluxo contralateral, pode ser identificada em aproximadamente 80% dos casos.

Fisiopatologia

A fisiopatologia da infertilidade causada pela varicocele é objeto de estudo até hoje, mas existem dados muito concretos, particularmente nos últimos anos devido às recentes conquistas no estudo da bioquímica, biofísica do espermatozóide e estudos sobre radicais livres de oxigênio, interação espermatozóide-ocito e fragmentação de DNA.

As hipóteses mais comuns e mais facilmente aceitas são as seguintes:

- Elevação da temperatura escrotal e testicular que alteraria a função das células germinativas;

- Hipóxia testicular resultante de alterações circulatórias locais, com subsequente diminuição da concentração de oxigênio, aumento do gás carbônico e dano ao tecido testicular;
- Refluxo de metabólitos renais e adrenais (esteróides e catecolaminas) por meio da veia gonadal, com efeitos deletérios sobre os testículos;
- Outras teorias com ênfase imunológica, hormonal e mesmo de aumento de fatores oxidantes relacionados à varicocele também têm sido cada vez mais relatados.

Etiologia

A preponderância de varicoceles no lado esquerdo está ligada à anatomia do veia gonadal esquerda e constitui base para várias teorias que tentam explicar sua etiologia. Dentre estas, destacam-se:

- A veia gonadal esquerda é mais longa que a direita e entre em ângulo reto na veia renal deste lado. Assim, forma-se uma longa coluna hidrostática, com alta pressão, que dilata o plexo pampiniforme;
- A insuficiência valvular na veia gonadal esquerda pode resultar em aumento da pressão transmitida pela veia renal para o plexo pampiniforme;
- A renal esquerda pode ser comprimida entre a aorta e a artéria mesentérica superior, transmitindo um aumento pressórico para a veia gonadal, o que contribui para sua dilatação. Esse fenômeno é conhecido como “nutcracker” (quebra-nozes).

Diagnóstico

A maioria dos casos de varicocele é assintomática. Alguns pacientes ocasionalmente queixam-se de sensação de peso, dor intermitente ou aumento do volume escrotal. Devido aos poucos sintomas, o diagnóstico baseia-se no exame físico minucioso, que deve ser realizado com o paciente em pé, em ambiente tranquilo, em temperatura não-refrigerada, o que favorece o relaxamento da musculatura escrotal. A manobra de Valsalva, em geral, facilita a visibilidade e palpação das veias dilatadas. Examina-se, posteriormente, o paciente deitado, no intuito de avaliar outras alterações intra-escrotais e o volume dos testículos, observando a eventual assimetria entre os dois lados. Assimetria ou hipotrofia testicular são sugestivas de dano testicular e podem orientar o tratamento cirúrgico, principalmente em adolescentes.

De acordo com o grau de desenvolvimento, as varicoceles são classificadas em:

- **Grau I** (pequenas): aquelas que são palpáveis apenas com a manobra de Valsalva.
- **Grau II** (moderadas): palpáveis facilmente sem esta manobra.
- **Grau III** (grandes): detectadas visualmente e palpadas com facilidade.

Análise seminal

Anormalidades na concentração e qualidade espermática são freqüentes em pacientes inférteis com varicocele, porém não são patognômicas dela, como se imaginava no passado

(padrão de estresse seminal, descrito por MacLeod). Representam apenas anormalidade da função testicular.

Em suma, a análise seminal não deve ser considerada método diagnóstico da varicocele, porém é muito útil para indicação terapêutica e posterior acompanhamento.

Testes que colaboram no diagnóstico

Vários exames complementares têm sido indicados para confirmação diagnóstica de varicocele ou mesmo para detecção daquelas não encontradas no exame físico. Destacam-se:

- *Doppler estetoscópio* : o “probe” é colocado no cordão espermático, com o paciente em pé. Um ruído característico (refluxo venoso) é auscultado quando solicitada a manobra de Valsalva, nos casos de varicoceles. Apresenta índices significativos de resultados falso-positivos,
- *Termografia escrotal* : assim como o Doppler, é um método barato e não-invasivo, mas tem uma especificidade diagnóstica muito baixa, apresentando também alto índice de resultados falso-positivos. É muito dependente do examinador.
- *Cintilografia escrotal*: trata-se de exame caro, de baixa especificidade e pouco utilizado na prática clínica.
- *Venografia gonadal* : empregada no passado, não deve fazer parte da rotina.
- *Eco-doppler colorido* : é um método muitas vezes empregado para confirmação diagnóstica de varicocele. É muito útil no diagnóstico de varicocele subclínica contralateral a varicocele diagnosticada no exame clínico, pois acumulam-se evidências que nestes casos a presença de varicocele subclínica terá importância no planejamento cirúrgico. Vale a pena ressaltar que este exame deve ser feito sempre na posição ortostática e em mãos habilitadas o Doppler estetoscópio pode mostrar os mesmos resultados. (quadro 1):

| Quadro 1 – VARICOCELE – DIAGNÓSTICO | |
|-------------------------------------|--|
| Obrigatório | Anamnese Exame físico Análise seminal (x2) |
| Opcional | Doppler estetoscópio Ultra-sonografia |

Infertilidade e Varicocele

Embora a maioria dos estudos demonstre melhora nos parâmetros seminais e na taxa de gravidez após correção da varicocele, quase todos são baseados em dados retrospectivos, não controlados, utilização de várias técnicas e seguimento irregular. Além disso, os dois melhores desenhos epidemiológicos na avaliação da eficácia de um método terapêutico são estudos controlados randomizados duplo cego ou estudos controlados randomizados prospectivos. Claramente, o primeiro é impossível, pois o paciente estaria ciente da realização de sua cirurgia, e o segundo desenho é eticamente questionável devido a expectativa do casal e a presença de inúmeras publicações sobre os benefícios da varicocelectomia. Sendo assim, apenas dois estudos controlados randomizados prospectivos foram realizados até o momento. Nieschlag *et al* avaliou 125 casais mostrando melhora significativa dos parâmetros seminais no grupo onde a varicocele foi corrigida em comparação com o grupo controle (não operados), no entanto, não houve diferença na taxa de gravidez. Quase metade dos pacientes utilizados neste estudo apresentavam varicocele Grau I, aproximadamente 25% foi submetido a embolização venosa e no restante dos pacientes a técnica cirúrgica escolhida foi a ligadura retroperitoneal alta. O segundo estudo conduzido por Madgar *et al* utiliza o melhor desenho epidemiológico. No primeiro ano, o grupo submetido a varicocelectomia atingiu 60% de gravidez comparado a apenas 10% dos casais acompanhados sem a correção. O grupo controle também foi submetido a cirurgia e durante o segundo ano a gravidez foi obtida em 44% dos casais restantes.

Trabalhos recentes indicam aumento da fragmentação de DNA nos espermatozóides e presença de radicais livres nos espermatozóides e no sêmen como fatores fortemente negativos de qualidade seminal e função espermática, não somente afetando o potencial de fertilização natural, mas também a capacidade de fertilização utilizando-se métodos de reprodução assistida, como a fertilização *in vitro* clássica (FIV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI). Esses fatores parecem representar formas de diagnóstico e prognóstico mais precisas que os parâmetros tradicionais mensurados na análise seminal (concentração, motilidade e morfologia). Pacientes com varicocele e inférteis apresentam altas taxas de fragmentação de DNA nos espermatozóides causadas também pelo aumento de radicais livres quando comparados a pacientes com varicocele, porém, férteis e a grupos controle.

A correção da varicocele pode não melhorar os parâmetros seminais em todos os pacientes, apesar que acima de 70% dos pacientes apresentam melhora significativa dos parâmetros tradicionais do ejaculado, mas definitivamente e de forma inquestionável, facilita a gravidez natural com nascimentos vivos. Mesmo que não haja gravidez espontânea, uma outra parte significativa dos pacientes que somente teriam condições de se reproduzir com técnicas avançadas de reprodução assistida (ICSI) agora poderão obter gestação com técnicas mais simples e de baixa complexidade como a inseminação intra-uterina simples

A correção microcirúrgica da varicocele, quando bem indicada, além de ser excelente opção para devolver a fertilidade natural ao casal ainda apresenta melhor relação custo-benefício em relação a qualquer método de reprodução assistida. Não se pode deixar de citar que o restabelecimento e preservação da função testicular, deve ser considerado um fator importante na decisão de indicar cirurgia, independentemente do fator “gravidez”.

Oligozoospermia grave e azoospermia

A varicocele é associada a azoospermia em aproximadamente 10% a 12% dos casos. Com os avanços na tecnologia da reprodução assistida, casais considerados previamente incapazes de gerar seus próprios filhos podem obter uma gravidez por meio da ICSI. Tecnicamente cada oócito é injetado com um único espermatozóide viável, sendo assim, a filosofia do tratamento cirúrgico da varicocele nesses casos é proporcionar a obtenção de espermatozoides móveis no ejaculado, evitando-se a exploração do parênquima testicular. A indução da espermatogênese com ejaculação de espermatozoides móveis pode ocorrer em 21% a 55% dos casos. A gravidez espontânea é relatada nesses casais. A dosagem do FSH pré-operatória, o grau da varicocele e a presença de atrofia testicular não são considerados fatores preditivos negativos na indicação do tratamento. No entanto, a histologia do testículo é considerada fator preditivo positivo no resultado da cirurgia, evidenciando melhora nos casos de hipoespermatogênese e parada de maturação a nível de espermátides e resultados muito inferiores nos casos de Síndrome de Sertoli e parada de maturação a nível de espermátócitos primários.

Nos homens com oligozoospermia grave (concentração espermática $< 1 \times 10^6$ M/mL) uma melhora nos parâmetros seminais após a correção da varicocele pode ter impacto significativo nas opções reprodutivas. Matthews et al relataram 31% de nascimentos vivos em pacientes com oligozoospermia grave ou com imotilidade total submetidos a correção de varicocele clínica, sendo 19% desses atingidos sem ajuda de reprodução assistida. A pesquisa de microdeleção do cromossomo Y deve ser realizada nos pacientes com concentração espermática inferior a 5 milhões de espermatozoides /ml, portanto antes de se prosseguir com a correção da varicocele em pacientes oligospérmicos e azoospérmicos, faz-se obrigatória a pesquisa de microdeleções do Y. O valor da varicocelectomia em pacientes com alterações genéticas comprovadas, apesar de pouco estudada, até o presente momento apresenta resultados não comprovados e ainda permanece sob investigação. Da mesma forma, é obrigatória a solicitação de cariótipo a todos os indivíduos com oligozoospermia moderada e grave, e os resultados devem ser analisados de acordo com os achados, sendo mais comum a Síndrome de Klinefelter pura (47, XXY) e com mosaïcismo (46,XY/ 47, XXY).

Varicocele subclínica

A dúvida sobre a influência do grau da varicocele no resultado do tratamento existe desde que estudos na década de 70 e 80 sugeriram não haver relação entre grau da varicocele e impacto na taxa gravidez. Estas afirmativas indicavam o tratamento de varicocele não palpável, apenas diagnosticada por exames de imagem (subclínica). Sendo assim, um número grande de pacientes seriam submetidos a cirurgia desnecessariamente, pois a incidência de varicocele subclínica é aproximadamente 50% tanto nos homens inférteis como na população geral. Trabalhos mais recentes demonstraram haver uma melhora discreta nos parâmetros seminais sem alteração significativa nas taxas de gravidez. Jarow et al mostrou melhora de mais de 50% na qualidade do ejaculado de pacientes com varicocele subclínica corrigida quando o diâmetro da veia era superior a 3 mm. Assim sendo, o diâmetro da veia mensurada no ultra-som doppler com o paciente em posição ortostática pode ser um fator a ser considerado na indicação da cirurgia neste subgrupo de pacientes. A dificuldade da indicação cirúrgica nesses pacientes baseando-se em um parâmetro objetivo ocorre pelo exame físico e métodos diagnósticos apresentarem falhas importantes quando comparados diferentes examinadores, particularmente

na classificação da varicocele.

No entanto, o único estudo prospectivo randomizado desaconselhando a correção cirúrgica de varicocele subclínica, tem falhas no seu desenho. Este é um grupo de pacientes, que seguramente irá sofrer modificações de conduta, na medida em que pudermos avaliar mais enfaticamente e eficientemente os danos estruturais do DNA do espermatozóide e sua correlação com disfunção espermática e no processo de fertilização, e na medida em que as técnicas de microcirurgia evoluírem e forem mais acessíveis de forma padronizada a um número maior de urologistas.

Atualmente, não indicamos a correção cirúrgica da varicocele subclínica, mas quando existe varicocele clínica em um dos lados e subclínica no outro realizamos a cirurgia bilateral.

Tratamento Cirúrgico

Como enfatizado anteriormente, a correção cirúrgica da varicocele, permanece sendo a pedra fundamental do tratamento desta patologia. O objetivo da intervenção é a secção das veias que compõe o sistema de drenagem espermático interno, com preservação das artérias, do ducto deferente com sua irrigação arterial e drenagem venosa e vasos linfáticos do cordão espermático.

Correção subinguinal microcirúrgica da varicocele, com preservação arterial e linfática

É sem dúvida a técnica de eleição para correção da varicocele por todos os urologistas especializados em infertilidade masculina do mundo atualmente.

Uma incisão de 2 a 3 cm é realizada 1 cm abaixo do anel inguinal externo, estendendo-se lateralmente. A incisão deve ser aprofundada na fáscia de Camper e o tecido celular subcutâneo (TCSC). O cordão espermático é elevado acima da incisão da pele de maneira gentil e com movimentos que visam soltar qualquer tecido frouxo que o sustente.

A utilização do microscópio cirúrgico faz-se necessária deste ponto em diante, bem como a utilização de instrumentos de microcirurgia urológica. O importante é que o cirurgião tenha familiaridade e experiência em microcirurgia, que no caso da varicocele não envolve anastomoses e, portanto, a curva de aprendizado é menor. Qualquer veia cremastérica dilatada deve ser isolada e ligada. A próxima etapa deve ser a localização e identificação precisa da(s) artéria(s) testicular(es) com aumento da magnificação do microscópio para X 8 a X 15.

Qualquer vaso linfático deve ser preservado e isolado cuidadosamente. O batimento arterial é geralmente, mas não sempre, visualizado ao microscópio. Neste nível do cordão espermático, as veias são mais numerosas e podem estar em grupos com uma artéria aderida a elas ou envolta por numerosas veias do plexo. A ligadura venosa é preferencialmente feita com fios inabsorvíveis de nylon 7-0 ou nylon-6-0, para veias muito calibrosas a utilização de fio de algodão 4-0 é aceitável. Todas as veias devem ser ligadas, mas é aceitável a ligadura das veias com diâmetro de 1mm ou mais. A pele pode ser aproximada com sutura intradérmica ou com pontos separados.

O curativo é feito da maneira usual e como recomendação geral o paciente é instruído a colocar gelo no escroto por 20 minutos/ hora nas primeiras 24 horas, usar suspensor escrotal

durante o dia por 7 dias e usar anti-inflamatórios não hormonais por 3 dias, além de antibioticoterapia terapêutica com cefalosporinas de primeira geração por 3 a 5 dias.

Outras técnicas cirúrgicas para correção de varicocele

Para atingir os objetivos, ao longo da história da urologia, diversas técnicas foram empregadas, destacando-se:

Acesso inguinal (Ivanissevich modificado): Como descrito por Ivanissevich, este acesso tem potencialmente mais vantagens em relação ao acesso retroperitoneal alto. No canal inguinal, as veias que drenam o plexo pampiniforme irão se juntar e potencialmente formar veias mais calibrosas e mais fáceis de serem identificadas. O acesso tradicional envolve uma incisão de 5 a 10cm acima do canal inguinal, abertura da aponeurose do músculo oblíquo externo até obter acesso ao cordão espermático. O cordão é dissecado e as veias visualizadas são ligadas. O cirurgião deve tentar identificar a artéria testicular, o que nem sempre é possível. Existem relatos de até 14% de ligadura da artéria testicular principal, e os vasos linfáticos são raramente visualizados neste nível, e mesmo que o sejam são frequentemente ligados inadvertidamente por falta de condições técnicas devida à falta de magnificação. A recidiva ou persistência da varicocele nesta técnica é de 35% por prováveis ramos colaterais que fazem uma ponte acima da porção inguinal do cordão espermático e o próprio cordão espermático, porém abaixo do local onde foram feitas as ligaduras.

Acesso Retroperitoneal (Palomo modificado): o acesso retroperitoneal expõe a veia espermática interna no retroperitônio imediatamente depois que ela sai no canal inguinal. A vantagem teórica desta técnica, é que a ligadura retroperitoneal da veia espermática interna, reduz o número de veias que contribuem para a varicocele e, portanto minimizam o potencial de recorrência da mesma. Alguns autores também advogam que existem ramos venosos comunicantes entre a varicocele esquerda e direita acima do anel inguinal interno, e que pode ser ligado nesta técnica. No entanto, o alto índice de recorrência é devido justamente à ligadura alta, acima das conexões venosas de veias do retroperitônio.

Acesso laparoscópico: é inquestionável o avanço da laparoscopia urológica, com muitas técnicas inovadoras e expansão de fronteiras antes intransponíveis em cirurgia renal, prostática e até mesmo permitindo reconstruções sofisticadas do trato genito-urinário. A experiência do urologista com testículo não-palpável e linfadenectomias do retroperitônio, foi o passo inicial na utilização desta técnica para a ligadura alta da veia espermática interna. Quando não existia a técnica sub-inguinal microcirúrgica, os adeptos da laparoscopia tinham como argumento positivo a rápida recuperação do paciente em comparação à técnica inguinal clássica, que secciona aponeuroses e músculos e tem um componente de dor pós-operatória e tempo de recuperação maior. No entanto, a laparoscopia transforma uma cirurgia extraperitoneal num procedimento intraperitoneal, com riscos de lesão intestinal ou vascular, complicações da hiperinsuflação abdominal, lesões devido à inserção de agulhas ou trocarteres. Estudos comparativos entre laparoscopia e microcirurgia para correção da varicocele, dão vantagens para a microcirurgia quando analisados: tempo de retorno ao trabalho, dor pós-operatória, inexistência de complicações na microcirurgia e custos com materiais.

A via laparoscópica tem poucas indicações atualmente como técnica preferencial e pode eventualmente ser indicada quando o paciente tem concomitantemente hérnia inguinal bilateral.

Acesso escrotal: devido à complexidade e ramificação das estruturas do plexo pampiniforme neste nível anatômico, esta via não deve ser utilizada. Apresenta tempo cirúrgico extremamente elevado e com grandes chances de fracasso. Adicionalmente tem riscos de lesão vascular testicular e isquemia ou de vascularização sem possibilidade de controle. Citado aqui por motivos históricos somente.

Tratamento não-cirúrgico da varicocele – embolização percutânea:

Em 1978, foi descrita a técnica de escleroterapia venosa para ablação da varicocele. Diversas técnicas foram desenvolvidas, incluindo balões, molas de Gianturco, escleroterapia, ou uma combinação destas técnicas. No entanto, todas estas variações técnicas tem suas vantagens e desvantagens, como por exemplo, podem ser realizadas como hospital dia com sedação endovenosa e oferecem a possibilidade de tratamento não-cirúrgico para uma patologia que é historicamente tratada unicamente por cirurgia. Apesar da embolização e suas variações serem consideradas não-cirúrgicas, é frequentemente difícil e muitas vezes muito difícil, além de demorar mais tempo que técnicas convencionais, têm um índice de complicações significativamente maior que a técnica subinguinal microcirúrgica e os pacientes recebem radiação. A taxa de insucesso na aplicação da técnica de embolização chega a 27% por dificuldades anatômicas e técnicas. A taxa de recidiva da varicocele por embolização, é maior que a técnica microcirúrgica. Atualmente esta técnica fica reservada para os casos de recidiva ou persistência da varicocele, após tratamento microcirúrgico feito por microcirurgião urológico experiente.

Resultados

Aproximadamente 70% a 85% dos pacientes apresentam melhoria dos parâmetros seminais, que ocorrem em geral entre 3 e 12 meses após o procedimento cirúrgico.

As taxas de gravidez oscilam entre 35% a 45% no primeiro ano pós-operatório e até 65% no segundo ano pós-operatório. Estudos comparativos entre pacientes tratados cirurgicamente e apenas acompanhados mostram nítida vantagem do primeiro grupo (33%) *contra* o regime de observação (16%), porém estes estudos são antigos e anteriores à introdução de melhorias técnicas como a microcirurgia.

O grau de varicocele interfere na melhora dos parâmetros seminais. O fator determinante parece ser a presença de varicocele.

Em adolescentes, a interrupção do desenvolvimento testicular pode ser reversível após a correção cirúrgica fato que não ocorre no adulto. A relação entre hipotrofia gonadal e fertilidade está bem estabelecida.

Seguimento

Deve ser realizado com espermograma e exame clínico a partir do terceiro mês até um ano após a cirurgia e nos casos de adolescentes deve-se acompanhar o volume testicular até o início da fase adulta.

Complicações

A recorrência ou persistência de varicoceles após o tratamento cirúrgico são as complicações mais comuns do procedimento. Os índices oscilam entre 3% e 35% dos casos. Outros efeitos menos frequentes são a formação de hidrocele (3% a 8%), lesão do nervo ileoinguinal (1%), lesão arterial com atrofia testicular e raramente infecção cirúrgica.

A magnificação óptica diminui os índices de complicações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. World Health Organization. *Fertil Steril*, **57**: 1289, 1992
2. Witt, M. A., Lipshultz, L. I.: Varicocele: a progressive or static lesion? *Urology*, **42**: 541, 1993
3. Dubin, L., Amelar, R. D.: Varicocelectomy: 986 cases in a twelve-year study. *Urology*, **10**: 446, 1977
4. Marks, J. L., McMahon, R., Lipshultz, L. I.: Predictive parameters of successful varicocele repair. *J Urol*, **136**: 609, 1986
5. Rageth, J. C., Unger, C., DaRugna, D. et al.: Long-term results of varicocelectomy. *Urol Int*, **48**: 327, 1992
6. Nieschlag, E., Hertle, L., Fishedick, A. et al.: Update on treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. *Hum Reprod*, **13**: 2147, 1998
7. Marmar, J. L., Kim, Y.: Subinguinal microsurgical varicocelectomy: a technical critique and statistical analysis of semen and pregnancy data. *J Urol*, **152**: 1127, 1994
8. Daitch, J. A., Bedaiwy, M. A., Pasqualotto, E. B. et al.: Varicocelectomy improves intrauterine insemination success rates in men with varicocele. *J Urol*, **165**: 1510, 2001
9. Schlegel, P. N.: Is assisted reproduction the optimal treatment for varicocele-associated male infertility? A cost-effectiveness analysis. *Urology*, **49**: 83, 1997
10. Kadioglu, A., Tefekli, A., Cayan, S. et al.: Microsurgical inguinal varicocele repair in azoospermic men. *Urology*, **57**: 328, 2001
11. Kim, E. D., Leibman, B. B., Grinblat, D. M. et al.: Varicocele repair improves semen parameters in azoospermic men with spermatogenic failure. *J Urol*, **162**: 737, 1999

12. Cayan, S., Lee, D., Black, L. D. et al.: Response to varicocelectomy in oligospermic men with and without defined genetic infertility. *Urology*, **57**: 530, 2001
13. Kursh, E. D.: What is the incidence of varicocele in a fertile population? *Fertil Steril*, **48**: 510, 1987
14. Yarborough, M. A., Burns, J. R., Keller, F. S.: Incidence and clinical significance of subclinical scrotal varicoceles. *J Urol*, **141**: 1372, 1989
15. Cozzolino, D. J., Lipshultz, L. I.: Varicocele as a progressive lesion: positive effect of varicocele repair. *Hum Reprod Update*, **7**: 55, 2001
16. Steeno, O., Knops, J., Declerck, L. et al.: Prevention of fertility disorders by detection and treatment of varicocele at school and college age. *Andrologia*, **8**: 47, 1976
17. Mori, M. M., Cedenho, A. P., Koifman, S. et al.: Sperm characteristics in a sample of healthy adolescents in Sao Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica*, **18**: 525, 2002
18. Takahara, M., Ichikawa, T., Shiseki, Y. et al.: Relationship between grade of varicocele and the response to varicocelectomy. *Int J Urol*, **3**: 282, 1996
19. Matkov, T. G., Zenni, M., Sandlow, J. et al.: Preoperative semen analysis as a predictor of seminal improvement following varicocelectomy. *Fertil Steril*, **75**: 63, 2001
20. Goldstein, M, Gilbert, B.R., Dicker, A.P. et al.: Microsurgical inguinal varicocelectomy with delivery of the testis: An artery and lymphatic sparing technique. *J. Urol.*, **148**: 1808, 1992.
21. Pryor, J.L., Howards, S.S.: Varicocele. *Urol. Clin. North Am.*, **14**: 499, 1987.

AZOOSPERMIAS NÃO-OBSTRUTIVAS

Diagnóstico e conduta

Jorge Hallak

O primeiro passo na avaliação de um paciente com suspeita de ser azoospermico, é certificar-se que realmente ele é azoospermico. Após a análise seminal inicial que evidenciou a ausência de espermatozoides, deve-se realizar uma segunda análise seminal de rotina acrescida de uma análise após centrifugação do “pellet”, onde a amostra é centrifugada por aproximadamente 10 minutos a 1.600 rpm. Espera-se até 28% de serem encontrados espermatozoides onde houve resultado negativo para a análise seminal convencional. Para realmente ter-se certeza deste resultado, pode-se proceder a uma pesquisa especial para comprovação de azoospermia pela técnica de citocentrifugação (cytospin) onde outros 20% de espermatozoides são encontrados onde houve resultado negativo para a centrifugação. Não é incomum achar espermatozoides em pacientes previamente rotulados como azoospermicos. Em todos os casos de azoospermia com baixo volume do ejaculado (<1,0ml), deve-se realizar uma centrifugação do sedimento urinário após masturbação para se descartar ejaculação retrógrada.

O volume do ejaculado e o pH são parâmetros extremamente importantes quando se avalia um paciente com azoospermia. Se o volume do ejaculado é menor que 1,0 ml e o pH for menor que 7,0, as possibilidades certamente incluem obstrução de ductos ejaculadores e ausência congênita de vasos deferentes. Se o volume do ejaculado for de 2,0 ml ou maior e o pH de 8,0, este paciente certamente não terá os diagnósticos anteriores, mas terá provavelmente o diagnóstico de obstrução de epidídimo/vasos deferentes ou azoospermia não-obstrutiva.

O diagnóstico de azoospermia não-obstrutiva é facilmente realizado no caso de um paciente com testículos pequenos, de consistência amolecida, a palpação dos epidídimos não revela sinais de obstrução (epidídimos cheios), os vasos deferentes são palpáveis bilateralmente e a dosagem sérica de hormônio folículo-estimulante (FSH) revela-se abaixo dos níveis superiores da normalidade. O nível superior de normalidade do FSH acima do qual faz-se um suposto diagnóstico de azoospermia não-obstrutiva, realmente é um conceito irrelevante, pois não existe um nível de corte acima do qual a espermatogênese não ocorra ou que reflita as condições testiculares de produção de espermatozoides. Portanto, o patamar de FSH >2 vezes o normal como “valor de corte” para espermatogênese presente ou ausente, deve ser abandonado. Evidentemente que FSH elevado significa alteração do epitélio germinativo com alteração/destruição das células de Sertoli e níveis muito altos é indicativos de um prognóstico mais reservado, porém níveis normais de FSH são compatíveis com síndrome de Sertoli.

Se o paciente é portador de azoospermia não-obstrutiva, é obrigatória a pesquisa cromossômica (cariótipo com bandas) haja vista o fato que uma das causas mais importantes de infertilidade masculina é devida a anormalidades cromossômicas com cariótipo XXY. Estudos indicam níveis de alterações cromossômicas em homens inférteis numa porcentagem de 2,2 a 14,3% com incidências ainda maiores em azoospermicos.

Com a introdução da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (do inglês: “intracytoplasmic sperm injection” – ICSI) em 1992-1993 para casos graves de infertilidade masculina, as possibilidades de um casal previamente considerado estéril de gerar seu próprio descendente genético são muito grandes, porém esta tecnologia não é isenta de riscos, pois dentre outras complicações sabe-se que as alterações genéticas do pai serão inteiramente transmitidas ao filho, portanto é imperioso que se faça pesquisa de DNA

através da microdeleção de cromossomo Y que estará presente numa porcentagem de até 16% dos azoospermicos não-obstrutivos. Presença de microdeleções de cromossomo Y e alterações de cariótipo devem obrigatoriamente ser informadas pelo urologista aos casais antes da decisão de seguir adiante na obtenção de espermatozoides para uso em reprodução assistida.

Desde o início da década de 1940 a importância da biópsia de testículo têm sido reconhecidas como um procedimento útil na avaliação do homem infértil. Recentemente as indicações da biópsia de testículo aumentaram significativamente em decorrência da introdução da técnica de ICSI para os casos de oligozoospermia grave e azoospermia obstrutiva, depois de esgotadas as opções com melhores resultados e melhor custo-benefício (correção de varicocele, reversão de vasectomia, etc.). Mesmo nos casos de azoospermia não-obstrutiva, em uma porcentagem grande dos casos, é possível que se obtenham espermatozoides do parênquima testicular em quantidade suficiente para a técnica de ICSI. Como resultado destes novos avanços em medicina reprodutiva, as indicações para se realizar biópsia de testículo passaram a ser terapêuticas e não só diagnósticas.

A biópsia de testículo tem sua indicação clássica em homens azoospermicos para fazer a distinção entre falência testicular (azoospermia não-obstrutiva) e processos obstrutivos. Portanto, a biópsia diagnóstica tem significado quando há dúvidas quanto à etiologia da azoospermia, apesar de que hoje não está mais advogada somente biópsia diagnóstica, pois pode-se retirar o único foco de espermatogênese do paciente e no momento de se obterem espermatozoides para reprodução assistida, eles não serem encontrados. É geralmente aceito que distúrbios no processo da espermatogênese levam a um aumento nos níveis de FSH, porém o testículo pode possuir “focos” ou áreas de espermatogênese preservada, mesmo com FSH elevadíssimo. O único fator positivo preditivo de se achar espermatozoides para uso em reprodução assistida não é o volume testicular, nem o nível de FSH, mas sim o tipo histológico encontrado na biópsia, porém o fato de se acharem espermatozoides numa primeira biópsia de testículo não quer dizer obrigatoriamente que o urologista terá sucesso numa segunda tentativa. De fato, demonstrou-se que um período de até seis meses após a primeira tentativa é necessário para que se maximizem as chances de sucesso na obtenção de espermatozoides em tentativas subsequentes.

As indicações para se realizar biópsia de testículo podem ser classificadas em:

Diagnósticas:

- Distinguir entre obstrução e falência testicular
- Distinguir entre os diferentes padrões histológicos testiculares
- Pesquisa de neoplasia contralateral de testículo

OBSERVAÇÃO IMPORTANTE: atualmente não se deve realizar biópsia de testículo em todos os pacientes com finalidade exclusivamente terapêutica, haja vista, que pode-se retirar foco importante de espermatogênese.

Terapêuticas:

- Procura de espermatozoides para ICSI

- Criopreservação de espermatozóides testiculares para uso futuro

Os achados histopatológicos mais freqüentes da biópsia testicular podem ser subdivididos em:

- Espermatogênese normal:** onde a maioria dos túbulos seminíferos apresenta toda a evolução do processo de espermatogênese com espermatozóides mais maduros próximos do lúmen tubular. Devem estar presentes todas as formas precursoras do espermatozóide como; espermatogônias (2n), espermátocitos (primários - 4n e secundários - 2n), espermátides (1n) e espermatozóides (1n).
- hipoespermatogênese:** redução quantitativa da linhagem germinativa no túbulo, que resulta em oligo ou azoospermia. Todos os estágios da espermatogênese devem estar presentes, porém em menor quantidade. A luz dos túbulos seminíferos parece maior devido a uma deficiência nas células germinativas e devem estar presentes espermatozóides maduros.
- parada de maturação das células germinativas:** subdivide-se em 2 tipos; de acordo com o nível histológico de parada da maturação. A parada da maturação em fases iniciais do processo de espermatogênese, é caracterizada por um número normal de células imaturas (espermatogônias e espermátocitos) que não progredem até formar um espermatozóide. A etiologia é desconhecida. No tipo onde há parada do processo de espermatogênese já nas fases finais, é caracterizada por uma aberração na espermiogênese. Apesar de existir um número adequado de espermatogônias, espermátocitos e espermátides, há uma redução abrupta e significativa do número de espermatozóides que conseguem chegar até a luz do túbulo seminífero.
Neste caso, a análise seminal mostrará azoospermia.
- aplasia germinativa (síndrome das células de Sertoli):** neste caso, não há epitélio germinativo e a membrana basal é formada apenas por células de Sertoli, ficando os túbulos seminíferos vazios.
A análise seminal mostrará azoospermia.
- hialinização testicular:** substituição do túbulo seminífero, parcial ou totalmente, por substância hialina. Neste caso, conforme o grau de comprometimento, encontrar-se-á oligo ou azoospermia.

É importante que estes termos estejam familiarizados, pois as chances de se obter espermatozóides para ICSI, varia de acordo com o padrão histológico: aplasia germinativa (até 25% a 40%), parada de maturação (50% a 65%), hipoespermatogênese (75% a 90%). Estes números podem eventualmente ser melhorados com a introdução da técnica descrita por Schlegel de TESE com microdissecção (ver organograma de conduta). Evidente que o apoio de um laboratório especializado para processar a amostra de parênquima testicular é peça fundamental na separação e utilização dos espermatozóides. Quando a biópsia tiver caráter puramente diagnóstico, ressalta-se a importância da fixação das amostras em líquido de Bouin.

Ao lado da técnica de biópsia tradicional aberta conhecida por todos, novas terminologias e técnicas para obtenção de espermatozóides devem ser familiarizadas:

- TESE:** (do inglês: “TEsticular Sperm Extraction”): Extração de tecido testicular através de biópsia de testículo aberta clássica ou percutânea com agulha tipo tro-cut. Recentemente uma variável desta técnica foi apresentada e consiste no mapeamento do parênquima testicular em homens azoospermicos com a intenção de localizar focos de

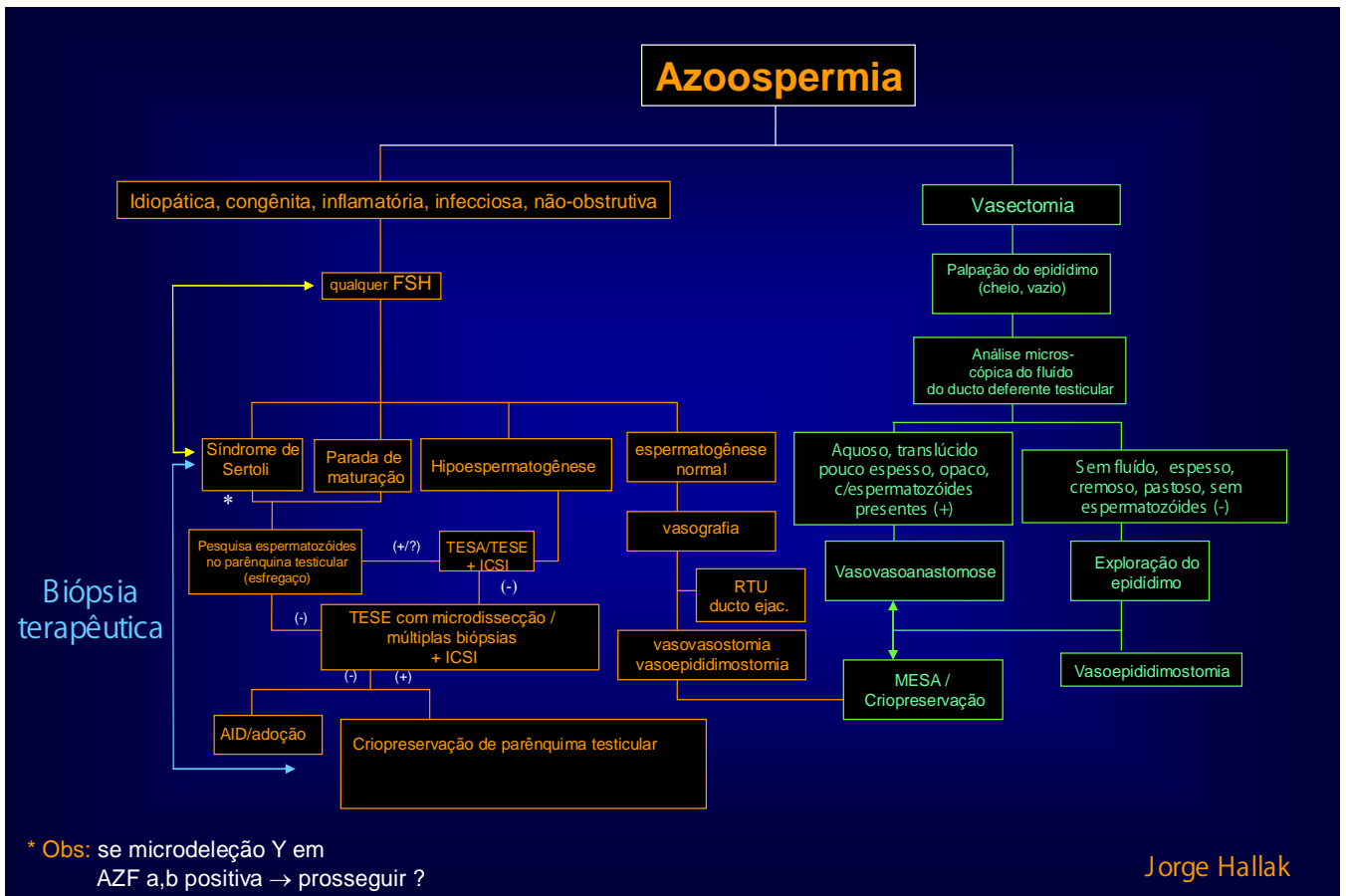
espermatogênese sob magnificação com microscópio microcirúrgico (**TESE com microdissecção**).

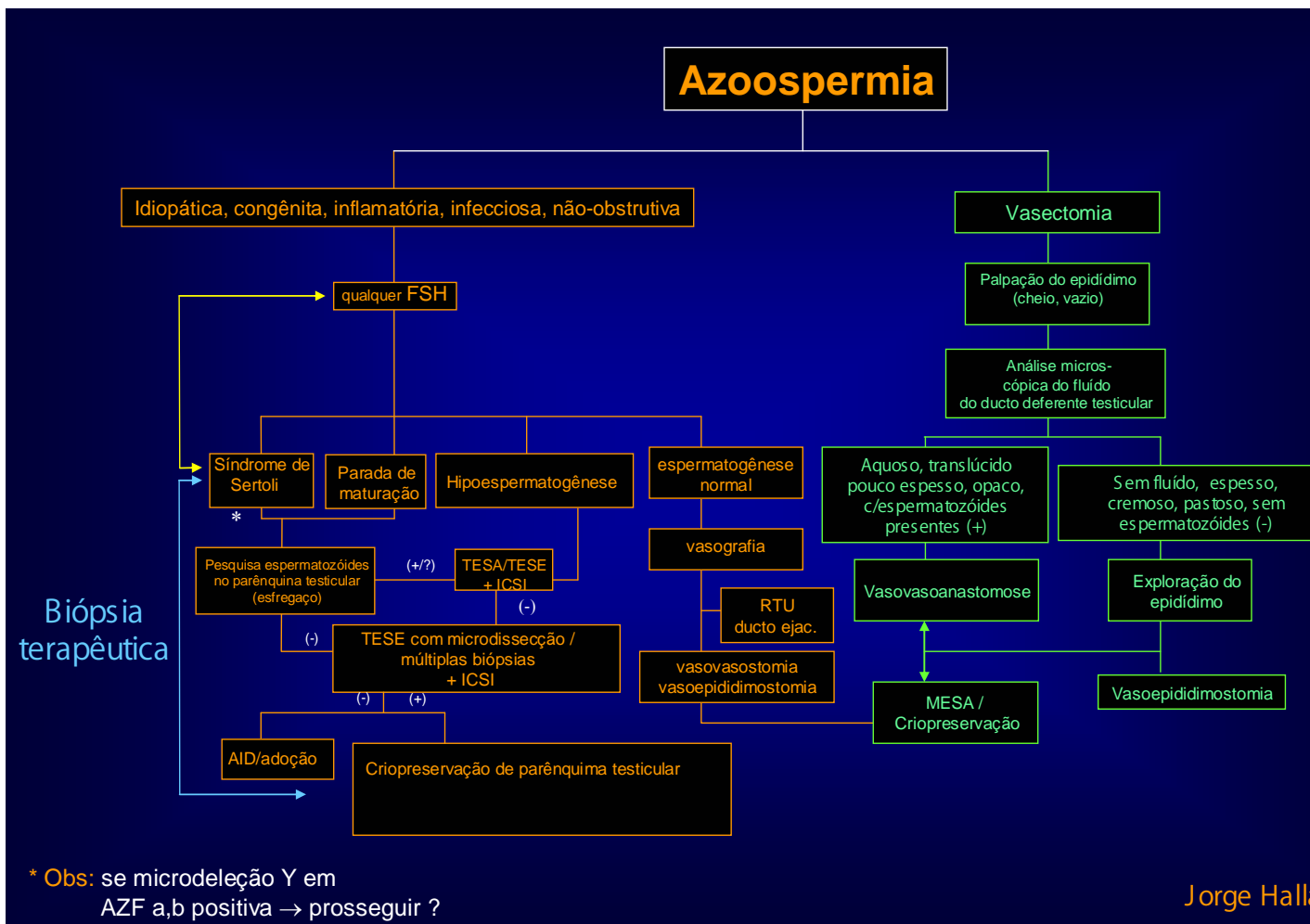
- b) **TESA:** (do inglês: “TEsticular Sperm Aspiration”): Aspiração percutânea de espermatozóides do testículo. Existem inúmeras variantes desta técnica, desde a aspiração com um *butterfly* 19g, até a utilização de uma agulha fina para mapeamento de possíveis focos de espermatogênese e aparelhos especiais para aspiração com pressão negativa.

Considerando-se o que avaliado anteriormente, a biópsia aberta ainda é a melhor maneira de se conseguir material para propósitos diagnósticos e terapêuticos, especialmente no homem azoospermico com disfunção na espermatogênese. Pode ser realizada facilmente com anestesia local e/ou sedação, porém devem ser preferencialmente feita com o apoio de um laboratório especializado em criopreservar o tecido testicular e usar o material para reprodução assistida.

Haja vista os fatos acima expostos, algumas considerações merecem ser feitas:

1. Considero melhor realizar a obtenção de espermatozóides testiculares para fins terapêuticos, no dia da punção ovariana e obtenção de oocitos; portanto realizando o primeiro ciclo com espermatozóides frescos. A criopreservação do resto do parênquima testicular deve ser indicada e o material utilizado no futuro.
2. A utilização da técnica de TESE com microdissecção é definitivamente melhor para obtenção de espermatozóides nos casos piores (Síndrome de Sertoli, parada de maturação), pois estudos controlados demonstraram que em 1/3 dos casos onde foram encontrados espermatozóides por esta técnica, a técnica de múltiplas biópsias tinha falhado. Além disso, a quantidade de tecido que se remove com a microdissecção é bem menor que com biópsia convencional. Considerar que uma única TESE por testículo é suficiente para se confirmar a presença ou ausência de espermatozóides, não pode mais ser considerado como “state-of-the-art”. Da mesma forma, realizar punção aspirativa de testículo em pacientes com azoospermia não-obstrutiva no momento da ICSI e imediatamente dizer ao paciente que houve sucesso ou fracasso na obtenção de espermatozóides e recorrer a banco de doadores, constitui abordagem insuficiente. Temos que lembrar que esta é a única e possivelmente, a última chance destes homens tentarem gerar seus próprios filhos.





REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 3rd edn. Cambridge University Press. Cambridge, 1992.
2. Palermo, G.; Joris, H.; Devroey, P.; and Van Steirteghem, A.C.: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. **Lancet**, v. 340, p. 17-8, 1992.
3. Schlegel, P. N.; Li, P. S. Microdissection TESE: sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. **Hum. Reprod. Update**, v. 4, p. 439, 1998.
4. Su, L. M.; Palermo, G. D.; Goldstein, M.; Veeck, L. L.; Rosenwacks, Z.; Schlegel, P. N. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia: testicular histology can predict success of sperm retrieval. **J. Urol.**, v. 161, p. 112-6, 1999.
5. Tournaye, H.; Camus, M.; Vandervost, M. Surgical sperm retrieval for intracytoplasmic sperm injection. **Int. J. Androl.**, v. 20, p. 69-73, 1997.

AZOOSPERMIAS OBSTRUTIVAS

Diagnóstico e Conduta

Jorge Hallak

A infertilidade é um fenômeno universal que atinge aproximadamente 10 a 15 por cento dos casais, independentemente de suas origens culturais, raciais ou sociais. Inovações tecnológicas e científicas em medicina reprodutiva têm possibilitado a obtenção de gravidez para casais considerados previamente incapazes de gerar seus próprios filhos. Isto se deve principalmente à introdução da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóide no oócito (ICSI) para infertilidade masculina grave. Conseqüentemente, têm sido realizadas intervenções que permitem, por exemplo, que pacientes com agenesia congênita dos vasos deferentes ou com azoospermia não-obstrutiva tenham seus próprios filhos. A importância da avaliação do homem e dos tratamentos andrológicos, tem sido questionados, mesmo sabendo-se que doenças graves podem ser encontradas em homens inférteis e que são apenas descobertas por meio de uma avaliação cuidadosa e abrangente. A atitude de ignorar doenças potencialmente curáveis no homem (ex.: varicocele) e prosseguir com a técnica da ICSI, como única opção para todos os problemas relacionados à infertilidade masculina, é uma atitude sem mérito, infundada e extremamente perigosa. Mesmo com resultados positivos, a ICSI continua invasiva, suprime os processos de seleção natural no momento da fertilização e, do ponto de vista custo-benefício, está muito aquém das opções de tratamento apropriadas para problemas de infertilidade masculina. A ICSI deve ser respeitada e é uma ferramenta útil do urologista para os casos de oligo ou azoospermia grave, após encerradas etapas mais simples.

Na avaliação prévia à obtenção dos espermatozoides antes de iniciarmos o tratamento, se faz necessário que se observe se a causa da azoospermia é obstrutiva ou não-obstrutiva. Também é necessário que se exclua como causa da azoospermia a ejaculação retrógrada e outras anormalidades ejaculatórias, pois essas últimas podem ser solucionadas com procedimentos menos agressivos. Em caso de ejaculação retrógrada, podemos isolar o esperma na urina através de cateterização vesical, utilizando o material obtido para a realização da inseminação intra-uterina. Indivíduos com alterações funcionais podem ser tratados com terapia comportamental, medicamentosa, estimulação vibratória ou eletroestimulação. A história e o exame físico podem sugerir a causa da azoospermia. A presença de testículos de tamanho normal com epidídimos endurecidos ou ausência de vasos deferentes podem apontar para a presença de azoospermia obstrutiva. A história de criptorquidia na presença de testículos de tamanho e consistência alterados podem sugerir azoospermia não obstrutiva, especialmente na presença de aumento dos níveis de FSH. Homens com azoospermia obstrutiva apresentam altos índices de sucesso na obtenção de espermatozoides, qualquer que seja a técnica empregada. Homens com azoospermia não-obstrutiva, devem ser investigados do ponto de vista genético antes de qualquer conduta, pois apresentam uma chance de 15% a 20% de terem microdeleções do cromossomo Y e outros 20% de terem algum tipo de alteração no cariótipo.

A agenesia bilateral dos ductos deferentes é a anomalia congênita mais comum causando azoospermia obstrutiva, sendo encontrada em 1 a 2% dos homens inférteis. Entre 42 e 66% desses pacientes apresentam uma ou mais mutações genéticas de fibrose cística (FC). Acima de 47% dos homens com obstrução idiopática do epidídimo apresentam mutações não severas de FC. É muito importante a realização do teste de mutação dos genes de fibrose cística nas parceiras de indivíduos com ausência congênita dos vasos deferentes com obstrução idiopática dos epidídimos, uma vez que nem sempre mutações para o gene de fibrose cística podem ser detectados em testes rotineiros.

Para homens com azoospermia não obstrutiva, vários defeitos genéticos devem ser considerados; 13% ou mais podem apresentar microdeleções no cromossomo Y, incluindo deleções do DAZ (“Deleted in_Azoospermia”)

Outras anomalias cromossômicas, detectáveis na análise cariotípica, podem ser encontradas, interferindo nos resultados do ICSI.

Quando encontramos anormalidades genéticas, o parceiro deve ser submetido a aconselhamento genético antes da reprodução assistida, bem como ao aconselhamento psicológico.

Vasectomia

Mais de 30 milhões de casais no mundo usam a vasectomia como método de controle da natalidade, representando 8% de todos os métodos contraceptivos usados no mundo. Esta porcentagem é maior em países desenvolvidos. Nos Estados Unidos tem se mantido constante (500 mil/ano), mas o número de pacientes que requisitam a reversão tem aumentado. Até 6-8% dos homens vasectomizados são submetidos à reversão. A reversão da vasectomia, por meio da vasovasostomia ou vasoepididimostomia, é considerada um procedimento com taxas de sucesso médio (gravidez) em torno de 60%.

Reversão de Vasectomia

A vasografia permanece como o padrão-ouro para a localização exata da obstrução dos deferentes e ductos ejaculatórios, pode ser feita somente com soro fisiológico. A principal indicação envolve a localização da obstrução. Excluindo a região de vasectomia prévia, o local mais comum é o epidídimo. Além disso, a correção de uma obstrução distal dos ductos ejaculatórios falhará na presença de obstrução a nível do epidídimo. Desta forma, a presença de sêmen na luz do deferente deve ser documentada através da aspiração de fluido do sítio proximal da vasotomia, utilizando-se o microscópio na sala de cirurgia. Há várias maneiras de se realizar este procedimento. Uma delas é a vasotomia aberta na junção das porções reta e convoluta do deferente escrotal, com fechamento microcirúrgico; outra é a punção do deferente com uma agulha de linfangiografia de 30 gauge e injeção de soro fisiológico ou, menos frequentemente, de meio de contraste diluído. Nós preferimos a técnica de punção. A interpretação de uma vasografia formal é fácil, uma vez que se identifica o sítio da obstrução.

Vasovasostomia e vasoepididimostomia

As principais razões para realização de vasovasostomia são a reversão da vasectomia e nos casos de ligadura iatrogênica dos ductos deferentes.

A vasovasostomia deve ser realizada, preferencialmente com microscópio microcirúrgico.

As duas técnicas mais comuns para reanastomose do deferente são a técnica da dupla camada e a técnica de uma camada modificada. Na técnica de duas camadas, são dados seis a oito pontos com nylon 10-0 na camada mucosa e oito pontos com nylon 9-0 na camada muscular. Na técnica de uma camada modificada são dados seis pontos de nylon 9-0 através de toda a parede do deferente. Ambas as técnicas produzem um alinhamento preciso da mucosa e da camada muscular.

O tempo em anos decorrido entre a vasectomia e o momento da reversão, é um ponto crítico para o sucesso, pois quanto menor for este tempo maior a chance de retorno da fertilidade. Nas reversões até 3 anos após a vasectomia a chance de obter espermatozóides no ejaculado é de 97% e de gravidez 76%. Entre 3 e 8 anos de vasectomia as chances de gravidez são de 53%, entre 8 e 14 anos é de 44% e vasectomias de mais de 14 anos a chance é de 31%. Pacientes com espermograma normal pós vasovasostomia tem 65 a 70% de chance de engravidar a parceira.

O importante é que as taxas de gravidez são sempre superiores àquelas obtidas por meio de reprodução assistida, portanto mesmo para os pacientes com longo tempo pós-vasectomia, a reversão da vasectomia representa melhor opção com menores custos e melhor resultado de gravidez que fertilização assistida.

A vasoepididimostomia é utilizada nos casos de obstrução do epidídimo tanto de causas inflamatórias como em casos pós-vasectomia que durante a reversão não haja saída de espermatozóides pelo coto testicular ou que o líquido seja espesso e amarelado. Nas vasectomias de mais de 8 anos a chance de obstrução de epidídimo é de 30%. É imprescindível o uso de microscópio cirúrgico para realizar uma vasoepididimostomia.

A técnica de eleição é a término-lateral. Uma janela é aberta na túnica albugínea; a seguir, um único túbulo é exposto e cuidadosamente dissecado. Uma pequena elipse da parede do túbulo é retirada. O conteúdo é aspirado para exame em microscópio óptico comum, onde se verifica a presença de espermatozóides. A porção terminal do deferente é então aproximada da janela. A anastomose mucosa-mucosa é feita com 6 a 8 pontos de nylon 10-0. Uma segunda camada de sutura entre a adventícia do deferente e epidídimo é efetuada com nylon 9-0.

O fator limitante na indicação da reversão de vasectomia, não é o tempo de vasectomia, (desde que o urologista esteja habilitado a realizar uma vasoepididimostomia) mas sim a idade da parceira. O tempo para aparecer espermatozóides no ejaculado pode ser superior a 6 meses. Como idade limite na indicação da reversão, acredito sejam parceiras com mais de 37-38 anos de idade.

A criopreservação dos espermatozóides achados no intraoperatório é aconselhável.

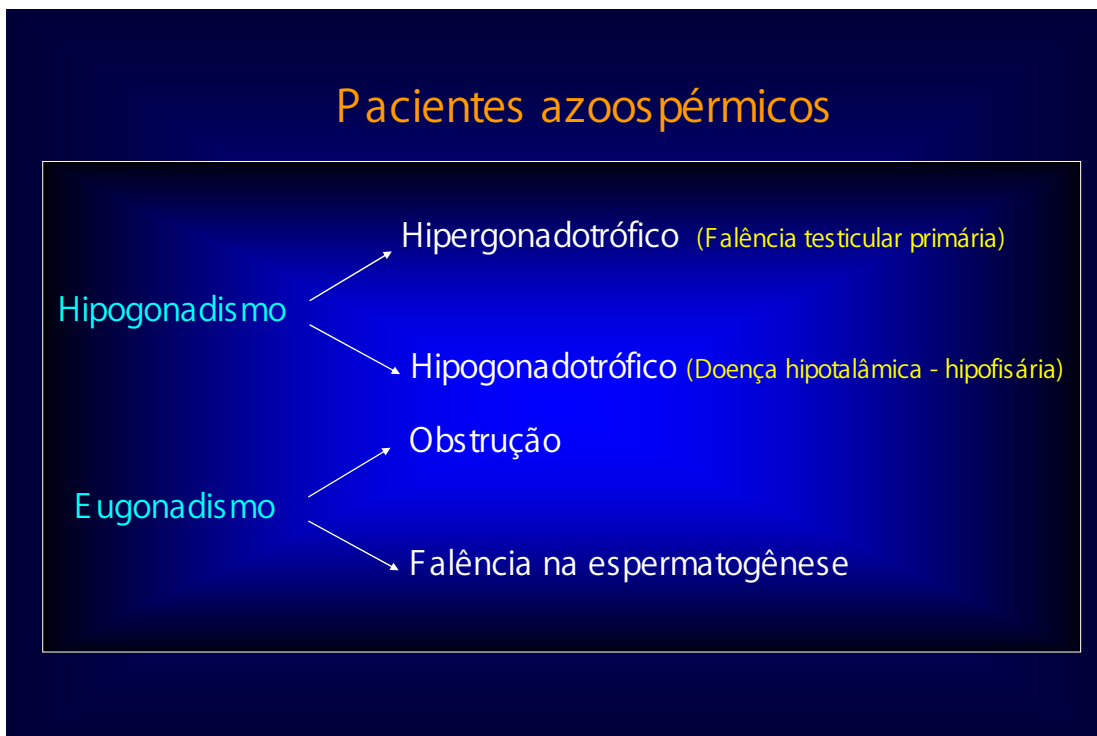
Relação entre tempo de obstrução (anos), permeabilidade e taxas de gestação para a vasovasostomia microcirúrgica.

| Intervalo de tempo entre a vasectomia e a reversão | Permeabilidade | Taxas de gestação |
|--|----------------|-------------------|
| < 3 anos | 97% | 76% |
| 3-8 anos | 88% | 53% |
| 9-14 anos | 79% | 44% |
| > 15 anos | 71% | 30% |

Dados de Belker AM, Thomas AJ, Fuchs EF, et al. Results of 1,469 microsurgical vasectomy reversals by the Vasovasostomy Study Group. J. Urol., 145: 505-511, 1991.

Além do acima exposto, deve-se levar em consideração:

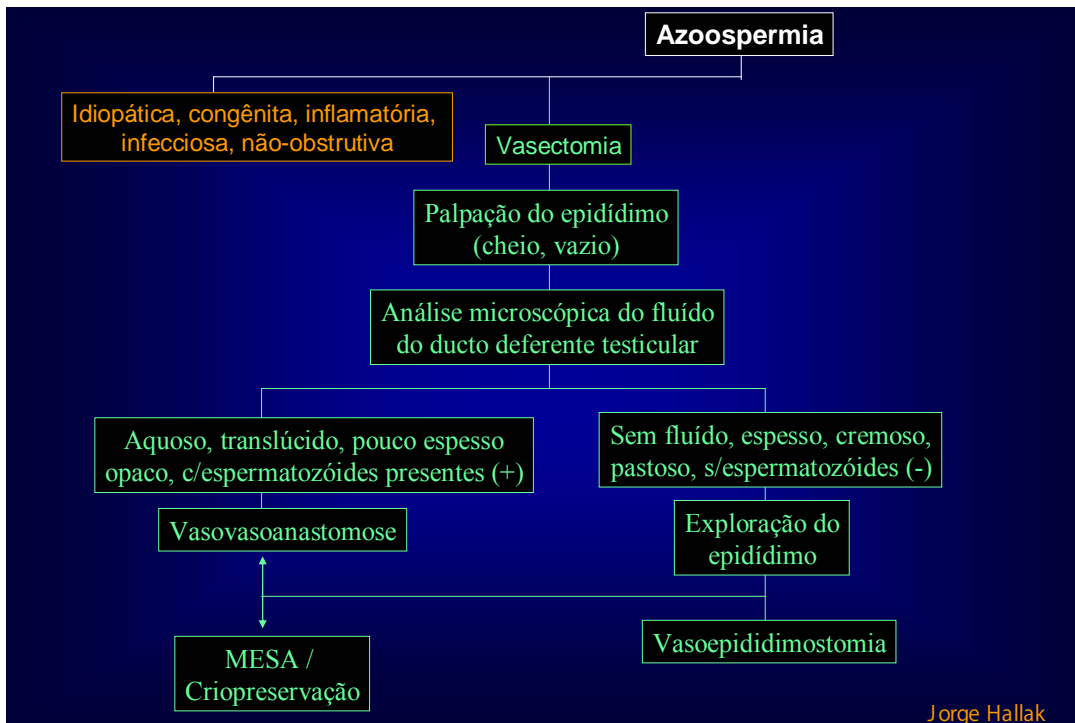
- O uso de reprodução assistida, quando tem sucesso, aumenta dramaticamente os riscos de gravidez múltipla.
- Conseqüentemente, aumentam os riscos de nascimento de baixo peso.
- As chances de parto prematuro variam de 55-65% no caso de gravidez gemelar, até 95% em gravidez trigemelar.
- NEJM, março 2002: 9,2% incidência de malformações maiores associadas com a técnica da ICSI vs. 4,2% na mesma população.
- Maior incidência de anormalidades cromossômicas e defeitos músculo-esqueléticos graves na população nascida de reprodução assistida (RA) em comparação com gravidez natural.
- Incidência 7-12 vezes maior de hipospádia e criptorquidia em RA.



Azoospermia

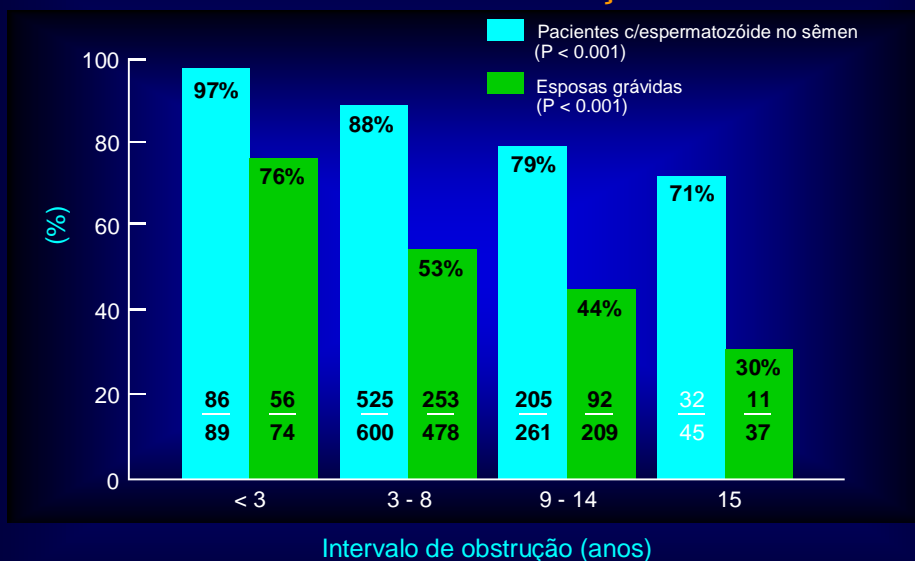
| | Hipogonadismo | | Eugonadismo | |
|------------------------|--|--|---------------------------------|-------------------|
| | Hipergonadotrófico (Falência testicular primária) | Hipogonadotrófico (Doença hipotalâmica - hipofisária) | Falência na espermato gênese | Obstrução |
| Volume testicular (ml) | ↓↓ | ↓ | nl / ↓ | nl |
| Plasma FSH (ng / ml) | ↑↑ | ↓ | nl / ↑ (grande variação) | nl |
| Plasma LH (ng / ml) | ↑↑ | ↓ | nl / ↑ | nl |
| Plasma test. (ng / ml) | ↓ | ↓↓ | nl | nl |
| Plasma PRL (ng / ml) | (nl ↑) | ↓ | nl | nl |
| Volume de sêmen (ml) | (nl ↓) | nl | nl | nl / ↓ (EDO) |
| Frutose seminal (mg%) | nl | nl | nl | nl / ↓ ou ausente |

* Este subgrupo inclui pacientes com azoospermia devido a diferentes causas. Alguns com Síndrome de Sertoli.
- Determinação do LH e testosterona deve ser realizada especialmente em casos de hipogonadismo.



Jorge Hallak

Vasovasostomia: resultado pós-operatório vs. intervalo de obstrução



Belker AM, Thomas AJ, et al. J Urol. 145: 505-511, 1991

Aspiração de vesículas seminais e vesiculografia

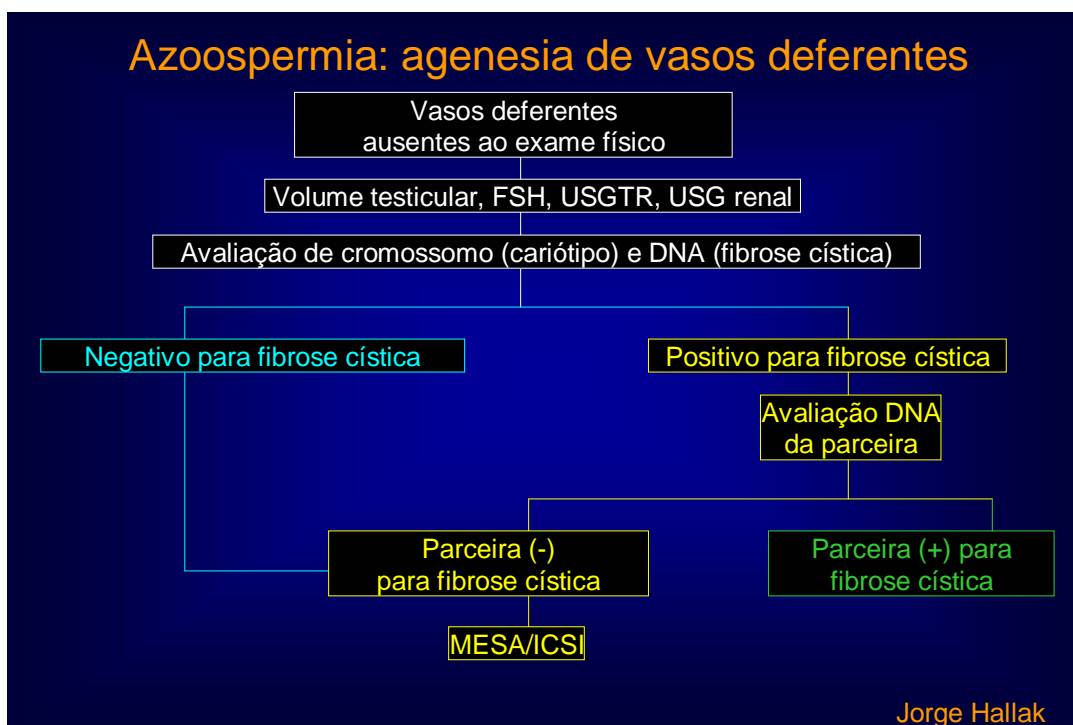
A ultra-sonografia trans-retal é um dos métodos para se avaliar o estado dos ductos ejaculatórios. Está indicada nos casos de azoospermia de baixo volume, em que uma dilatação acentuada das vesículas seminais é sugestiva de obstrução dos ductos ejaculatórios, e a ausência de vesículas seminais é altamente suspeita de agenesia dos deferentes. Da mesma forma, em casos inexplicados de alterações severas da motilidade e contagens baixas, pode descartar obstrução parcial dos ductos ejaculatórios. A vesiculografia é uma alternativa à vasografia para confirmar estas patologias. Uma agulha de 18 gauge pode ser dirigida à vesícula seminal sob orientação sonográfica, com a aspiração de líquido seminal. A presença de espermatozóides em homens azoospermicos é sugestiva de obstrução dos ductos ejaculatórios. Em pacientes com lesões medulares ou diabetes melito, a presença de espermatozóides nas vesículas seminais também é notada. O tratamento convencional para a obstrução dos ductos ejaculatórios é a ressecção transuretral com a exposição do ducto.

Ressecção Trans-uretral dos Ductos Ejaculatórios

A obstrução do ducto ejaculatório é uma causa bem documentada de azoospermia ou de oligoastenospermia se, respectivamente, estiverem presentes uma obstrução total ou parcial. Podem haver dor ou desconforto pélvicos.

A apresentação típica é a de um paciente com volume de sêmen inferior a 1 ml e sêmen ácido com um pH em torno de 6,0. O teste qualitativo de frutose será negativo ou fracamente positivo, devido a possíveis vesículas seminais hipoplásicas. O exame físico deve mostrar um testículo de tamanho normal, com deferentes e epidídimos palpáveis. A ultra-sonografia trans-

retal é o método de imagem ideal para confirmar ainda mais o diagnóstico, devendo as vesículas seminais apresentarem larguras maiores do que 1,5 cm. O tratamento clássico da obstrução dos ductos deferentes é a ressecção trans-uretral. Após o isolamento do deferente, uma agulha de linfangiografia de 30 gauge é inserida na luz do mesmo e o líquido é aspirado para verificar a presença de sêmen. Realiza-se então uma vasografia formal, combinada com a injeção de índigo-carmin no deferente. A ressecção observa os mesmos preceitos técnicos de uma ressecção trans-uretral da próstata, excetuando o fato de que se realiza uma ressecção muito pequena entre o colo vesical e o verumontano, tomando-se extremo cuidado para não lesar a área do esfíncter externo. A tonalidade azul do índigo-carmin injetado deveria ser vista imediatamente.



Aspiração Microcirúrgica dos Espermatozóides do Epidídimo (MESA)

Ao microscópio cirúrgico, um único túbulo epididimário é aberto e o sêmen é recuperado para reprodução assistida ou criopreservação. Os passos técnicos são semelhantes aos da epididimo-vasostomia sem anastomose. As indicações incluem pacientes com ausência congênita dos deferentes e a falha em procedimentos prévios de reversão de vasectomia, nos quais uma nova cirurgia não possa ser realizada. As vantagens deste procedimento sobre as técnicas mais simples de recuperação de sêmen são as de que pode ser feito apenas uma vez no paciente, pois uma única coleta pode recuperar sêmen para até 7 – 8 ciclos de ICSI se necessário. Isto também permite que se planeje a estimulação ovariana na parceira feminina em uma situação mais conveniente, com o sêmen criopreservado já garantido. É importante que se feche o túbulo epididimário com uma sutura de nylon 10-0 e a túnica com uma sutura de nylon

9-0. Isto possibilita que procedimentos futuros, se necessários, sejam mais fáceis, criando menos cicatrizes. É imprescindível que haja sincronismo de toda a equipe de infertilidade para que o MESA tenha sucesso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Belker AM, Sherins RJ, Colam CB, e col. High fertilization and pregnancy rates obtained by nonsurgical percutaneous needle aspiration of testicular sperm. *J Urol.* 1996; 155(suppl): 364 A .Abstract 213.
2. Bourne H, Watkins W, Speirs A, e col. Pregnancies after intracytoplasmic injection of sperm collected by fine needle biopsy of the testis. *Fertil Steril.* 1995; 64: 433-436.
3. Craft IL, Khalifa Y, Boulos A, e col. Factors influencing the outcome of in-vitro fertilization with percutaneous aspirated epididymal spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection in azoospermic men. *Hum Reprod.* 1995; 10: 1791-1794.
4. Devroey P, Liu J, Nagy Z, e col. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 1995; 10: 1457-1460.
5. Devroey P, Nagy P, Tournaye H, e col. Outcome of intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in obstructive and nonobstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 1996; 11: 1015-1018.
6. Gil-Salom M, Minguez Y, Rubio C, e col. Intracytoplasmic testicular sperm injection: an effective treatment for otherwise intractable obstructive azoospermia. *J Urol.* 1995; 154: 2074-2077.
7. Girardi SK, Schlegel PN. Current status of intraoperative cryopreservation of sperm. *Adv Urology.* 1997; 10: 55-69.
8. Girardi SK, Schlegel PN. Microsurgical epididymal sperm aspiration: review of techniques preoperative considerations, and results. *J Androl.* 1996; 17 (1): 5-9.
9. Jow WW, Steckel J, Schlegel PN, e col. Motile sperm in human testis biopsy specimens. *J Androl.* 1993; 14(3): 194-198.
10. Kahraman S, Ozgur S, Alatas C, e col. Fertility with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod.* 1996; 11: 756-760.
11. Kent-First MG, Kol S, Muallem A, e col. Infertility in intacytoplasmic-sperm-injection-derived sons. *Lancet.* 1996; 348(9023): 332.

12. Palermo G, Joris H, Devroey P, e col. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into na oocyte. *Lancet*. 1992; 340:17-18.
13. Palermo GD, Cohen J, Alikani M, e col. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. *Fertil Steril*. 1995; 63: 1231-1240.
14. Palermo GD, Schlegel PN, Colombero LT, e col. Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. *Hum Reprod*. 1996; 11: 1023-1029.
15. Pavlovich CP, Schlegel PN. Fertility options after vasectomy: a cost-effectiveness analysis. *Fertil Steril*. 1997; 67: 133-141.
16. Reijo R, Lee TY, Salo P, e col. Diverse spermatogenic defect in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet*. 1995; 10: 383-393.
17. Reijo, R.; Alagappann, R. K.; Patrizio, P.; Page, D. C.: Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. **Lancet.**, v. 347, p. 1290-3, 1996.
18. Schlegel PN, Palermo GD, Alikani M, e col. Micropuncture retrieval of epididymal sperm with in vitro fertilization: importance of in vitro micromanipulation techniques. *Urology*. 1995; 46: 238-241.
19. Schlegel PN, Palermo GD, Goldstein M, e col. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia. *Urology*. 1997; 49: 435-440.
20. Silber SJ, Nagy ZP, Liu J, e col. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod*. 1994; 9: 1705-1709.
21. The Sperm Microaspiration Retrieval Techniques Study Group. Results in the United States with sperm microaspiration retrieval techniques and assisted reproductive technologies. *J Urol*. 1994; 151: 1255-1259.

GENÉTICA E INFERTILIDADE MASCULINA

Fábio Firmbach Pasqualotto

A incidência de oligozoospermia grave (abaixo de 5 milhões de espermatozóides/ml) e azoospermia é de aproximadamente 10% a 12% de toda a população masculina infértil. Embora a ICSI represente um dos principais avanços na abordagem do homem infértil, existem considerações importantes relativas ao potencial de transmissão de anormalidades genéticas para a prole, uma vez que os processos de seleção natural dos espermatozóides são ultrapassados.

Os três fatores genéticos mais freqüentemente relacionados à infertilidade masculina são: aberrações cromossômicas, mutações gênicas e microdeleções do cromossomo Y. Na população de homens inférteis, a incidência de alterações cromossômicas varia de 6 a 7%, aumentando à medida que diminui a concentração espermática (cerca de 16% nos homens azoospermicos). A síndrome de Klinefelter (47,XXY) é a mais freqüente das aberrações cromossômicas entre os homens inférteis, atingindo 7% a 13% dos azoospermicos, podendo haver indivíduos com esta síndrome e cariótipo em mosaico (46,XY/47,XXY e outros), com graus variáveis de comprometimento da espermatogênese. São também importantes as alterações estruturais envolvendo autossomos e/ou cromossomos sexuais. A freqüência de translocações equilibradas nos homens inférteis é cerca de 5 a 10%, perfazendo uma chance 10 vezes superior à observada nos homens normais. A causa do comprometimento da espermatogênese nos casos de aberrações cromossômicas não é completamente conhecida. As anomalias no pareamento e segregação dos cromossomos e os diversos processos moleculares necessários à meiose propiciam inúmeros “alvos”, tanto para o dano genético como para a introdução de defeitos estruturais que levam à suspensão do desenvolvimento da espermatogênese.

Mutações gênicas

A fibrose cística (CF), que é uma doença autossômica recessiva que acomete 1 em 2500 indivíduos caucasianos e potencialmente fatal para a prole. As mutações do gene regulador da condutância transmembrânica da fibrose cística (CFTR – *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator gene*) podem resultar em anormalidades do desenvolvimento das estruturas derivadas dos ductos de Wolff (ductos eferentes, epidídimos e deferentes) e, secundariamente, a agenesia renal unilateral e aplasia ou hipoplasia das vesículas seminais. Em homens com azoospermia obstrutiva devido à agenesia congênita dos vasos deferentes a pesquisa do CFTR deve ser realizada. Caso o paciente apresente alguma mutação, deve-se proceder à pesquisa na parceira.

Aproximadamente 1,3% dos homens inférteis possuem agenesia congênita dos ductos deferentes. Pelo menos uma mutação do gene CFTR pode ser identificada em cerca de 50 a 82% dos pacientes com agenesia bilateral e em 43% daqueles com agenesia unilateral dos ductos deferentes. Entre 11 a 26% dos pacientes com ausência congênita dos vasos deferentes apresentam agenesia renal associada e resultados negativos nas análises das mutações do gene CFTR sugerem que anomalias urogenitais possuem uma diferente etiologia da ausência

congenita dos vasos deferentes isolada. A ICSI é uma alternativa factível para a reprodução destes pacientes, desde que bem orientados sobre os riscos de transmissão aos descendentes. Os bons resultados obtidos com este método tornam imperativo o rastreamento genético da parceira, uma vez que, no caso dela ser também portadora, haverá risco de até 1 para cada 80 nascimentos com a forma grave de CF.

Microdeleções do Cromossomo Y

A existência de um gene no cromossomo Y implicado na espermatogênese foi inicialmente postulada em 1976 a partir do estudo de homens inférteis que tinham perdido porções consideráveis do braço longo deste cromossomo (Yq). O gene SRY presente no braço curto do cromossomo Y (Yp) é fundamental para a diferenciação e crescimento testicular. A pesquisa da microdeleção do cromossomo Y é importante para definir a etiologia da falência da espermatogênese assim como conceder informações preciosas a respeito do manejo clínico mais apropriado do paciente infértil e do menino nascido do ICSI.

Quando comparadas com outras causas conhecidas de infertilidade, as microdeleções do cromossomo Y são relativamente freqüentes (7 a 10%) e sua freqüência aumenta com o grau de comprometimento da espermatogênese (16% em azoospermicos). Desta forma, a microdeleção do cromossomo Y é uma causa comum de falência na espermatogênese. A correlação entre as microdeleções do cromossomo Y e infertilidade comparada à relativa ausência de tais alterações nos homens férteis sugere uma estreita relação de causa-efeito entre este achado e a infertilidade masculina.

Três regiões do braço longo do cromossomo Y determinadas AZFa, AZFb, AZFc têm sido propostas como associadas à aplasia de células germinativas, parada da maturação e hipoespermatogênese, respectivamente. Desta forma, em mais de 50% dos pacientes azoospermicos com deleção na região AZFc espermatozoides maduros podem ser encontrados. Deve-se pesquisar microdeleções de cromossomo Y em todo homem com concentração espermática inferior a 5 milhões de espermatozoides /ml.

Riscos de transmissão à prole com uso de reprodução assistida em infertilidade masculina

A introdução e a aplicação indiscriminada das técnicas de reprodução assistida vem trazendo questionamentos e preocupações quanto ao risco de transmissão de doenças que de outra maneira seriam barradas pelo processo de seleção natural. Várias são as hipóteses aventadas para tal fenômeno: a) mecanismos seletivos que combatem os espermatozoides considerados morfolologicamente anormais que atuam *in vivo* talvez não atuem de forma efetiva nos procedimentos *in vitro*; b) o ambiente hormonal *in vitro* talvez predisponha a alterações na meiose e mitose ocasionando aneuploidia cromossômica; e c) mutações podem resultar de várias exposições químicas e ambientais durante a fertilização *in vitro*.

A prevalência de malformações congênitas em crianças nascidas de ICSI parece ser superior quando comparada às crianças que nascem sem a necessidade da FIV, sendo de 3,78% vs. 7,38%, respectivamente. A incidência de malformações genitourinárias, como criptorquidia e hipospádia é de 7 a 12 vezes superior com a ICSI comparada a crianças nascidas de gestações estabelecidas naturalmente. A incidência de aberrações cromossômicas sexuais é significativamente maior (0,3-1,6%) comparado com a população geral (0,19-0,23%). Portanto,

existem indícios fortes que há transmissão de malformações congênitas na população por meio da utilização da ICSI, devendo ser esta técnica utilizada quando os outros recursos terapêuticos falharem, e não como primeira opção.

O Cariótipo com bandas deve ser solicitado em homens candidatos a programas de reprodução assistida (FIV ou ICSI), casais com história de abortamento de repetição, os com antecedentes familiares de aberração cromossômicas. A pesquisa de microdeleção de cromossomo Y deve ser solicitada em homens com azoospermias não-obstrutivas ou oligozoospermias graves (< 5 milhões de espermatozóides/ml).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sharma RK, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl* 2004; 6: 139-148.
2. Agarwal A, Said T. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 331-45.
3. Saleh R, Agarwal A, Sharma RK, Said T, Sikka S, Thomas AJ Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2003; 80: 1431-6.

CÂNCER E INFERTILIDADE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO

Fábio Firmbach Pasqualotto

Um crescente número de pessoas é tratado para o câncer com sucesso e para aqueles com expectativa de sobrevida por longo tempo os efeitos tardios do tratamento são preocupantes. Em muitos pacientes com câncer, a qualidade seminal já está reduzida antes mesmo de serem submetidos a qualquer forma de tratamento e deterioração posterior é observada após o tratamento do câncer. Infelizmente, é impossível de prever quem irá ter espermatogênese normal ou ficará com azoospermia.

Embora a melhora nos regimes de tratamentos adotados tenha resultado em um elevado grau de recuperação da fertilidade, a incidência de infertilidade permanece elevada. Em até 90% das vezes os pacientes ficam azoospermicos e apenas 20-50% deles voltam a apresentar espermatogênese 2 a 3 anos após o término do tratamento. De fato, os pacientes com câncer de testículo, leucemia e linfoma apresentam a pior qualidade seminal quando comparados a outros grupos de pacientes com câncer.

Um debate tem acontecido a respeito da necessidade de ginecologistas, urologistas, hematologistas, generalistas e oncologistas para recomendar criopreservação de espermatozoides, se o tempo permite, antes de iniciar a terapia para o câncer. Hoje, criopreservação de sêmen associado a técnicas de reprodução assistida pode fornecer a maioria dos pacientes inférteis com câncer após a terapia uma oportunidade de ter um filho, com excelentes chances de consegui-lo. A criopreservação de espermatozoides humanos tem recebido grande atenção nos últimos anos devido à melhora das técnicas de reprodução assistida que tem possibilitado a fertilização de oócitos com um número muito pequeno de espermatozoides, aumentando muito o espectro de sua indicação principalmente em pacientes com má qualidade seminal inicial.

As amostras seminais devem ser coletadas em ambientes isolados, de preferência em clínicas de reprodução humana ou laboratórios de andrologia. O estímulo manual é o único método recomendado porque envolve um risco menor de contaminação da amostra seminal. A presença da parceira durante a coleta é permitida se assim o paciente desejar. Após feita a coleta, cada amostra seminal é etiquetada e codificada. Uma pequena porção da amostra é examinada. O restante é dividida em 3 a 4 frascos para o armazenamento permanente. O processo de criopreservação inicia após a adição de um criopreservante. Os frascos são colocados no congelador por 8 minutos à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, as amostras são colocadas no vapor do nitrogênio líquido por 2 horas. Finalmente, as amostras são colocadas no tanque de armazenamento contendo nitrogênio líquido à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sêmen pode permanecer por mais de 50 anos nestes tanques sem prejuízo da qualidade seminal.

A importância da manutenção de um banco de sêmen humano é garantir uma fonte de espermatozoides para uso em técnicas de reprodução assistida, e as indicações são:

1. Inseminação com sêmen do parceiro: nos casos de ausência temporária ou definitiva do mesmo, baixa frequência sexual e disfunção erétil.
2. Pacientes que necessitam de criopreservação terapêutica de sêmen, incluem aqueles que tem alguma doença que induza a infertilidade ou iniba a espermatogênese. Indivíduos em idade

reprodutiva e com qualquer tipo de câncer, que serão submetidos à radioterapia e/ou quimioterapia, ou a cirurgias que possam comprometer o potencial fértil (ex: dissecação dos linfonodos retroperitoneais, ressecção endoscópica da próstata, cirurgias envolvendo o colo vesical). Recomenda-se a criopreservação antes do início do tratamento específico.

3. Inseminação com sêmen de doadores anônimos: nos casos de infertilidade masculina após esgotadas as possibilidades terapêuticas, em casos de doenças genéticas transmissíveis por parte do homem ou por fatores econômicos o casal prefere a utilização do banco de sêmen a tentar outras técnicas de reprodução assistida.

4. Programas de fertilização *in vitro* e micromanipulação de gametas: possibilita inseminações programadas em um mesmo ciclo de tratamento. Também permite a coleta fora do dia do procedimento de reprodução assistida, permitindo maior liberdade do paciente sem o estresse da coleta.

5. Criopreservação de sêmen para indivíduos que desejam ser submetidos à vasectomia, objetivando preservar a fertilidade futura.

6. Criopreservação dos espermatozoides obtidos durante microcirurgias para reconstrução do sistema reprodutivo (ex.: vasovasostomia e vasoepididimostomia).

7. Também aplica-se à criopreservação dos espermatozoides obtidos por técnicas cirúrgicas do epidídimo ou do testículo (MESA, TESA, TESE, PESA), para utilização em micromanipulação de gametas.

8. Criopreservação de sêmen de indivíduos que trabalham em profissões de alto risco (exemplo: mergulhadores de elevada profundidade, indústrias químicas, exposição a agrotóxicos e pesticidas e exposição à radiações ionizantes).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anderson B, LaPolla L, Tumer D, Champman G, Buller R. Ovarian transposition in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1993;49:206-14.
2. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Hum Reprod* 1994;9:597-603.
3. Pasqualotto FF, Agarwal A. Should we offer semen cryopreservation to men with testicular cancer? *Clev Clin J Med* 2001; 68(2): 101-102.
4. Schuffner A, Stockler S, Costa S, Centa L. Long-term cryopreserved semen results in a live birth 12 years later. *J Urol* 2004; 171: 358.
5. Trouson AO, Pushett D, MacLellan LJ, Lewis I, Gardner DK. Current status of IVM/IVF and embryo culture in human and farm animals. *Theriogenology* 1994;41:57-66.

TRATAMENTO CLÍNICO DA INFERTILIDADE MASCULINA

Fábio Firmbach Pasqualotto

1 Infertilidade masculina de causa desconhecida

Em 25% dos homens após a correta avaliação da infertilidade não se consegue descobrir a etiologia da infertilidade. Esta condição recebe a denominação de “infertilidade idiopática”. Existe um outro grupo de pacientes com uma provável causa para sua infertilidade, porém sem tratamento específico. Entretanto, com o avanço da descoberta das causas genéticas de infertilidade masculina, cada vez mais os pacientes azoospermicos e oligozoospermicos apresentam etiologia da infertilidade estabelecida. O tratamento empírico foi proposto para este grupo de pacientes com infertilidade desconhecida; porém apresenta resultados insatisfatórios e não deve ser empregado rotineiramente.

Existem alguns pontos críticos quanto à avaliação dos resultados do tratamento empírico como: 1) o grupo de pacientes rotulados como idiopático é muito heterogêneo; 2) a definição de infertilidade masculina varia de estudo a estudo; 3) existem variações nos parâmetros seminais diariamente em homens férteis e inférteis; 4) ausência de grupo controle em alguns estudos e os esquemas de tratamento não são padronizados; e 5) situação única na medicina, onde o resultado do tratamento depende do casal e não apenas do homem (O'Donovan et al., 1993; Vandekerckhove et al., 1993; Kamischke and Nieschlag, 1998).

Tratamento Hormonal

Tratamento com GnRH

Partindo do fato que tanto o uso de GnRH, quanto gonadotrofinas e testosterona podem ser usados no tratamento de hipogonadismo, tais medicamentos foi então utilizado em casos de infertilidade idiopática masculina. Entretanto, somente experimentos não controlados foram avaliados, mostrando resultados controversos, de modo que nenhuma conclusão para a eficácia do tratamento pode ser extraída.

HCG/HMG

O tratamento de infertilidade masculina idiopática com HCG/HMG tem sido usado por muitos anos e muitos estudos não controlados foram publicados. Uma revisão avaliando 39 estudos não controlados demonstrou uma taxa de gravidez de 8-14% em média (Schill, 1986).

Estudo cruzado, randomizado, duplo-cego, placebo controlado, com utilização de HCG/HMG para homens oligoastenoteratozoospermicos não demonstrou nenhum efeito benéfico nos parâmetros seminal ou nas taxas de gravidez (Knuth et al., 1987), sugerindo a ineficácia de tal utilização.

Preparações purificadas de HCG e FSH recombinante

Resultados promissores em macacos (van Alphen et al., 1988; Weinbauer et al., 1992) e em estudos não controlados (Acosta et al., 1992) tem levado a uma reconsideração do tratamento de FSH na infertilidade masculina; mas a necessidade por estudos duplo-cego, placebo-controlados faz-se necessária (Baker et al., 1992; Simoni and Nieschlag, 1995). Dessa forma, experimentos clínicos randomizados controlados com HMG purificado ou FSH recombinante foram tem sido publicados (Matorras et al., 1997; Kamischke et al., 1998; Comodo et al., 1996). Nenhum destes estudos mostrou melhoria dos parâmetros convencionais do sêmen comparados ao grupo placebo ou aos valores iniciais.

Em contraste a maioria dos estudos não controlados, nenhum dos estudos controlados detectou um aumento significativo nas taxas de gravidez devido ao tratamento com FSH. Tendo em vista os custos elevados da terapia de FSH e dos benefícios questionáveis, o tratamento de FSH, como praticado hoje, não pode ser recomendado.

Anti-estrógenos

Compostos anti-estrogênicos que competitivamente bloqueiam estrógenos no sítio receptor podem reduzir o feedback inibidor e levar a um aumento das concentrações de gonadotrofinas e testosterona. De 11 testes randomizados realizados, 5 eram verdadeiramente randomizados, estudos placebo-controle (Ronnberg, 1980; Scottish Infertility Group, 1982; Török, 1985; Sokol et al., 1988; WHO, 1992b) e 1 estudo duplo-cego randomizado (Ainmelk et al., 1982). Em um estudo (Scottish Infertility Group, 1982) o placebo dado ao grupo controle era vitamina C. Nenhum tratamento com tamoxifeno nem clomifene mostrou algum efeito terapêutico significativo nas taxas de gravidez em um único estudo. Meta-análises de todos os estudos randomizados acima mencionados, não mostraram influência significativa (odds ratio 1.33 95% CI 0.78-2.28) de anti-estrógenos nas taxas de gravidez em 459 pacientes analisados.

Terapias não-hormonais

Embora o papel do sistema cinica na espermatogênese não esteja claramente definido, caliceína tem sido muito utilizada para o tratamento da infertilidade idiopática masculina em práticas andrológicas na Europa e Japão. Nenhum dos estudos mostrou um efeito significativo de caliceína ou inibidores de enzima de conversão da angiotensina nos parâmetros do sêmen ou taxas de gravidez. Os estudos randomizados, duplo-cego e placebo-controle tendo gravidez como resultado avaliado foram analisados juntos (Bedford and Elstein, 1981; Izzo et al., 1984; Keck et al., 1994; Schill et al., 1994) os quais não revelaram influência significativa (odds ratio 0.92; 95% CI 0.40-2.08) de agentes que aumentam a cinina nas taxas de gravidez em quase 200 pacientes.

Bromocriptina tem sido aplicado para infertilidade idiopática masculina porque é efetiva no tratamento de hiperprolactinemia e na presunção que a prolactina pode desempenhar uma função direta na espermatogênese e na produção de hormônios reprodutivos. Nenhum efeito benéfico foi relatado em termos de parâmetros seminais ou taxas de gravidez, sugerindo que tratamento com bromocriptina não acarreta em benefício (Hovatta et al., 1979; Glatthaar et al., 1980; Ainmelk et al., 1982).

Outras terapias não hormonais para infertilidade idiopática masculina incluem antioxidantes como vitamina C (Dawson et al., 1992) e vitamina E (Kessopoulou et al., 1995; Moilanen and Hovatta, 1995; Suleiman et al., 1996) e glutatona (Lenzi et al., 1993). Apesar do conceito existente sobre antioxidantes, muitos estudos publicados não são randomizados (Dawson et al., 1992). Nenhuma melhora significativa nas características do sêmen de pacientes inférteis foi relatada por um estudo (Mailanen and Hovatta, 1995), enquanto outros encontraram melhoras na função espermática devido aos antioxidantes (Lenzi et al., 1993; Kessopoulou et al., 1995; Suleiman et al., 1996). Um estudo mostrou efeito marcante do tratamento com vitamina C nas taxas de gravidez (Suleiman et al., 1996) enquanto outro estudo não mostrou efeito (Kessopoulou et al., 1995).

Evidências a respeito da eficácia da vitamina E em homens inférteis poderia ser avaliada em estudos de boa qualidade antes de ser recomendada.

2. DISTÚRBIOS EJACULATORIOS

A ejaculação retrógrada, a ausência de ejaculação e as ejaculações precoces e retardadas podem prejudicar a deposição adequada de sêmen na vagina levando à infertilidade. Na ejaculação retrógrada, o líquido seminal é impulsionado para dentro da bexiga. Condições que alteram a inervação simpática do colo vesical, como cirurgias retroperitoneais, diabetes, lesões medulares e ressecção transuretral da próstata podem causar ejaculação retrógrada. O diagnóstico é feito com o exame do sedimento urinário após masturbação, e o tratamento pode ser efetivo com pseudoefedrina (60mg 4x/dia), fenilpropanolamina (75mg 2x/dia), efedrina (50mg 4x/dia) ou imipramina (25mg 3x/dia). Como estes tratamentos geralmente resultam em efeitos colaterais, deve-se usar estas medicações durante 10 dias a cada mês, iniciando-se 5 dias antes do período esperado da ovulação. Entretanto, nenhum estudo controlado foi realizado e a eficiência do tratamento é baseada em estudos isolados. No caso de insucesso, o sêmen pode ser recuperado da urina e processado para uso em inseminação intra-uterina ou outras técnicas de reprodução assistida. Os resultados negativos indicam a necessidade de vibroestimulação ou eletroejaculação.

Vibroestimulação e Eletroejaculação

A estimulação vibratória peniana é baseada no uso de vibrações de alta frequência (100 Hz) concentradas no frênulo peniano com uma amplitude de 2 a 3,5 mm. Ela pressupõe a existência de um arco reflexo intacto na altura da medula tóraco-lombar. Para produzir resultados satisfatórios, a lesão deve ser cranial a T10. As vantagens sobre a eletroejaculação (EEJ) são a menor morbidade e menos efeitos colaterais, custos mais baixos, e a possibilidade do casal realizar a terapia em casa. Nos casos de falha da estimulação vibratória ou em lesões abaixo de T10, o uso da EEJ com um probe (bobina) retal é a terapia definitiva para pacientes com interrupção da inervação simpática e ausência de emissão.

3. INFECÇÃO DO TRATO GENITAL

As infecções representam indicações potenciais de terapêuticas específicas em infertilidade masculina, pois contribuem de diferentes maneiras para prejudicar a fertilidade: inibem a interação espermatozóide-oócito, afetam a função espermática, produzem excesso de ERO e obstrução nos túbulos seminíferos ou epidídimos, causando azoospermia obstrutiva. A presença de leucospermia varia de 9 a 23% da população subfértil, representando uma área

importante de estudo. Entretanto, a relação entre leucospermia e infecção permanece pouco entendida. A maioria dos homens com leucospermia possuem culturas seminais que falham em mostrar uma infecção ativa do trato genital.

Estudos que documentam uma associação entre um patógeno específico no sêmen e leucospermia apresentam resultados conflitantes. A *Chlamydia trachomatis* e a *Neisseria gonorrhoea* são os principais agentes etiológicos da epididimite, em homens abaixo de 35 anos. O diagnóstico é baseado na anamnese, exame físico e análise do sêmen, mostrando células arredondadas após a coloração para peroxidase (teste de Endtz), o que comprova a presença de leucócitos no sêmen.

As infecções sintomáticas devem ser identificadas e tratadas. O tratamento deve ser realizado com Doxiciclina 100 mg 2x/dia por 14 dias e nos pacientes alérgicos a derivados de tetraciclina usa-se a eritromicina 1,5 g/dia por 10 a 14 dias. O tratamento da parceira também é necessário, e deve ser realizado em conjunto. A azitromicina também pode ser utilizada em dose única de 1 g. Talvez, pesquisas futuras demonstrarão a utilidade do uso de antioxidantes como vitamina E e C na melhora da qualidade seminal em pacientes com leucospermia.

4. TRATAMENTO ESPECÍFICO DAS ENDOCRINOPATIAS

4.1 Hiperprolactinemia

Ocorre em 3% dos homens inférteis. O tratamento é eficaz quando usado em pacientes com níveis séricos de prolactina acima de 30 ng/ml. Como provável mecanismo etiológico, existe a influência negativa na secreção hipotalâmica de GnRH com inibição da ação do LH nas células de Leydig. Além de causas idiopáticas, tumores hipofisários, doenças hepáticas, hipotireoidismo, drogas (anti-depressivos tricíclicos, fenotiazinas) podem causar hiperprolactinemia. O tratamento da hiperprolactinemia é feito com drogas dopaminérgicas, como a bromocriptina, com doses iniciais de 2,5 a 5mg/dia.

4.2 Hipogonadismo hipogonadotrófico

Ocorre em 1 a 2% dos homens inférteis. Divide-se em congênita (síndrome de Kallman) ou adquirida (Tumor hipofisário, pan-hipopituitarismo, uso de esteróides anabolizantes, insuficiência renal crônica).

A apresentação clássica revela baixos níveis séricos de FSH, LH e testosterona. A pesquisa de tumor hipofisário deve ser considerada realizando-se uma radiografia de sela túrcica ou tomografia computadorizada de crânio. O tratamento consiste na reposição de gonadotrofinas, iniciando-se com hCG na dosagem de 1.500 UI IM 3x/semana por 3 meses e depois associando-se hMG na dosagem de 75 UI IM 3x/semana por até 6 meses. Outra forma de tratamento é a administração pulsátil de análogos de GnRH com bomba de infusão, trata-se de esquema terapêutico mais fisiológico entretanto de alto custo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aafjes, J., VanDer Vijer, J. and Brugman, F. (1983) Double blind cross-over treatment with mesterolone and placebo of subfertile men. Value of testicular biopsy. *Andrologia*, 15, 531-535.

2. Acosta, A.A., Khalifa, E. and Oehninger, S. (1992) Pure human follicle-stimulating hormone has a role in the treatment of severe male infertility by assisted reproduction, Norfolk's total experience. *Hum. Reprod.*, 7, 1067-1072.
3. Ainmelk, Y., Belisle, S., Kandlaft, N. et al. (1982) Bromocriptine therapy in oligozoospermic infertile men. *Arch. Androl.*, 8, 135-141.
4. Baker, G., Brindsen, P., Jouannet, P. et al. (1992) Treatment of severe male infertility with pure follicle stimulating hormone (FSH): the need for a properly controlled multicentre trial. *Hum. Reprod.*, 8, 500-501.
5. Comhaire, F., Schoonjans, F., Abdelmassih, R. et al. (1995) Does treatment with testosterone undecanoate improve the in-vitro fertilizing capacity of spermatozoa in patients with idiopathic testicular failure. *Hum. Reprod.*, 10, 2600-2602.
6. Dawson, E.B., Harris, W.A., Teter, M.C. and Powell, L.C. (1992) Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil. Steril.*, 58, 1034-1039.
7. Gerris, J., Comhaire, F., Hellemans, P. et al. (1991) Placebo controlled trial of high dose Mesterolone treatment of male infertility. *Fertil. Steril.*, 55, 603-607.
8. Glatthaar, C., Donald, R., Smith, R. and McRae, C. (1980) Pituitary function in normoprolactinaemic infertile men receiving bromocriptine. *Clin. Endocrinol.*, 13, 455-459.
9. Glezerman, M., Lunenfeld, E., Potashnik, G. et al. (1993) Efficacy of kallikrein in the treatment of oligozoospermia and asthenozoospermia: a double-blind trial. *Fertil. Steril.*, 60, 1052-1056.
10. Hovatta, O., Koskimies, I., Ranta, T. et al. (1979) Bromocriptine treatment of oligozoospermia: a double blind study. *Clin. Endocrinol.*, 13, 455-459.
11. Izzo, P., Canale, D., Bianchi, B. et al. (1984) The treatment of male subfertility with kallikrein. *Andrologia*, 16, 156-161.
12. Kamischke, A. and Nieschlag, E. (1998) Conventional treatments of male infertility in the age of evidence-based andrology. *Hum. Reprod.* 13 (Supp.1), 62-75.
13. Kamischke, A., Behre, H.M., Bergmann, M. et al. (1998) Recombinant human FSH for treatment of male idiopathic infertility: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Human Reprod.*, 13, 596-603.
14. Keck, C., Behre, H.M., Jockenhövel, F. and Nieschlag, E. (1994) Ineffectiveness of kallikrein in treatment of idiopathic male infertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hum. Reprod.*, 9, 325-329.
15. Kessopoulou, E., Pwers, H.J., Sharma, K.K. et al. (1995) A double blind randomized placebo controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertil. Steril.*, 64, 825-831.

16. Knuth, U.A., Hönlgl, W., Bals-Pratsch, M. et al. (1987) Treatment of severe olizoospermia with HCG/HMG. A placebo-controlled double-blind trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 65, 1081-1087.
17. Lenzi, A., Culasso, F. Gandini, L. et al. (1993) Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum. Reprod.*, 8, 1657-1662.
18. O'Donovan, P.A., Vandekerckhove, P., Lilford, R.J. and Hughes, E. (1993) Treatment of male infertility: is it effective? Review and meta-analysis of published randomized controlled trials. *Hum. Reprod.*, 8, 1209-1222.
19. Pusch, H. (1989) Oral treatment with of oligozoospermia with testosterone-undecanoate: results of a double blind study. *Arch. Androl.*, 2, 479-486.
20. Ronnberg, L. (1980) The effect of clomiphene citrate on different sperm parameters and serum hormone levels in preselected infertile men: a controlled double blind study. *Int. J. Androl.*, 3, 479-486.
21. Schill, W.B. (1978) Kallikrein im Doppelblindversuch bei idiopathischer Infertilität. *Hautarzt*, 28, 308-312.
22. Schill, W.B. (1986) Medical treatment of male infertility. In: Insler, V. and Lunenfeld, B. (eds.) *Infertility: Male and Female*. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 533-573.
23. Scottish Infertility Group (SIG) (1982) The effect of clomiphene citrate and vitamin C for male infertility. *Br. J. Urol.*, 54, 780-784.
24. Scottish Infertility Group (SIG) (1984) Randomized trial of mesterolone versus vitamin C for male infertility. *Br. J. Urol.*, 56, 740-744.
25. Simoni, M. and Nieschlag, E. (1995) FSH in therapy: physiological basis, new preparations and clinical use. *Reprod. Med. Rev.*, 4, 163-177.
26. Suleiman, S.A., ElaminAli, M., Zaki, Z.M.S. et al. (1996) Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J. Androl.*, 17, 530-537
27. Török, L. (1985) Treatment of oligozoospermia with tamoxifen (open and controlled studies). *Andrologia*, 17, 497-501.
28. Vandekerckhove, P., Lilford, R. and Hughes, E. (1998 a) The medical treatment of idiopathic oligo/asthenospermia: androgens (mesterolone or testosterone) versus placebo or no treatment. In Lilford, R., Hughes, E. and Vandekerckhove, P. (eds), *Subfertility Module of The Cochrane Database of Systematic Reviews*. In the Cochrane Library. The Cochrane Collaboration, Issue 2. Update Software, Oxford.
29. Vandekerckhove, P., Lilford, R. and Hughes, E. (1998 c) Kinin enhancing drugs for male infertility. In Lilford, R., Hughes, E. and Vandekerckhove, P. (eds), *Subfertility Module of The Cochrane Database of Systematic Reviews*. In the Cochrane Library. The Cochrane Collaboration, Issue 1. Update Software, Oxford.

30. World Health Organization (WHO) Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction, Task Force on the Prevention and Management of Infertility (1992b) A double-blind trial of clomiphene citrate for the treatment of idiopathic male infertility. *Int. J. Androl.*, 15, 299-307.

TECNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA NA INFERTILIDADE MASCULINA

Lídio Jair Ribas Centa

As técnicas de reprodução assistida são realizadas rotineiramente nos centros de reprodução humana quando as outras tentativas terapêuticas (tratamento clínico ou cirúrgico) não obtiveram sucesso. Passa-se a tratar os gametas; espermatozóides e oócitos “in vitro” para a obtenção da gravidez.

As indicações para a TRA para o fator masculino são: falha no tratamento médico andrológico, ISCA, presença de moderado ou alto grau de anomalia espermática, anormalidade da função espermática diagnosticado por testes avançados em RH (reação acrossômica, HZA)

As técnicas de reprodução assistida utilizadas para o fator masculino são: inseminação artificial intra uterina (IIU) , FIV convencional (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI).

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

É frequentemente utilizada como método de tratamento de infertilidade conjugal, considerada uma técnica intermediária entre as de baixa e as de alta complexibilidade, como FIV com ou sem ICSI.

A inseminação artificial pode ser com sêmen do marido (homóloga) ou de doador (heteróloga).

A inseminação artificial conceitua-se com a deposição do gametas masculinos no trato reprodutor feminino com um todo.

O relato do primeiro caso de sucesso como a realização da inseminação artificial foi o do inglês Sims no final do século XVIII que, para solucionar a infertilidade do casal cujo um indivíduo era portador de hipospádia, realizou a inseminação intra vaginal do sêmen.

Indicações da inseminação artificial:

O fator masculino apresenta indicação em pacientes que apresentam alterações na qualidade espermática (oligo, asteno ou oligoastenozoospermia, azoospermia). Também é indicada nos pacientes que fizeram criopreservação de sêmen pré quimioterapia, radioterapia ou pré vasectomia. Outras indicações raras seriam os portadores de disfunção sexual (erétil ou ejaculatória) ou fatores mecânicos (hipospádia , doença de Peyronie, curvatura peniana congênita). Incluem-se nas indicações a infertilidade sem causa aparente, endometriose, fator peritoneal, fator ovulatório , fator imunológico e os casos direcionados à fertilização, onde o ovário apresentou um recrutamento pobre, com 2 ou três folículos.

Fatores que influenciam nos resultados de IA

Alguns requisitos devem ser observados para o sucesso da inseminação:

Avaliação completa do fator feminino: podendo chegar inclusive à laparoscopia

Estimulação ovariana: é sempre realizada. Deve ser realizada para se conseguir um recrutamento ovariano baixo, pois no caso de mais de 4 folículos já se torna uma contra indicação para a mesma. Vários esquemas são utilizados, como com citrato de clomifeno, uFSH, rFSH, uLH ou rLH.

Preparo de sêmen: é fundamental para a realização da inseminação artificial. Realiza-se sempre a técnica de inseminação artificial intra uterina (IIU) e para isto necessita-se do preparo prévio do sêmen (swim up, gradiente descontínuo coloidal, sperm wash). Para parâmetro mínimo devemos considerar um número de 5 milhões de espermatozóides móveis; > 50% formas móveis ou 25% categoria **a** e critério de Kruger acima de 4%.

Técnica de inseminação: intra interina (IIU).

Uma questão de controvérsia é o número de inseminações no mesmo ciclo: uma ou mais? Estudos recentes demonstraram não haver diferença quando se utiliza mais de uma, portanto optamos por uma só inseminação com controle folicular através de ultrassonografia seriada, após estimulação ovariana e 36 horas após administração de HMG. Resultados: as taxas de gravidez variam de acordo com a sua indicação. Os melhores resultados são para o fator cervical ($\pm 25\%$) e o pior é o fator masculino, com $\pm 6\%$. Quanto ao número de ciclos também há controvérsia, variando de 3 a 12 meses. Nós utilizamos no máximo 4 tentativas antes de partir para outra técnica mais complexa (FIV).

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN DE DOADORES.

A inseminação artificial com sêmen de banco pode ser indicada nos casos de : azoospermia irreversível, incompatibilidade ABO, isosensibilização Rh, alterações genéticas que interfiram na progênie, disfunção ejaculatória, falha em técnicas de reprodução assistida, DST incurável, mulher solteira.

Apesar de que a introdução da técnica da injeção intracitoplasmática tenha diminuído a sua indicação, ainda é a solução para aqueles casais que não conseguiram a gravidez após esgotar-se todas as possibilidades com técnicas de reprodução assistida.

A inseminação artificial com sêmen no Brasil segue à normatização do CFM, conforme resolução nº 1358, 1992. O funcionamento segue as normas estabelecidas pela RDC 33, da ANVISA.

As taxas de gravidez na inseminação com sêmen doador variam de 16% a 20% por ciclo, a taxa cumulativa por 6 ciclos em até 70%.

COMPLICAÇÕES

As complicações da IIU são raras, menores que 2%. As principais são:

- Síndrome do hiperestímulo ovariano
- Gestação múltiplas

- Abortamento
- Infecção
- Gravidez ectópica

FERTILIZAÇÃO "IN VITRO"

A fertilização "in vitro" tem a sua indicação quando houver falha nas tentativas de inseminação artificial ou caso o paciente não apresente quantidade espermática suficiente para uma inseminação artificial.

Indicação:

- Falha em 3 ciclos de IIU
- Alterações seminais com número inferior a 5 milhões de espermatozoides recuperados
- Motilidade categoria **a** menor que 25% critério de Kruger abaixo de 4% e número de espermatozoides entre 1 e 5 milhões.

O procedimento para fertilização "in vitro" segue os protocolos existentes quanto ao estímulo ovariano, captura oocitária fertilização extra corpórea e transferência dos embriões. Todos os passos têm fundamental importância.

As taxas de gravidez clínica variam de 20% a 40% por ciclo com taxa cumulativa de 70% em 4 ciclos.

A taxa de gravidez segundo a Rede Latino Americana de Reprodução Assistida é de 18% (2003).

INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES - ICSI

A técnica da injeção intracitoplasmática teve seus resultados aceitáveis a partir dos trabalhos do grupo belga (Palermo, Van Steirteghem), principalmente em oligo ou oligoastenozoospermia de causa idiopática. A princípio, teve o intuito de resolver casos graves de infertilidade e esterilidade masculina. No entanto, principalmente na América Latina, é uma técnica que está sendo empregada sistematicamente em todos os procedimentos de fertilização "in vitro".

Indicações:

- Azoospermias obstrutivas como: agenesia bilateral de ductos deferentes, obstrução intratesticular ou epididimária, vasectomia ou insucesso na reversão de vasectomia.
- Falhas da fertilização "in vitro" (fertilização < 30% dos oócitos inseminados na FIV)
- Azoospermias não obstrutivas (falência testicular), inclusive com FSH elevado.
- Globozoospermia
- Síndrome de imotilidade ciliar (síndrome de Kartagener)

- Diagnóstico genético pré-implantacional
- Utilização de espermatozoides do testículo ou epidídimo obtidos por punção ou extração cirúrgica (PESA, MESA, TESA).

As taxas de gravidez clínica variam de 40% a 60% por ciclo com taxa cumulativa em 4 ciclos, de 70%.

A taxa de gravidez segundo a Rede Latino Americana de Reprodução Assistida é de 50% (2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Arq. Cons. Region. Méd. do PR. 10 (37): 34-36, 1993.
- 2- Borges Jr E, Mori MM. Reprodução Assistida e Infertilidade Masculina, in: Infertilidade Masculina - I Consenso Brasileiro. São Paulo: BG Cultural, 1999
- 3- Centa, LJR. Fator Masculino. Tratado de Ginecologia da FEBRASGO. Vol.1, Rio de Janeiro, Revinter, 2000
- 4- Centa LJR, Schuffner AG. Criopreservação em Reprodução Humana. In: Piazza, J.M. Ovário - Fisiologia e Fisiopatologia. Rio de Janeiro: Revinter, 2004; 20: 177-186
- 5- Legislação em Vigilância Sanitária. RDC 33, 2006, a partir de www.anvisa.gov.br.
- 6- Rede Latinoamericana de Reproducción Assistida. Manual de Procedimientos Laboratorio de Reproducción Assistida. Santiago, Chile, 1998.
- 7- Schuffner A, Morshcedi M, Oehninger S. Criopreservation of fractional, highly motile human spermatozoa: effect on membrane phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. Hum. Reprod. , 2001
- 8- Schuffner A, Stockler S, Costa S, Centa L. Long-term cryopreserved semen results in a live birth 12 years later. J Urol 2004; 171: 358.

PREPARO DO SÊMEN EM LABORATÓRIO PARA TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

Lidio Jair Ribas Centa

Todo serviço de Reprodução Assistida deve contar com um laboratório capacitado para trabalhar no beneficiamento dos espermatozoides para serem utilizadas nas diferentes técnicas de reprodução assistida. Além disso, o laboratório deve também dispor de recursos para congelamento de gametas.

A seguir são descritas as principais técnicas utilizadas num laboratório de Reprodução Assistida.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Indicada quando o número de espermatozoides móveis recuperados após capacitação for superior a 5 milhões.

Obtenção das amostras:

- a) Sêmen fresco: obtido for masturbação, após um período de 2 a 5 dias de abstinência sexual
- b) Sêmen criopreservado

Capacitação dos espermatozoides

As técnicas mais utilizadas para a capacitação dos espermatozoides são:

- 1) "Swin up"
- 2) Gradiente descontínuo coloidal
- 3) "Sperm wash"

"Sperm Wash"

Utilizada quando o sêmen for criopreservado

- 1 - Em um tubo de 15 ml colocar 1 ml de HTF + 15% SSS e 1 ml de sêmen
- 2 - Homogeneizar bem
- 3 - Centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos
- 4 - Desprezar o sobrenadante com auxílio de uma pipeta
- 5 - Adicionar 1 ml de HTF + 15% SSS e centrifugar novamente
- 6 - Desprezar o sobrenadante
- 7 - Adicionar 0,5 ml de HTF + 15% SSS determinar a concentração e motilidade finais.

Técnica do swim up

Utilizada quando se tem uma amostra de sêmen normal

- Determinar a contagem e motilidade dos espermatozóides
- Em câmara de fluxo laminar colocar 0,5 ml de sêmen e adicionar 1 ml de HTF modificado suplementado com 7,5 % de SSS em tubos cônicos de 15 ml, com tampa de rosca. Homogeneizar levemente e centrifugar por 10 minutos a 3000 G (1000 rpm).
- Retirar e descartar o sobrenadante.
- Adicionar ao sedimento 0,5 ml de HTF 7,5 % (suplementada com 7,5 % de SSS) cuidadosamente pelas paredes do tubo.
- Incubar por 1 hora à 37° C com 5% CO₂, deixando os tubos inclinados num ângulo de 45 ° e a tampa frouxa
- Recolher os sobrenadantes e concentrá-los num volume de 0,5 ml centrifugando-os.
- Usar uma gota para determinar a concentração e motilidade.
- Deixar o material na incubadora até o momento da inseminação.

Técnica de gradiente descontínuo de densidade (Isolate - Irvine Scientific; Sperm Grad - IVF Science)

Utilizada para amostras normais, principalmente quando se tem um número aumentado de leucócitos; em amostras com oligo e/ou asteno e ou teratozoospermia leve e moderada e em amostras de sêmen criopreservadas.

- Determinar a concentração e motilidades espermáticas.
- Em câmara de fluxo laminar, colocar em tubo cônico de 15 ml 1 ml de Isolate Lower layer (80%) e sobre esta colocar 1 ml de Isolate Upper layer (40%). A seguir depositar, no máximo, 2 ml de sêmen sobre a última camada de Isolate, tendo cuidado de não misturar as camadas.
- Centrifugar por 15 minutos à 300 G (1000 rpm).
- Retirar as camadas de sêmen e a camada superior do Isolate.
- Colocar aproximadamente 5 ml de Hapes 7,5 % para lavar e centrifugar por 10 minutos à 300G
- Repetir a lavagem do material e suspender o sedimento em 0,5 ml de HTF 7,5 %
- Determinar a concentração e motilidade espermáticas
- Deixar o material na incubadora até o momento da inseminação.

FIV

Indicada quando após capacitação obtém-se menos que 5 milhões de espermatozóides móveis e morfologia superior à 4% no critério estrito de Kruger.

Amostras:

- 1) Sêmen fresco
- 2) Sêmen criopreservado

Técnicas de capacitação dos espermatozóides:

Swin Up
Gradiente Descontínuo Coloidal

Swin up

Realizada em amostras normais. Técnica já descrita para inseminação artificial.

Gradiente descontínuo coloidal

Realizada em amostras normais: gradientes de 1,0 ml cada.

Em amostras oligo e/ou asteno e/ou teratozoospermicas leves a moderadas: gradientes de 0,5 ml cada.

Técnica já descrita para inseminação artificial.

ICSI

Indicada quando após capacitação obtém-se menos que 2 milhões de espermatozoides móveis e morfologia inferior ou igual a 4% no critério estrito de Kruger.

Amostras:

- 3) Sêmen fresco
- 4) Sêmen criopreservado
- 5) Espermatozoides obtidos do epidídimo ou testículo

Técnicas de capacitação dos espermatozoides

6) Gradiente descontínuo coloidal

- 7) Gradiente de 0,5 ml cada em amostras oligo e/ou asteno e/ou teratozoospermicas leve e moderada, ou sêmen criopreservado.
- 8) Gradiente de 0,3 ml cada: em pacientes com fator masculino severo, sêmen criopreservado ou espermatozoides obtidos do epidídimo e/ou testículo

9) "Sperm wash"

Pacientes com fator masculino severo

Sêmen criopreservado

Espermatozoides do epidídimo e/ou testículo

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

Utilizada para pacientes que vão se submeter a radio ou quimioterapia, doadores de sêmen ou pacientes em tratamento com técnicas de reprodução assistida.

- Após liquefação do sêmen, anotar o volume, a concentração e a motilidade dos espermatozoides
- Adicionar, lentamente, o sêmen ao meio crioprotetor (Freezing médium - Test Yolk Buffer with glycerol, Irvine) em proporções iguais, homogeneizando bem a mistura.
 - 1) Deixar à temperatura de 4° C por 1 hora
 - 2) Identificar as palhetas com o nome do paciente e data, utilizando caneta própria para criopreservação
 - 3) Homogeneizar bem e preencher as palhetas de 0,5 ml, deixando um espaço de 0,5 cm à 1 cm antes do ponto selante
 - 4) Selar a extremidade com massa selante, com seladora, com vedantes de polipropileno ou esferas metálicas
- Colocar as palhetas horizontalmente sobre um suporte metálico adaptado numa caixa de isopor contendo nitrogênio líquido, deixando-as por 20 minutos no vapor para congelar. A distância do suporte metálico e o nitrogênio deve ser de 10 cm.
- Após este tempo, mergulhar as palhetas em nitrogênio líquido, transferi-las para as racks identificadas e armazená-las em container de nitrogênio líquido.

Descongelção

- Retirar palhetas ou frascos do N₂ líquido
- Colocar em banho-maria 37°C por 5 minutos (1 minuto para cada 100 µl da suspensão congelada).
- Avaliação da qualidade espermática

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Ferriani RA, Navarro PAA. Protocolos de Conduas em Infertilidade Conjugal. São Paulo, Conexão Brasil, 2004
- 2 Infertilidade Masculina, I Consenso Brasileiro. Campos de Jordão, 1999.
- 3 Kell, Brooks A & Webster, Bobby W; CRC Handbook of the Laboratory Diagnosis on Treatment of Infertility. Boston, 1990.
- 4 Mortimer, D PhD. Pratical Laboratory Andrology. Oxford University Press, 1994.
- 5 Neves PA, Netto NRJ. Infertilidade Masculina. Atheneu, 2002.
- 6 Waart JV, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structures literature review. In: Human Reproduction Update, Vol. 7, nº 5 pp. 495-500, 2001
- 7 WHO, Laboratory Manual for the examination of human sêmen and sêmen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, 1999