

Publicações que desenvolvem a *humanidade*



Redação, tradução e revisão
Padronização e normatização
Projeto gráfico e diagramação
Impressão, acabamento e distribuição
Sistema de submissão on-line



Especializada em revistas
técnicas e científicas
www.zeppelini.com.br
zeppelini@zeppelini.com.br
(11) 2978-6686

Reprodução & Climatério

Volume 23 • Número 4
Outubro/Dezembro 2008

Sociedade Brasileira de Reprodução Humana
Sociedade Brasileira do Climatério
Sociedade Brasileira de Ginecologia Endócrina



Uma das coisas mais bonitas
da vida é fazê-la acontecer.

A fecundação é uma dádiva.
E embora nem sempre possa ser
de forma natural, é um momento
onde afeto e responsabilidade são
os principais fatores. A Meizler
Biopharma já contribuiu para tornar
esse sonho possível a milhares de
casais por meio de suas linhas de
reprodução humana. E isso inclui
não apenas os medicamentos, mas
todo o suporte necessário a algo
tão importante como a formação
de uma nova vida.

expanding

www.meizler.com.br

SAC: 0800 166 613

Matriz / Headquarter
Al. Juruá, 149 - Alphaville
Barueri, SP - 06455-901 - Brasil
Tel (+55 -11) 4195.6613

Filial / Branch
Av. Vera Cruz, 463 - Jardim Guanabara
Goiânia, GO - 74675-830 - Brasil
Tel (+55 -62) 3207.2800


Meizler
BIOPHARMA S/A

Reprodução & Climatério

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

Editor

Mario Cavagna

Editores Associados

Eduardo Pandolfi Passos

João Sabino Pinho Neto

Paulo Spinola

Editores Anteriores

Araken Irerê Pinto

Dirceu Mendes Pereira

Edmund Chada Baracat

Nelson Vitiello

Nilson Donadio

Nilson Roberto de Melo

Newton Eduardo Busso

Marcos Felipe Silva de Sá

Rui Alberto Ferriani

Conselho Editorial

Aarão Mendes Pinto Neto, Campinas, SP

Agnaldo Pereira Cedenho, São Paulo, SP

Alberto Soares Pereira Filho, Rio de Janeiro, RJ

Alkindar Soares, Rio de Janeiro, RJ

Almir Antonio Urbanetz, Curitiba, PR

Álvaro Petracco, Porto Alegre, RS

Anaglória Pontes, Botucatu, SP

Angela Maggio da Fonseca, São Paulo, SP

Aroldo Fernando Camargos, Belo Horizonte, MG

Artur Dzik, São Paulo, SP

César Eduardo Fernandes, São Paulo, SP

Edmund Chada Baracat, São Paulo, SP

Eduardo Leme Alves da Motta, São Paulo, SP

Elsimar Metzner Coutinho, Salvador, BA

Fernando Freitas, Porto Alegre, RS

Gilberto Costa Freitas, São Paulo, SP

Hans Wolfgang Halbe, São Paulo, SP

Hugo Maia Filho, Salvador, BA

João Carlos Mantese, São Paulo, SP

José Carlos de Lima, Recife, PE

José Mendes Aldrighi, São Paulo, SP

Juliano Augusto Brum Scheffer, Belo Horizonte, MG

Lucas Vianna Machado, Belo Horizonte, MG

Marco Aurélio Albernaz, Goiânia, GO

Marcos Felipe Silva de Sá, Ribeirão Preto, SP

Maria Celeste Osório Wender, Porto Alegre, RS

Maria Yolanda Makuch - Campinas - SP

Marta Finotti, Goiânia, GO

Maurício Simões Abrão, São Paulo, SP

Newton Eduardo Busso, São Paulo, SP

Nilson Roberto de Melo, São Paulo, SP

Polimara Spritzer, Porto Alegre, RS

Ricardo Baruffi, Ribeirão Preto, SP

Ricardo Melo Marinho, Belo Horizonte, MG

Rogério Bonassi Machado, São Paulo, SP

Ronald Bossemeyer, Santa Maria, RS

Rosaly Rulli Costa, Brasília, DF

Rui Alberto Ferriani, Ribeirão Preto, SP

Sebastião Freitas de Medeiros, Cuiabá, MT

Selmo Geber, Belo Horizonte, MG

Sonia Maria Rolim Rosa Lima, São Paulo, SP

Wagner José Gonçalves, São Paulo, SP

Conselho Editorial Internacional

Cesare Aragona, Roma, Italia

Gian Benedetto Melis, Cagliari, Italia

Paolo E. Levi Setti, Milão, Italia

Diagramação, revisão e projeto gráfico

Zeppelini Editorial Ltda.

Rua Dr. César, 530 - Sala 1308 - Santana - São Paulo/SP

Tel.(11)2978-6686

www.zeppelini.com.br



SOCIEDADE BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO HUMANA
SBRH

Sociedade Brasileira de Reprodução Humana

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

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

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

Diretoria Biênio 2007-2008

Presidente

Dirceu Henrique Mendes Pereira

1º Vice-Presidente

Sebastião de Freitas Medeiros

2º Vice-Presidente

Ricardo Mello Marinho

Secretário Executivo

Artur Dzik

Secretário Adjunto

Claudio Barros Leal

Tesoureira - Geral

Nilka Fernandes Donadio

Tesoureiro - Adjunto

Marcelino Hofmeister Poli

Diretora Científica

Claudete Reggiani

Presidente do Conselho de Delegados

Waldemar Naves do Amaral

Delegados da SBRH — Biênio 2007-2008

AC - Julio Eduardo Gomes Pereira

AL - Fabio Castanheira

AM - Lourivaldo Rodrigues De Sousa

AP - Aljerry Dias do Rego

BA - Karina de Sá Adami Gonçalves

CE - Marcelo Borges Cavalcante

DF - Hitomi Miura Nakagava

ES - Jules Whyte Soares Sousa

GO - Mario Aprobatto

MA - Luciane Maria Oliveira Brito

MG - Tulio Tadeu Marcolini

MS - Alex Bortotto Garcia

MT - Marcia Marly Winck Yamamoto

PA - Nelson Luiz de Oliveira Santos

PB - Ricardo Lucena Ramos

PE - Vilma Guimarães de Mendonça

PI - Joaquim Castelo Branco Barros

PR - Jaime Kulak

RJ - Carlos André Henriques

RN - George Dantas de Azevedo

RO - Marines Rodrigues Santos Cesar

RR - José Antonio Nascimento Filho

RS - Maria Celeste Osorio Wender

SC - Ubiratan Cunha Barbosa

SE - George Hamilton Caldas Silveira

SP - Vilmon de Freitas

TO - Fábio Roberto Ruiz de Moraes

Editorial

137 Câncer de mama e estimulação ovariana

Mario Cavagna

Atualização

139 Endometriose pélvica e síndrome do intestino irritável: atualização

Pelvic endometriosis and irritable bowel syndrome: up-to-date

Márcia Mie Uchimura, Vivian Ferreira Amaral

143 Imunoterapia com linfócitos em perdas gravídicas e falhas de implantação

Lymphocytes immunotherapy for pregnancy loss and implantation failures

Marcelo Borges Cavalcante, Ricardo Barini, Manoel Sarno, Jorge Neumann, Simone Souza

150 Papel atual da histeroscopia diagnóstica no diagnóstico das doenças intrauterinas

Role of hysteroscopic examination in the diagnosis of intrauterine pathology

Ivone Dirk de Sousa Filogônio, Ivete de Ávila

Artigo Original

155 Efeito da terapia hormonal de baixa dose com norgestimato na densidade mamográfica de mulheres na pós-menopausa

Effect of low-dose hormone therapy with norgestimate in mammographic breast density of post-menopausal women

Ana Maria Nogueira Silva, Maria Bethânia da Costa Chein, Luciane Maria Oliveira Brito, Brainerd Bernardes Pinto Bandeira, Sofia Andrade Calderoni, Luiz Gustavo Oliveira Brito, Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

162 Bloqueio da meiose sem aumento da incidência de anomalias meióticas

Blockage of meiosis without increase of meiotic abnormalities incidence

Elisa Melo Ferreira, Alessandra Aparecida Vireque, Paulo Roberto Adona, Rui Alberto Ferriani, Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

170 O uso popular de plantas como emenagogas e abortivas

The use of plants as emmenagogue and abortifacient agents

Tatiana Montanari

176 Apoptose e peroxidação lipídica antes e após criopreservação

Apoptosis and lipid peroxidation before and after cryopreservation

Alessandro Schüffner, Mahmood Morshedi, Sergio Oehninger, Newton Sérgio de Carvalho, Maria Theresa Costa Ramos De Oliveira, Thiago Placido, Almir Antonio Urbanetz

Instruções aos autores

A Revista Reprodução & Climatério publica artigos originais, artigos de atualização, opiniões, breves comunicações, relatos de caso e cartas ao editor (no máximo 500 palavras), na área de Medicina Reprodutiva, Climatério, Ginecologia Endócrina e Sexualidade. São aceitos artigos em português, espanhol ou inglês.

Os originais devem ser encaminhados para a Sociedade Brasileira de Reprodução Humana (SBRH), aos cuidados do editor, exclusivamente por correio eletrônico (sbrh@terra.com.br). Eles devem ser escritos em folha A4, com espaço duplo entre as linhas e margens de 3 cm em páginas numeradas. A fonte a ser utilizada é a Times New Roman, tamanho 12.

Os originais devem ser preparados na seguinte sequência:

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

Resumo: deverá conter, no máximo, 200 palavras e, no caso de artigos originais, apresentar Objetivo, Material e métodos, Resultados, Conclusões e Unitermos. Evitar abreviações e referências bibliográficas. Deverá ser acrescentado um resumo conciso (duas ou três linhas) com as principais conclusões do trabalho, para ser colocado no índice da revista. Para artigos de atualização, comunicações breves, opiniões e relatos de casos, não é necessário que o Resumo seja estruturado.

Abstract: versão fiel do inglês do texto do Resumo, acompanhado de Unitermos.

Texto do trabalho: se for um artigo original, deverá obrigatoriamente conter Introdução, Material e métodos, Resultados, Discussão e Referências bibliográficas; outros tipos de artigo podem apresentar estrutura variável. As abreviações devem ser restritas e sempre definidas na primeira aparição no texto. Eventuais Tabelas deverão ser numeradas em algarismos arábicos, com título explicativo do conteúdo. Não devem ser colocados traços verticais, e os traços horizontais são limitados a um acima da tabela e um ao final. Figuras e Gráficos devem ser limitados ao estritamente necessário e também serão numerados em algarismos arábicos, com legenda explicativa. Tabelas, Figuras e Gráficos devem ser enviados em páginas separadas.

Referências bibliográficas: devem obedecer às normas de Vancouver. Maiores esclarecimentos poderão ser obtidos no site: www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Numere as referências por ordem de entrada no trabalho e use estes números para as citações no texto. Todos os autores devem ser citados, exceto se houver mais de seis, quando os seis primeiros são seguidos pela expressão latina "et al". Observe alguns exemplos de citações:

Artigos em periódicos:

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

Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res.* 2002;935(1-2):40-6.

Volume com suplemento:

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

Livros:

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

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

Material eletrônico:

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-1999 [Internet]. Brasília (DF): INCA; c2003. [citado 2008 Mai 16]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/atlas/docs/represent_espac_UTERO.pdf

Cabar FR, Nomura RMY, Costa LCV, Alves EA, Zugaib M. Cesárea prévia como fator de risco para o descolamento prematuro da placenta. *Rev Bras Ginecol Obstet.* [periódico na Internet]. 2004 Out [citado 2005 Mar 19]; 26(9):[cerca de 15 p.]. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032004000900006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt

Kremer LCM, Caron HN. Anthracycline cardiotoxicity in children [perspective]. *N Engl J Med* [serial on the Internet]. 2004 Jul [cited 2004 Sep 29];351(2):[about 2 p.]. Available from: <http://gateway.ut.ovid.com/gw1/ovidweb.cgi>

Cartas e editoriais:

Kremer J. Yardsticks for successful donor insemination [letter]. *Fertil Steril.* 1991;55:1203-4. *Cancer in South Africa* [editorial]. *S Afr Med J.* 1994;84:15.

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

Câncer de mama e estimulação ovariana

Cerca de 15% dos cânceres de mama acometem mulheres com menos de 40 anos de idade – muitas delas ainda nulíparas e com desejo reprodutivo. Esse motivo vem levando cada vez mais mastologistas e oncologistas a se preocuparem com o futuro reprodutivo de suas pacientes, pois as modernas abordagens cirúrgicas, associadas a tratamentos quimioterápicos e radioterápicos cada vez mais eficientes, implicam uma significativa taxa de cura da neoplasia, ou, pelo menos, um longo período de sobrevida livre de doença. Sabe-se que a quimioterapia, em especial com a utilização de agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, pode levar ao comprometimento reprodutivo devido a uma diminuição da reserva ovariana, pela depleção de folículos primordiais; tal efeito é dependente da idade da mulher, dosagem e tempo de tratamento com o quimioterápico.

Vale salientar que o simples retorno dos ciclos menstruais não significa ausência de comprometimento da função reprodutiva. A Associação Americana de Medicina Reprodutiva recomenda que os médicos informem os pacientes com câncer sobre as opções para a preservação da fertilidade antes do tratamento e afirma que preocupações com respeito ao bem-estar da prole não devem constituir motivo para negar ao paciente com câncer assistência quanto à reprodução. A preservação da fertilidade, nesses casos, pode ser obtida pela criopreservação de tecido ovariano – técnica experimental e com resultados ainda controversos – ou pela criopreservação de oócitos ou embriões – que já apresenta resultados muito mais bem estabelecidos. Com relação a essas últimas técnicas, dois questionamentos costumam ser realizados: em primeiro lugar, o tempo necessário para tais procedimentos levaria a um adiamento da quimioterapia? Além disso, a estimulação ovariana para a obtenção dos oócitos pode promover acentuado aumento nos níveis de estradiol. O que poderia ser deletério para as pacientes, especialmente para aquelas com receptores positivos? No que concerne ao tempo requerido, podemos iniciar a estimulação ovariana mesmo na fase lútea, mediante o emprego concomitante dos antagonistas do GnRH para promover a luteólise, o que faz com que o procedimento completo não dure mais de duas semanas. Dessa forma, a quimioterapia que deve seguir-se à cirurgia não sofreria adiamento importante, pois poderia ser iniciada logo após a captação dos oócitos.

Esse fato foi bem documentado por von Wolff, que apresentou seus resultados no último congresso europeu de reprodução humana, realizado em Barcelona, e já tem sua investigação publicada on-line na conceituada revista *Fertility and Sterility*¹. Quanto à elevação dos níveis de estradiol, a associação de um inibidor da aromatase, o letrozol, ao esquema com FSH, potencializa os efeitos das gonadotropinas e promove níveis de estradiol significativamente mais baixos, por vezes até menores do que aqueles observados em um ciclo menstrual espontâneo².

Embora nós mesmos já tenhamos colocado em cheque, em editorial anterior, o emprego de inibidores da aromatase na indução ovulatória³, por ser de emprego off-label, e, portanto, passível

de questionamentos, reconhecemos que sua utilização em pacientes que não devem ser expostas a altos níveis estrogênicos deve ser encorajada e fortemente recomendada. Dessa forma, acreditamos que a estimulação ovariana em pacientes com câncer de mama que aguardam a quimioterapia após abordagem cirúrgica é um procedimento rápido e seguro, que não atrasa o tratamento oncológico e não expõe a paciente a concentrações de estradiol muito maiores do que ela teria em um ciclo menstrual espontâneo. Temos, portanto, mais um motivo para solicitar aos oncologistas e mastologistas que não se esqueçam de discutir, com as pacientes jovens que tenham desejo reprodutivo, as opções existentes para a preservação da fertilidade pós-quimioterapia.

Mario Cavagna

Referências bibliográficas

1. von Wolff M, Thaler CJ, Frambach T, Zeeb C, Lawrenz B, Popovici RM, et al. Ovarian stimulation to cryopreserve fertilized oocytes in cancer patients can be started in the luteal phase. *Fertil Steril*. 2008. [Epub ahead of print]
2. Azim AA, Costantini-Ferrando M, Oktay K. Safety of fertility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study. *J Clin Oncol*. 2008;26(16):2630-5.
3. Cavagna M. O fim da "era letrozol". *Reprod Clim* 2005;20:3.

Endometriose pélvica e síndrome do intestino irritável: atualização

Pelvic endometriosis and irritable bowel syndrome: up-to-date

Márcia Mie Uchimura¹, Vivian Ferreira Amaral²



A Professora Vivian Ferreira Amaral é professora adjunta de Ginecologia e do Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) e professora adjunta de Ginecologia do Departamento de Tocoginecologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Mestre e doutora em Ginecologia e Obstetrícia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) no Brasil.

Resumo

A endometriose e a síndrome do intestino irritável são moléstias comuns na população feminina. As doenças podem alterar o hábito intestinal, causar dor abdominal e sintomas inespecíficos que dificultam o diagnóstico. Este artigo é uma revisão atualizada das duas doenças e conclui que o diagnóstico de uma delas não deve excluir o da outra, pois eles podem coexistir.

Unitermos: Endometriose; Síndrome do intestino irritável; Dor pélvica.

Abstract

The endometriosis and the irritable bowel syndrome are diseases which usually affect women; they can change the intestinal habit and cause abdominal pain and nonspecific symptoms that hinder the diagnosis. This article is an updated review of both diseases, and it concludes that the diagnosis of one of them should not exclude the other, as they may coexist.

Uniterms: Endometriosis; Irritable bowel syndrome; Pelvic pain.

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) – Curitiba (PR), Brasil.

¹ Acadêmica do curso de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) – Curitiba (PR), Brasil.

² Professora adjunta de Ginecologia e do Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR); professora adjunta de Ginecologia do Departamento de Tocoginecologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Curitiba (PR), Brasil; mestre e doutora em Ginecologia e Obstetrícia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Vivian Ferreira do Amaral – Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (CCBS-PUCPR) – Rua Imaculada Conceição, 1.155 – Prado Velho – CEP 81611-970 – Curitiba/PR – Fone/fax: (41) 3271-1657 – E-mail: v.amaral@pucpr.br

Introdução

A dor abdominal e as alterações do trato digestório são manifestações clínicas muito comuns entre as mulheres e presentes em doenças como a síndrome do intestino irritável (SII) e a endometriose. Porém, há poucos relatos sobre a associação entre as duas enfermidades. Ambas podem ter sintomatologias inespecíficas.

Endometriose

A endometriose é uma doença crônica e recorrente caracterizada por tecido endometrial fora da cavidade uterina. O tecido endometrial, caracterizado por glândulas e/ou estroma¹, pode ser encontrado nos ovários, peritônio, ligamentos útero-sacros, fundo do saco de Douglas². Acomete aproximadamente 10% das mulheres em idade fértil^{1,3}, em caso de dor pélvica, estima-se que a prevalência atinge 82% e se associa à infertilidade, 21%^{1,2}.

As manifestações clínicas mais comuns são: dismenorreia, dispaurenia¹, infertilidade, dor pélvica crônica e, em alguns casos, alteração intestinal e urinária cíclicas⁴. A dismenorreia pode ser progressiva e a dispaurenia pode estar relacionada à presença de nódulos no fundo de saco e raramente ocorre sem cólica menstrual. A dor pélvica é cíclica, difusa e de intensidade variável⁵.

O método padrão-ouro para o diagnóstico é a videolaparoscopia com a visualização do tecido endometrial^{3,4} pois, o quadro clínico é difícil porque simula outras moléstias. Durante a videolaparoscopia, faz-se o estadiamento da doença, que vai prever prognóstico e auxiliar na terapêutica. O estadiamento utilizado é o preconizado pela American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Considera-se o tamanho das lesões, aparência, local de acometimento, presença de implantes de endometriose em outros órgãos e a presença de patologias associadas.

O manejo consiste no controle da sintomatologia e prevenção da progressão da mesma. Pode ser tratada com eficácia com medicação, cirurgia ou ambos¹. Durante a laparoscopia diagnóstica, a excisão cirúrgica da endometriose deve ser a primeira medida em mulheres em idade reprodutiva, desde que seja por equipes treinadas e em casos selecionados^{1,6}, pois melhora a dor³, a qualidade de vida e a fertilidade⁷. O tratamento farmacológico visa inibir o crescimento e atividade do endometrioma e evita a necessidade de tratamento cirúrgico¹. Baseia-se no uso de medicamentos hormonais como: Danazol, análogos do GnRH, progestágenos ou combinados com estrógeno³.

SII

A SII, conhecida também como cólon espástico, colite nervosa, cólon irritável, diarreia nervosa, dispepsia dos cólons, neurose cólica⁸ é um distúrbio motor que se caracteriza por alteração do hábito intestinal, dor abdominal e ausência de patologia orgânica detectável.

É uma doença crônica que atinge cerca de 20% da população ocidental⁹, ocorre com maior frequência em mulheres^{9,10,11}, cerca de duas a três vezes mais do que nos homens^{12,13}.

Os sintomas típicos da SII são desconforto ou dor abdominal, geralmente localizados na porção baixa do abdômen, associados à alteração do hábito intestinal – constipação, diarreia ou alternância de uma e de outra^{10,13,14}. Outros sintomas frequentes são muco nas fezes, urgência retal, distensão abdominal e flatulência. A síndrome é de evolução crônica com amplo espectro de gravidade, que varia de manifestações clínicas leves a muito exuberantes¹⁰.

A dor da SII é variável. Em geral, é difusa, localiza-se no hipogástrio em 25%, no lado direito em 20%, no lado esquerdo em 20% e no epigástrio em 10% dos pacientes¹⁵. Normalmente não se irradia, mas quando intensa pode vir acompanhada de lombalgia. Em casos de espasmo colônico distal, que dificulta a eliminação de gases, favorece a distensão e a dor que pode simular a dor cardíaca sendo aliviada com a eliminação dos flatos. Já a precipitada pelas refeições é aliviada pela evacuação. Raramente a dor acorda o paciente à noite. Podem apresentar sintomas gastrointestinais altos como dispepsia, pirose, náuseas e vômitos. Também pode haver dismenorreia, alteração da frequência urinária, dispareunia, cefaléia tipo enxaqueca¹⁵. É comum relatos de piora dos sintomas durante as fases pré-menstrual e menstrual^{15,16}.

Não há marcador específico para o diagnóstico da SII. O diagnóstico é de exclusão^{9,11,12,15-17}. Alguns critérios podem auxiliar o diagnóstico como Manning^{11,12}, Roma II^{9,10,11,15} e Roma III¹³ (Tabela 1).

A terapêutica do intestino irritável varia de acordo com a necessidade e a clínica da paciente. Varia desde a reeducação alimentar como medicações antidiarreicas, agentes laxativos, antiespasmódicos, antidepressivos, entre outros^{10,16}.

Endometriose e Síndrome do intestino irritável

Semelhanças

Ambas patologias são mais frequentes no sexo feminino, possuem etiopatogenias não muito bem esclarecidas, apresentam

Tabela 1 - Critérios que auxiliam no diagnóstico de SII: Manning, Roma II e Roma III

Critérios de Manning (1978)	Critérios Roma II (1999)	Critérios Roma III (2006)
1. Dor aliviada pela defecação 2. Fezes amolecidas no início do quadro doloroso 3. Evacuação mais frequente no início do quadro doloroso 4. Distensão abdominal visível 5. Passagem de muco 6. Sensação de esvaziamento	Dor ou desconforto por 12 semanas nos últimos 12 meses, associados a pelo menos 2 dos sintomas seguintes: 1. alívio com defecação; 2. fezes amolecidas ou mais frequentes; 3. fezes endurecidas ou menos frequentes. Sintomas que contribuem para o diagnóstico: • frequência anormal (>3 por dia ou <3 por semana); • formato anormal das fezes (grumosa/endurecida ou amolecida/aquosa); • passagem fecal anormal (esforço, urgência ou sensação de esvaziamento incompleto); • passagem de muco; • sensação de gases ou distensão abdominal.	Dor ou desconforto por 3 meses nos últimos 6 meses, associado a pelo menos 2 ou mais sintomas seguintes: 1. melhora com evacuação e/ou; 2. fezes amolecidas ou mais frequentes e/ou; 3. fezes endurecidas ou menos frequentes.

algumas manifestações clínicas em comum e não há padrão de tratamento das mesmas.

Discussão

Na literatura, há um relato de caso que sugere a coexistência das doenças, no qual um diagnóstico prévio de cólon irritável após tratamento cirúrgico de uma oclusão intestinal por endometriose continuou apresentando os sintomas iniciais¹⁸. A literatura aconselha que o médico deve ficar atento à clínica da paciente quanto a sintomas ginecológicos e gastrointestinais^{18,19}.

Para diferenciar estas enfermidades, as características do local da dor, o sangramento durante o ciclo e a exacerbação dos sintomas pelas refeições são fatores a serem investigados^{19,20}. No intestino irritável, a paciente pode apresentar alteração do hábito intestinal relacionado ao ciclo menstrual por aumento de prostaglandinas na fase inicial da menstruação, o que resultaria na contração da musculatura do trato digestivo²⁰. A piora dos sintomas durante a menstruação¹⁶ pode dificultar o diagnóstico de SII e confundir com endometriose, porém sua associação com a evacuação¹¹, alimentação e com o estresse²⁰ definem o quadro como gastrointestinal. Na patologia ginecológica, embora a sintomatologia possa ser similar, há sangramento intermenstrual, exacerbação pré-menstrual da dor e dispaurenia²⁰.

Em um estudo recente entre mulheres com dor pélvica, 30% das pacientes com doenças ginecológicas (endometriose e doença inflamatória pélvica) apresentavam sintomas sugestivos de cólon irritável. Este trabalho argumenta que como a sintomatologia entre as doenças em questão são similares, pela clínica é realmente difícil o médico diferenciá-las.

Se a paciente com a colite nervosa não responder ao tratamento inicial ou se houver sangramento intermenstrual e piora da dor, esses sintomas podem ser considerados sinais de alerta. É sugerido que os gastroenterologistas e os ginecologistas trabalhem em conjunto para adotar melhor conduta quando o diagnóstico ainda é incerto. Na presença de sintomas do trato

digestivo, um ginecologista deve estar atento para possível intestino irritável e mesmo em paciente com dor pélvica não se deve deixar de realizar uma avaliação ginecológica, mesmo estando sem sintomas intestinais^{19,21}.

A investigação de endometriose intestinal é recomendada em caso de pacientes que apresentem sintomas gastrointestinais, dor pélvica crônica, dismenorréia e dispaurenia^{22,23}. O trato gastrointestinal é o local mais acometido pela endometriose após os órgãos pélvicos e o peritônio pélvico. Aproximadamente 20% das mulheres com diagnóstico prévio de SII têm endometriose²⁴ e alguns diagnósticos podem passar despercebidos por falta de preparo do cirurgião, já que a videolaparoscopia é um exame operador dependente²⁵.

Na endometriose intestinal, é representado de 3,8 a 37% dos casos de endometriose²⁶. O tecido ectópico localiza-se com mais frequência no retossigmoides, íleo, ceco e apêndice^{23,24,27}. Cerca de 35% das pacientes com acometimento intestinal são assintomáticas^{24,26} e a prevalência das sintomáticas é de 2%²⁴. A dor está relacionada com a profundidade e aderência dos anexos^{23,24}. Grandes nódulos endometriais causam sintomas gastrointestinais que podem simular a SII. Porém, na endometriose a evacuação não alivia os sintomas²⁶. O envolvimento do trato digestivo pode mimetizar várias outras desordens, como apendicite, diverticulite, aderência, colecistite aguda, doença de Crohn^{25,26} e câncer colorretal²⁷. A endometriose intestinal pode levar à estenose ou até obstrução da alça intestinal^{23,25}.

Conclusões

Em virtude da semelhança clínica entre a SII e endometriose, principalmente quando se considera a sintomatologia gastrointestinal das pacientes, o médico deve ficar atento à possibilidade de diagnosticar uma destas doenças, sem excluir a outra precocemente, já que elas podem coexistir. Nos casos de dúvida, o ginecologista e o gastroenterologista podem trabalhar em conjunto até que o diagnóstico seja definido.

Referências bibliográficas

1. Mirkin D, Murphy-Barron C, Iwasaki K. Actuarial analysis of private payer administrative claims data for women with endometriosis. *J Manag Care Pharm*. 2007;13(3):262-72.
2. Mounsey AL, Wilgus A, Slawson DC. Diagnosis and management of endometriosis. *Am Fam Physician*. 2006;74(4):594-600.
3. Crosignani P, Olive D, Bergqvist A, Luciano A. Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Human Reprod Update*. 2006;12(2):179-89.
4. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*. 2005;20(10):2698-704.
5. Camargos AF, Lemos CNCD. Endometriose. In: Halbe HW. *Tratado de Ginecologia*. 3. ed. São Paulo: Roca; 2000. p. 1324-34.
6. Seid VE, Imperiale AR, Araújo SE, Campos FGCM, Sousa Júnior AHS, Kiss DR, et al. A videolaparoscopia no diagnóstico e tratamento de obstrução intestinal. *Rev Bras Colo-proctol*. 2007;27(2):228-34.
7. Farquhar C. Endometriosis. *BMJ*. 2007;334(7587):249-53.
8. Vilela MP. Síndrome do cólon irritable. In: Mincis M. *Gastroenterologia e hepatologia: diagnóstico e tratamento*. 3. ed. São Paulo: Lemos Editorial; 2002. p. 417-21.
9. Zaman A. Irritable bowel syndrome. *Clinical cornerstone: Lower GI diseases*. 2002;4(4):22-33.
10. Passos MCF. Síndrome do intestino irritável: ênfase ao tratamento. *Jornal brasileiro de Gastroenterologia*. 2006;6(1):12-18.
11. Catapani WR. Conceitos atuais em síndrome do intestino irritável. *Arq Méd ABC*. 2004;29(1):19-21.
12. Matheis A, Martens U, Kruse J, Enck P. Irritable bowel syndrome and chronic pelvic pain: a singular or two different clinical syndrome? *World J Gastroenterol*. 2007;13(25):3446-55.
13. Spinelli A. Irritable bowel syndrome. *Clin Drug Investig*. 2007;27(1):15-33.
14. Hammer J, Talley NJ. Value of different diagnostic criteria for the irritable bowel syndrome among men and women. *J Clin Gastroenterol*. 2008;42(2):160-6.
15. Owyang C. Síndrome do intestino irritável. In: Kasper DL, et al. *Harrison Medicina Interna*. 16 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda; 2006. p. 1877-81.
16. Williams RE, Hartmann KE, Sandler RS, Miller WC, Savitz LA, Steege JF. Recognition and treatment of irritable bowel syndrome among women with chronic pelvic pain. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192(3):761-7.
17. Barclay S. Um consenso nacional sobre a síndrome do intestino irritável. In: *Gastroenterologia no Brasil II: subsídios para sua história até o ano 2001*. 1. Ed. São Paulo: Lemos Editorial; 2002. p. 269-91.
18. Lea R, Whorwell PJ. Irritable bowel syndrome or endometriosis, or both? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003;15(10):1131-3.
19. Amaral VF, Sepulcri RP. Endometriosis and irritable bowel syndrome: a prospective study. In: *IX World Congress on Endometriosis, 2005, Maastricht*. *European Journal of Obstetric and Gynecology and Reproductive Biology*. 2005;123:48.
20. Kumar D. Irritable bowel syndrome, chronic pelvic inflammatory disease and endometriosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004;16(12):1251-2.
21. Lea R, Bancroft K, Whorwell PJ. Irritable bowel syndrome, chronic pelvic inflammatory disease and endometriosis: a comparison of symptomatology. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004;16(12):1269-72.
22. Ferrero S, Abbamonte LH, Remorgida V, Ragni N. Irritable bowel syndrome and endometriosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005;17(6):687.
23. Bianchi A, Pulido L, Espín F, Hidalgo LA, Heredia A, Fantova MJ, et al. Endometriosis intestinal. Estado actual. *Cir Esp*. 2007;81(4):170-6.
24. Perry R. Endometriosis: a gynaecological and colorectal disease. *Journal of the New Zealand Medical Association*. 2005 Jun 24 [cited 2007 Aug 10];118(1217). Available from: <http://www.nzma.org.nz/journal/118-1217/1535>.
25. Chaer R, Sam II A, Teresi M, Cintron J. Endometriosis-induced acute small and large bowel obstruction: rare clinical entities. *Journal of the New Zealand Medical Association*. 2005 Jun 24 [cited 2007 Oct 10]; 118(1217). Available from: <http://www.nzma.org.nz/journal/118-1217/1521>.
26. Remorgida V, Ferrero S, Fulcheri E, Ragni N, Martin DC. Bowel endometriosis: presentation, diagnosis, and treatment. *Obstet Gynecol Surv*. 2007;62(7):461-70.
27. Garcia A, Spadoni Neto B, Garcia VCS, Arruda P, Garcia DL. Endometriose colônica simulando câncer colorretal: relato de dois casos. *Rev Bras Colo-proctol*. 2006; 26(3):316-20.

Recebido em: 21/08/2008

Aprovado para publicação: 10/11/2008

Imunoterapia com linfócitos em perdas gravídicas e falhas de implantação

Lymphocytes immunotherapy for pregnancy loss and implantation failures

Marcelo Borges Cavalcante¹, Ricardo Barini², Manoel Sarno³, Jorge Neumann⁴, Simone Souza⁵



O **Doutor Marcelo Borges Cavalcante** é médico formado pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Fez residência médica em Ginecologia e Obstetrícia na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) de 1998 a 1999. É mestre em Ginecologia e Obstetrícia pela UFC e tem Fellowship em Imunologia da Reprodução pela Finch University of Health Sciences na The Chicago Medical School.

Resumo

A imunização com linfócitos para tratamento de casais com abortos de repetição de causa aloimune foi descrita pela primeira vez no início dos anos 1980. Formação de anticorpos contra linfócitos do parceiro, redução da citotoxicidade das células natural killer e equilíbrio do perfil de interleucinas com predomínio T-Helper 2 são alguns dos mecanismos imunológicos envolvidos em uma gestação normal. Existem diferentes protocolos de imunoterapia com linfócitos, com variações de resultados gestacionais. Apesar de uma revisão sistemática da biblioteca Cochrane questionar a eficácia da imunoterapia com linfócitos, diversos centros no mundo permanecem indicando o seu uso, com resultados significantes, desde que sejam obedecidos os princípios básicos: critérios rigorosos de seleção de casais, controle do tratamento com prova cruzada, imunizações pré-gestacional e durante o primeiro trimestre, utilização da via intradérmica e menor intervalo de tempo possível entre coleta do sangue e aplicação da vacina. Os resultados satisfatórios no tratamento de casais com aborto recorrente deram início à aplicação da imunoterapia com linfócitos em casais com falhas repetidas de fertilizações *in vitro*, desde que sejam obedecidos protocolos de seleção de casais.

Unitermos: Aborto; Transfusão de linfócitos; Imunoterapia.

Abstract

The use of lymphocytes immunization for the treatment of couples with recurrent abortions was described for the first time at the beginning of 1980. Formation of antibodies against lymphocytes of the partner, reduced cytotoxicity of natural killer cells and interleukin equilibrium profile with a predominance of T-helper 2 are some of the immunological mechanisms involved in a normal pregnancy. There are different protocols of lymphocytes immunotherapy and gestation results. Cochrane library questions the effectiveness of lymphocytes immunization therapy. Despite of this, innumerous centers in the world indicate its use, with significant good results, since basic principles are obeyed: rigorous criteria for couple selection, treatment control with cross match test, immunizations before and during the first trimester of gestation, use of the intradermal injections and short intervals between blood collection, immunization production and injection. Lymphocytes immunotherapy is also being used in couples with repeated *in vitro* fertilization failures but protocols for couple selection must be obeyed for comparative results with literature.

Uniterms: Abortion; Lymphocytes transfusion; Immunotherapy.

¹ Médico assistente do Núcleo de Imunologia da Reprodução Humana (Nidarh); doutorando em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará (UFC) – Fortaleza (CE), Brasil.

² Professor da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp); médico assistente do Núcleo de Imunologia da Reprodução Humana (Nidarh) – Campinas (SP), Brasil.

³ Médico assistente do Núcleo de Imunologia da Reprodução Humana (Nidarh); professor da Universidade Federal da Bahia (UFBA) – Salvador (BA), Brasil.

⁴ Médico assistente do Núcleo de Imunologia da Reprodução Humana (Nidarh); diretor do Laboratório de Transplantes da Santa Casa do Rio Grande do Sul – Rio Grande (RS), Brasil.

⁵ Farmacêutica responsável pelo laboratório do Núcleo de Imunologia da Reprodução Humana (Nidarh) – Campinas (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Marcelo Borges Cavalcante – Rua Cel. Linhares, 950 – Sala 307 – Aldeota – CEP 60170-240 – Fortaleza/CE – Fone/Fax: (85) 3246-0454 – E-mail: cavalcantemb@cpvidas.com.br

A relação imunológica entre feto e mãe é uma comunicação bidirecional. O feto participa através da expressão de antígenos no tecido trofoblástico, enquanto cabe à mãe reconhecer e responder a esse estímulo antigênico, através de células específicas presentes na interface materno-fetal. Falhas nesse processo resultam em quadros de falhas de implantação, abortos e outras intercorrências obstétricas.

As diferenças imunológicas entre indivíduos da mesma espécie são definidas como aloimunidade. Os fatores aloimunes são reconhecidos, de longa data, como essenciais no processo de aceitação embrionária pelo sistema imune materno. Em 1966, Clarke e Kirby, formularam a hipótese de que a disparidade antigênica materno-fetal era benéfica para o desenvolvimento do embrião. A histocompatibilidade materno-fetal pode induzir a um distúrbio na interação entre mãe e feto, por impedir a produção de fatores humorais e celulares de origem materna, essenciais para a vitalidade do embrião e o sucesso da gestação¹. É constatado que casais com compatibilidade human leukocyte antigen (HLA) em vários alelos possuem taxas elevadas de perdas gestacionais^{2,3}. Outros mecanismos aloimunes estão envolvidos na falha de implantação, entre eles destacam-se: hiperatividade das células natural killer (NK) e alterações no padrão de interleucinas, com um predomínio de citocinas T-Helper (TH) ⁴.

Os primeiros estudos de imunoterapia para perdas gestacionais surgiram na década de 1980, e a pergunta original ainda permanece sem resposta. Como interferir nos mecanismos imunológicos de implantação embrionária, em pacientes com histórico de perdas gestacionais, para melhorar os resultados gestacionais? Diferentes formas de tratamentos para o fator aloimune surgiram, entre eles destacam-se: imunização com linfócitos e imunoglobulina humana endovenosa.

A proposta terapêutica, utilizando-se imunização da mulher com linfócitos do parceiro ou de doador, surgiu da observação de que pacientes submetidos a transfusões sanguíneas seriadas apresentavam menor rejeição de aloenxertos renais⁵. Também foi constatada uma redução da incidência de abortos em animais por imunização prévia com células esplênicas paternas⁶.

Taylor e Faulk foram os primeiros a relatarem a utilização de concentrados de linfócitos para a prevenção de aborto recorrente de causa não-identificada⁷. Porém, foi Beer et al. que propuseram a utilização de linfócitos do parceiro, como melhor forma de imunização².

Os mecanismos de ação da imunoterapia com linfócitos ainda são pouco conhecidos, mas inúmeras evidências demonstram que a sua utilização promove, principalmente, a formação de fatores humorais específicos, bem como, reduz a atividade das células NK e induz a um predomínio de interleucinas T-Helper 2, que são essenciais para um bom processo de implantação embrionária⁸.

O resultado do primeiro estudo duplo-cego aleatório, publicado em 1985, comparando o efeito da imunização da mulher com linfócitos do parceiro *versus* linfócitos autólogos, observou melhora estatisticamente significativa nos resultados reprodutivos no grupo tratado com imunização com células do parceiro⁹. Desde então, inúmeros estudos, aleatórios ou não, têm relatado divergência em relação à eficácia da imunização com linfócitos. Em 1994, uma metanálise sobre a imunoterapia com linfócitos do parceiro concluiu que esta abordagem terapêutica beneficiaria de 8 a 10% das mulheres tratadas¹⁰.

Recentemente, a Cochrane Database questionou a eficácia das diversas formas de imunoterapia (imunização com linfócitos e imunoglobulina humana endovenosa) para aborto recorrente, inclusive recomendando o abandono dos testes imunológicos para os casais com aborto habitual. Nessa revisão, foram avaliados 20 ensaios clínicos entre 1980 e 2004, sendo 12 relacionados ao tratamento com linfócitos do parceiro, com 641 pacientes (OR=1,23; IC95%=0,89-1,70), três com linfócitos de doador, com 156 mulheres (OR=1,39; IC95%=0,68-2,82), um ensaio com infusão de membranas trofoblásticas, com 32 mulheres (OR=0,40; IC95%=0,11-1,45) e ainda imunoglobulina humana venosa (OR=0,98; IC95%=0,61-1,58)¹¹.

Porém, após a sua publicação inicial, inúmeros autores demonstraram erros metodológicos no desenho da revisão bibliográfica^{8,12}. A seguir, estão as falhas mais discutidas desta metanálise:

- foram analisados estudos com diferentes critérios de inclusão e exclusão de pacientes;
- existiam protocolos de imunização, concentrações de linfócitos e vias de administração diferentes entre si, longo intervalo entre preparo e realização da vacina e estocagem de sangue;
- falta de exames de controle pós-imunização e;
- a não-exclusão de pacientes com aborto, após tratamento, de causa cromossômica no grupo de estudo.

Apesar da polêmica gerada pela Cochrane, inúmeros centros no mundo recomendam a utilização da imunoterapia com linfócitos do parceiro como forma de tratamento de aborto recorrente de causa aloimune. No Japão, uma revisão recente revelou que 70% dos hospitais universitários e 80% das clínicas de reprodução humana prescrevem imunoterapia com linfócitos¹². Existem ainda publicações de países como: Brasil, Estados Unidos da América, Canadá, Colômbia, Argentina, Alemanha, Inglaterra, Índia, Chile, México, Egito, Irã, entre outros.

No Brasil, a utilização de vacinas com linfócitos em casais com perdas gestacionais de repetição teve seu início na década de 1990. Os primeiros trabalhos foram publicados em 1998, apresentando resultados gestacionais semelhantes ao mostrado na literatura mundial¹³.

Aborto recorrente é uma patologia obstétrica pouco frequente, em cerca de 2% dos casais em idade reprodutiva, e apresenta uma diversidade de causas envolvidas. Entre os fatores mais observados destacam-se: genéticos, anatômicos, infecciosos, trombofilias, hormonais e imunológicos¹⁴. Casais com perdas gestacionais de repetição devem ser submetidos a uma criteriosa avaliação, pois, em muitos casos, existem fatores associados. Estudos já demonstraram que quanto maior o número de fatores associados, pior o prognóstico dos casais com perdas^{15,16}.

Pacientes com história de aborto habitual associado ao fator aloimune, tratadas com imunização com linfócitos do parceiro, apresentam risco elevado de uma nova perda quando existe um fator autoimune associado ou idade materna maior que 40 anos ou associação de fatores¹⁶. Com base nesses dados, para se obter bons resultados com a imunoterapia com linfócitos, seria necessário seguir protocolos rigorosos de investigação e de conduta.

A Escola Japonesa de Medicina indica a investigação do fator aloimune em casais com aborto recorrente nas seguintes situações: após a terceira perda gestacional com o mesmo parceiro, após dois abortos com estudo genético normal e após dois abortos e níveis de células NK elevados¹².

Existem grandes variações nos protocolos de imunização com linfócitos, que podem interferir nos resultados. A seleção das pacientes, inicialmente, era realizada através da identificação de compatibilidade HLA com o parceiro. Atualmente, o diagnóstico do fator aloimune é realizado através de uma prova cruzada (cross match) negativa, utilizando linfócitos do parceiro e o soro da paciente. A prova cruzada pode ser realizada por citometria de fluxo ou por técnica de microlinfocitotoxicidade, com resultados semelhantes, tendo a primeira um custo mais elevado. A citometria de fluxo tem maior sensibilidade e a microlinfocitotoxicidade, maior especificidade. Avaliação dos níveis e da citotoxicidade das células NK no sangue periférico e no endométrio e avaliação

do perfil de interleucinas Th1 e Th2 são outras formas de avaliar o fator aloimune.

Em relação ao início da terapia, foram obtidos resultados significantes quando realizada antes e durante o primeiro trimestre da gravidez, utilizando exames de controle pós-imunização⁸. O critério utilizado, com melhores resultados, para que o casal seja liberado para uma nova gravidez é a prova cruzada positiva. Alguns autores observam o diâmetro do eritema no local da aplicação da vacina como parâmetro para liberar o casal para uma nova gravidez¹².

Pacientes que foram submetidas à imunoterapia com linfócitos e, após a sequência pré-gestacional, permaneceram com a prova cruzada negativa, obtiveram taxas de sucesso semelhantes ao Grupo Controle (sem tratamento) e diferentes do Grupo Tratado com prova cruzada positiva (56, 41 e 70%, respectivamente)¹⁷ (Tabela 1).

Casais submetidos à imunoterapia com linfócitos e com prova cruzada positiva são orientados a engravidar de imediato. Os melhores resultados gestacionais são observados nos primeiros seis meses após o cross match tornar-se positivo, sendo recomendadas imunizações de reforço entre três e seis meses até o teste de gravidez positivo, quando as imunizações passam a ser mensais, no primeiro trimestre. As doses de reforço são recomendadas, mesmo com a prova cruzada positiva, por existirem mecanismos imunomoduladores não-mensurados por tal exame.

O efeito imunoprotetor da terapia é dose dependente, sendo observados melhores resultados quando a concentração de linfócitos por imunização é de 100 – 200 x 10⁶. Concentrações abaixo de 80 x 10⁶ ou acima de 500 x 10⁶ desencadeiam um baixo efeito protetor. Vias de administração diferentes também são descritas como determinante da eficácia da terapia, sendo a via intradérmica a mais indicada⁸.

Tabela 1 - Valor prognóstico da prova cruzada (cross match)

Grupo de paciente	Prova cruzada	Nascidos vivos	Odds ratio	p
3-4 abortos	Negativa → negativa, controle	47/115 (40,9%)	1	
	Negativa → negativa, imunizado	28/50 (56%)	1,84 (0,94-3,6)	NS
	Negativa → positiva, imunizado	181/258 (70,2%)	3,40 (2,15-5,37)	0,001
	Positiva → positiva, controle	16/63 (69,6%)	3,30 (1,26-8,66)	0,015
	Positiva → positiva, imunizado	1/1	-	-
≥5 abortos	Negativa → negativa, controle	12/44 (27,2%)	1	
	Negativa → negativa, imunizado	5/13 (38,5%)	1,67 (0,45-6,11)	NS
	Negativa → positiva, imunizado	47/84 (55,9%)	3,38 (1,53-7,47)	0,02
	Positiva → positiva, controle	6/19 (31,6%)	1,23 (0,38-3,98)	NS
	Positiva → positiva, imunizado	3/7 (42,9%)	2 (0,39-10,28)	NS

Fonte: Orgad S et al.¹⁷.

NS: não-significante.

Tabela 2 - Principais estudos avaliando eficácia da imunização com linfócitos em casos de aborto recorrente

Referência	Grupo estudado (%)	Grupo controle (%)
Taylor e Faulk ⁷	3/4 (75)	-
Beer ²³	100/121 (77)	13/51 (25)
Mowbray et al. ⁹	17/22 (77)	10/27 (37)
Takakuwa, Kanazawa e Takeuchi ²⁴	7/10 (70)	-
Beer ²⁵	8/39 (72)	16/44 (36)
Mowbray et al. ²⁷	5/13 (68)	-
Mowbray ²⁶	164/229 (72)	-
Reznikoff-Etievant et al. ²⁸	28/33 (85)	15/31 (48)
Smith et al. ²⁹	27/34 (80)	2/9 (22)
Regan et al. ³⁰	34/46 (74)	0/4 (0)
Gatenby et al. ³¹	15/28 (55)	-
Carp et al. ³²	79/156 (50)	11/30 (36)
Takakuwa et al. ³³	28/35 (80)	4/12 (30)
Cowchock et al. ³⁴	43/74 (58)	8/25 (32)
Cauchi et al. ³⁵	13/21 (62)	19/25 (76)
Ho et al. ³⁶	33/39 (84)	39/60 (65)
Clark e Daya ³⁷	7/11 (64)	2/7 (29)
Smith et al. ³⁸	97/168 (57)	-
Aoki et al. ³⁹	88/106 (83)	-
Takakuwa et al. ⁴⁰	22/29 (66)	-
Gatenby et al. ⁴¹	13/19 (68)	9/19 (47)
Maruyama et al. ⁴²	55/69 (79)	-
Daya e Gunby ⁴³	91/136 (66)	60/119 (50)
Kilpatrick ⁴⁴	39/48 (81)	-
Illeni et al. ⁴⁵	10/22 (45)	11/22 (50)
Agrawal et al. ⁴⁶	16/21 (76)	13/45 (28)
Sterzik et al. ⁴⁷	19/30 (63)	-
Komlos et al. ⁴⁸	4/7 (57)	-
Tanaka et al. ⁴⁹	47/63 (74)	-
Malinowsky et al. ⁵⁰	102/117 (87)	-
Katano et al. ⁵¹	154/205 (75)	17/23 (73)
Carp et al. ⁵²	63/99 (63)	8/50 (36)
Check et al. ⁵³	10/23 (43)	-
Gafter et al. ⁵⁴	7/9 (77)	-
Tamura et al. ⁵⁵	39/55 (71)	-
Barini et al. ¹³	93/116 (80)	-
Dupont et al. ⁵⁶	41/56 (74)	43/61 (71)
Maejima et al. ⁵⁷	8/10 (80)	-
Pena et al. ⁵⁸	26/33 (80)	-
Li, Li e Zhu ⁵⁹	17/20 (86)	17/22 (86)
Ito et al. ⁶⁰	5/10 (50)	-
Prigoshin et al. ⁶¹	5/10 (50)	-
Orgad et al. ¹⁷	265/413 (64)	81/201 (40)
Ober et al. ⁶²	31/86 (36)	41/85 (48)
Ramhorst et al. ⁶³	54/92 (58)	17/37 (46)
Agrawal, Pandey e Pandey ⁶⁴	23/28 (82)	-
Hayakawa et al. ⁶⁵	7/12 (58)	-
Matsubayashi et al. ⁶⁶	86/122 (70)	-
Miki et al. ⁶⁷	7/10 (70)	47/97 (48)
Katano et al. ⁶⁸	169/232 (73)	-
Pandey et al. ⁷⁰	26/30 (86)	14/43 (32)
Pandey e Agrawal ⁶⁹	67/135(50)	-
Pandey, Thakur e Agrawal ⁸	25/32 (78)	12/28 (42)
Ghahesi-Fard et al. ⁷¹	67/92 (73)	44/81 (54)-

Fonte (modificado): Pandey, Thakur e Agrawal⁸.

Outro fator que interfere na eficácia do tratamento é o intervalo entre a coleta de sangue do parceiro e a realização da imunização. Um estudo recente revelou que a proteína de superfície do linfócito CD200 tem participação no mecanismo de imunomodulação do tratamento. Quanto maior o intervalo coleta-aplicação, maior o risco de contaminação da amostra e menor é a concentração de CD200, prejudicando os resultados¹⁸.

O efeito colateral mais preocupante é a transmissão de doenças infecto-contagiosas (AIDS, sífilis, hepatite, vírus T-linfotrófico humano, citomegalovírus, doença de Chagas), exigindo-se um rastreamento sorológico prévio ao início do tratamento. Em 2006, Kling et al. publicaram a incidência de efeitos colaterais em mais de 2.500 pacientes. A quase totalidade das pacientes apresentou reação no local da aplicação, com uma duração média de 15 dias, sendo as mais frequentes: hiperemia, prurido, edema, ardência e bolhas. Reações sistêmicas estiveram presentes em 209 pacientes (8%), sendo os sintomas inespecíficos (elevação da temperatura, fadiga, cefaléia, náuseas e linfadenopatia)¹⁹. Existe risco teórico, porém não-comprovado por esse estudo, de trombocitopenia neonatal aloimune, de reação enxerto contra-hospedeiro e de sensibilização anti-D em casos de mulheres Rh negativo com parceiro Rh positivo. Nessa última situação, é aconselhável o uso de imunoglobulina anti-D após cada vacina.

O protocolo de investigação e tratamento, de fator aloimune em perdas gestacionais, mais utilizado no Brasil é o preconizado, desde 1993, no Ambulatório de Aborto Recorrente do Centro de Atenção a Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas (Caism/Unicamp). Os resultados da Unicamp e de outros serviços com protocolos semelhantes apresentam taxas de sucesso em torno de 80% na gestação seguinte ao tratamento^{13,16}, compatíveis aos descritos na literatura (Tabela 2).

Os principais fatores determinantes de sucesso do tratamento, observados na literatura internacional são seguidos pelo protocolo da Unicamp: seleção rigorosa das pacientes submetidas ao tratamento; imunizações pré-concepcionais e durante o primeiro trimestre da gravidez; prova cruzada deve ser positiva antes da próxima gestação; imunizações de reforço a cada três meses até teste de gravidez positivo e avaliação e tratamento de outros fatores associados.

Resultados positivos obtidos com a imunoterapia nos casos de aborto recorrente, recentemente, induziram vários autores a propor o mesmo protocolo para casais inférteis com falhas repetidas de implantação em ciclos de fertilização *in vitro* (FIV), com embriões de boa qualidade²⁰⁻²². Vários países já utilizaram a imunoterapia nesses casos, com destaque para o Canadá e a Alemanha.

Os primeiros trabalhos publicados, nos casos de falhas de FIV, apresentaram bons resultados em grupos bem selecionados. Check et al., em 2005, obtiveram uma taxa de gravidez clínica e

viável de 70 e 51%, respectivamente, comparado com 46 e 16%, do Grupo Controle²². Na Alemanha, Wegener et al. apresentam taxas de gravidez por transferência de 34%, maior que a média do registro alemão que é de 25%²⁰.

Ainda não existe um consenso para a indicação da imunização com linfócitos em casos de falhas de implantação em FIV. É

preciso a realização de estudos bem controlados, seguindo rigorosos critérios de inclusão, exclusão e de controle das variáveis. Um uso indiscriminado em casos não-selecionados (má respondedoras, embriões de baixa qualidade entre outros fatores de insucesso em ciclos de FIV) não está indicado, podendo prejudicar a credibilidade do método.

Referências bibliográficas

- Clarke B, Kirby DR. Maintenance of histocompatibility polymorphisms. *Nature*. 1966;211(5052):999-1000.
- Beer AE, Quebbeman JF, Ayers JW, Haines RF. Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans. *Am J Obstet Gynecol*. 1981;141(8):987-99.
- Beer AE, Kwak JYH. Immunology of normal pregnancy. *Immunol Allergy Clin North Am*. 1998;18(2):149-70.
- Kwak-Kim JY, Chung-Bang HS, Ng SC, Ntrivalas EI, Mangubat CP, Beaman KD, et al. Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. *Hum Reprod*. 2003;18(4):767-73.
- Sollinger HW, Burlingham WJ, Sparks EM, Glass NR, Belzer FO. Donor-specific transfusions in unrelated and related HLA-mismatched donor-recipient combinations. *Transplantation*. 1984;38(6):612-5.
- Chaouat G, Kieger N, Wegmann TG. Vaccination against spontaneous abortion in mice. *J Reprod Immunol*. 1983;5(6):389-92.
- Taylor C, Faulk WP. Prevention of recurrent abortion with leucocyte transfusions. *Lancet*. 1981;2(8237):68-70.
- Pandey MK, Thakur S, Agrawal S. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet*. 2004;269(3):161-72.
- Mowbray SF, Gibbings C, Lidell H, Reginald PW, Underwood JL, Beard RW. Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells. *Lancet*. 1985;1(8435):941-3.
- Worldwide collaborative observational study and meta-analysis on allogeneic leukocyte immunotherapy for recurrent spontaneous abortions. Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialists Group. *Am J Reprod Immunol*. 1994;32(2):55-72.
- Porter TF, LaCoursiere Y, Scott JR. Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 2. Art. No.: CD000112. DOI: 10.1002/14651858.CD000112.pub2.
- Takeshita T. Diagnosis and treatment of recurrent miscarriage associated with immunologic disorders: Is paternal lymphocyte immunization a relic of the past? *J Nippon Med Sch*. 2004;71(5):308-13.
- Barini R, Couto E, Ribeiro ST, Leiber SR, Batista SC, Pinto e Silva JL. Abortamento recorrente de causa imunológica: avaliação de um protocolo de investigação e tratamento. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 1998;20:83-9.
- Coulam CB. Epidemiology of recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*. 1991;26(1):23-7.
- Barini R, Couto E, Mota MMM, Santos CTM, Leiber SR, Batista SC. Fatores associados ao aborto espontâneo recorrente. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2000;22(4):217-23.
- Caetano MR, Couto E, Passini R Jr, Simoni RZ, Barini R. Gestational prognostic factors in women with recurrent spontaneous abortion. *Sao Paulo Med J*. 2006;124(4):181-5.
- Orgad S, Loewenthal R, Gazit E, Sadetzki S, Novikov I, Carp H. The prognostic value of anti-paternal antibodies and leukocyte immunizations on the proportion of live births in couples with consecutive recurrent miscarriages. *Hum Reprod*. 1999;14(12):2974-9.
- Clark DA, Chaouat G. Loss of surface CD200 on stored allogeneic leukocytes may impair anti-abortion effect in vivo. *Am J Reprod Immunol*. 2005;53(1):13-20.
- Kling C, Steinmann J, Westphal E, Magez J, Kabelitz D. Adverse effects of intradermal allogeneic lymphocyte immunotherapy: acute reactions and role of autoimmunity. *Hum Reprod*. 2006;21(2):429-35.
- Wegener S, Schnurstein K, Hansch S, Bolz M, Briese M, Sudik R, et al. Immunotherapy with paternal lymphocytes for recurrent miscarriages and unsuccessful in vitro fertilization treatment. *Transfus Med Hemother*. 2006;33:501-7.
- Barini R, Souza Lima SCB. Implantation failure reproduction: how to get better implantation rates with immune therapy. *J Reprod Immunol*. 75(1):A5,2007.
- Check JH, Liss JR, Check ML, Diantonio A, Duroseau M. Lymphocyte immunotherapy can improve pregnancy outcome following embryo transfer (ET) in patients failing to conceive after two previous ET. *Clin Exp Obst Gynecol*. 2005;32(1):21-2.
- Beer AE. How did your mother not reject you? *Ann Immunol*. 1984;135D:315-8.
- Takakuwa K, Kanazawa K, Takeuchi S. Production of blocking antibodies by vaccination with husband's lymphocytes in

- unexplained recurrent aborters: the role in successful pregnancy. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1986;10:1-9.
25. Beer AE. New horizons in the diagnosis, evaluation and therapy of recurrent spontaneous abortion. *Clin Obstet Gynaecol.* 1986;1:115-24.
 26. Mowbray JF. Immunology of early pregnancy. *Hum Reprod.* 1988;3:79-82.
 27. Mowbray JF, Underwood JL, Michel M, Forbes PB, Beard RW. Immunisation with paternal lymphocytes in women with recurrent miscarriage. *Lancet.* 1987;2:679-80.
 28. Reznikoff-Etievant MF, Durieux I, Huchet J, Slamon C, Neltor A. Human MHC antigens and paternal leukocyte injections in recurrent spontaneous abortions. In: Bear RW, Sharp F (Ed.) *Early pregnancy loss: mechanisms and treatment.* RCOG: London; 1988; p 375-84.
 29. Smith JB, Cowchock FS, Lata JA, Hankinson BT. The number of cells used for immunotherapy of repeated spontaneous abortion influences pregnancy outcome. *J Reprod Immunol.* 1992;22: 217-24.
 30. Regan L, Braude PR, Trembath PL. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ.* 1989;299:541-5.
 31. Gatenby PA, Moore H, Cameron K, Doran TJ, Adelstein S. Treatment of recurrent spontaneous abortion by immunization with paternal lymphocytes: correlates with outcome. *Am J Reprod Immunol.* 1989;19:21-7.
 32. Carp HJ, Toder V, Gazit E, Orgad S, Mashiach S, Nebel L, et al. Immunization by paternal leukocytes for prevention of primary habitual abortion: results of a matched controlled trial. *Gynecol Obstet Invest.* 1990;29:16-21.
 33. Takakuwa K, Goto S, Hasegawa I, Ueda H, Kanazawa K, Takeuchi S, et al. Result of immunotherapy on patients with unexplained recurrent abortion: a beneficial treatment for patients with negative blocking antibodies. *Am J Reprod Immunol.* 1990; 23:37-41.
 34. Cowchock FS, Smith JB, David S, Scher J, Batzer F, Corson S. Paternal mononuclear cell immunization therapy for repeated miscarriage: predictive variables for pregnancy success. *Am J Reprod Immunol.* 1990;22:12-7.
 35. Cauchi MN, Lim D, Young DE, Kloss M, Pepperell RJ. Treatment of recurrent aborters by immunization with paternal cells – controlled trial. *Am J Reprod Immunol.* 1991;25:16-7.
 36. Ho HN, Gill TJ III, Hsieh HJ, Jiang JJ, Lee TY, Hsieh CY. Immunotherapy for recurrent spontaneous abortions in a Chinese population. *Am J Reprod Immunol.* 1991;25:10-5.
 37. Clark DA, Daya S. Trials and tribulation in the treatment of recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol.* 1991;25:18-24.
 38. Smith JB, Cowchock FS, Lata JA, Hankinson BT. The number of cells used for immunotherapy of repeated spontaneous abortion influences pregnancy outcome. *J Reprod Immunol.* 1992;22: 217-24.
 39. Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Yagani Y. Clinical Evaluation of immunotherapy in early pregnancy with Irradiated paternal mononuclear cells for primary and recurrent aborters. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;169:649-53.
 40. Takakuwa K, Higashino M, Yasuda M, Ishii S, Ueda H, Asano K, et al. Is an additional vaccination necessary for a successful second pregnancy in unexplained recurrent aborters who were successfully immunized with their husband's lymphocytes before the first pregnancy? *Am J Reprod Immunol.* 1993;29:39-44.
 41. Gatenby PA, Cameron K, Simes RJ, Adelstein S, Bennett MJ, Jansen RP, et al. Treatment of recurrent spontaneous abortion by immunization with paternal lymphocytes: results of a controlled trial. *Am J Reprod Immunol.* 1993;29:88-94.
 42. Maruyama T, Makino T, Sugi T, Iwasaki K, Ozawa N, Matsubayashi H, et al. Flow cytometric crossmatch and early pregnancy loss in women with a history of recurrent spontaneous abortions who underwent paternal leukocyte immunotherapy. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;68:1528-36.
 43. Daya S, Gunby J. The effectiveness of allogeneic leukocyte immunization in unexplained primary recurrent spontaneous abortion. Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialists Group. *Am J Reprod Immunol.* 1994;32:294-302.
 44. Kilpatrick DC. Soluble interleukin-2 receptors in recurrent miscarriage and the effect of leukocyte immunotherapy. *Immunol Lett.* 1994;34:201-6.
 45. Illeni MT, Marelli G, Parazzini F, Acaia B, Bocciolone L, Bontempelli M, et al. Immunotherapy and recurrent abortion: a randomized clinical trial. *Hum Reprod.* 1994;9:1247-9.
 46. Agrawal S, Kishore R, Halder A, Sharma A, Sharma RK, Das V, et al. Outcome of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion following immunotherapy with allogeneic lymphocytes. *Hum Reprod.* 1995;10:2280-4.
 47. Sterzik K, Strehler E, De Santo M, Oblinger E, Rosenbusch B, Kreienberg R. Idiopathic habitual abortion: experiences with active immunotherapy. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 1995;55:493-9.
 48. Komlos L, Vardimon D, Notmann J, Ben-Rafael Z, Hart J, Klein T, et al. Mixed maternalpaternal lymphocyte cultures before and after immunotherapy for recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol.* 1996;35:30-3.
 49. Tanaka T, Umesaki N, Maeda K, Miyama M, Ogita S. Pregnancy and neonatal outcomes in unexplained recurrent/habitual aborters treated by allogenic leukocyte immunization. *Osaka City Med J.* 1997;43:81-7.
 50. Malinowsky D, Alheim K, Chai Z, Fantuzzi G, Hasanvan H, Di Santo E, et al. Hyperresponsive febrile reactions to interleukin (IL) 1alpha and IL-1beta, and altered brain cytokine mRNA and serum cytokine levels, in IL-1beta-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:2681-6.

51. Katano K, Ogasawara M, Aoyama J, Ozaki Y, Kajikura S, Aooki K. Clinical trial of immuno-stimulation with a biological response modifier in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J Clin Immunol.* 1997;17:427-37.
52. Carp HJ, Toder V, Torchinsky A, Portuguese S, Lipitz S, Gazit E, et al. Allogenic leukocyte immunization after five or more miscarriages. Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialists Group. *Hum Reprod.* 1997;12:250-5.
53. Check JH, Arwitz M, Gross J, Peymer M, Szekeres-Bartho J. Lymphocyte immunotherapy (LI) increases serum levels of progesterone induced blocking factor (PIBF). *Am J Reprod Immunol.* 1997;37:17-20.
54. Gafter U, Sredni B, Segal J, Kalechman Y. Suppressed cell-mediated immunity and monocyte and natural killer cell activity following allogeneic immunization of women with spontaneous recurrent abortion. *J Clin Immunol.* 1997;17:408-19.
55. Tamura M, Takakuwa K, Arakawa M, Yasuda M, Kazama Y, Tanaka K. Relationship between MLR blocking antibodies and the outcome of the third pregnancy in patients with two consecutive spontaneous abortions. *J Perinat Med.* 1998;26:49-53.
56. Dupont E, Moriaux M, Lambermont M, Englert Y. Reevaluation of immunomodulator treatment for recurrent abortion. *Rev Med Brux.* 1998;19:69-72.
57. Maejima M, Fujii T, Yamashita T, Hara N, Hamai Y, Miki A, et al. Immunotherapy before and during pregnancy improves pregnancy outcome in women who suffer from recurrent abortion and did not benefit from immunotherapy before pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 1998;39:12-5.
58. Pena RB, Cadavid AP, Botero JH, Garcia GP, Gallego MI, Ossa JE. The production of MLR-blocking factors after lymphocyte immunotherapy for RSA does not predict the outcome of pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 1998;39:120-4.
59. Li D, Li C, Zhu Y. Comparative study of the third party and paternal leukocyte immunization in recurrent spontaneous abortion of lowered maternal-fetal immunorecognition. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 1998;33:597-600.
60. Ito K, Tanaka T, Tsutsumi N, Obata F, Kashiwagi N. Possible mechanisms of immunotherapy for maintaining pregnancy in recurrent spontaneous aborters: analysis of anti-idiotypic antibodies directed against autologous T-cell receptors. *Hum Reprod.* 1999;14:650-5.
61. Prigoshin N, Tambutti ML, Redal MA, Gorgorza S, Lancuba SM, Nicholson R, et al. Microchimerism and blocking activity in women with recurrent spontaneous abortion (RSA) after alloimmunization with the partner's lymphocytes. *J Reprod Immunol.* 1999;44:41-54.
62. Ober C, Karrison T, Odem RR, Barnes RB, Branch DW, Stephenson MD, et al. Mononuclear-cell immunisation in prevention of recurrent miscarriages: a randomised trial. *Lancet.* 1999;354:365-9.
63. Ramhorst R, Agriello E, Zittermann S, Pando M, Larriba J, Irigoyen M, et al. Is the paternal mononuclear cells' immunization a successful treatment for recurrent spontaneous abortion? *Am J Reprod Immunol.* 2000;44:129-135.
64. Agrawal S, Pandey MK, Pandey A. Prevalence of MLR blocking antibodies before and after immunotherapy. *J Hematother Stem Cell Res.* 2000;9:257-62.
65. Hayakawa S, Karasaki-Suzuki M, Itoh T, Ishii M, Kanaeda T, Nagai N, et al. Effects of paternal lymphocyte immunization on peripheral Th1/Th2 balance and TCR V beta and V gamma repertoire usage of patients with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol.* 2000;43:107-15.
66. Matsubayashi H, Maruyama T, Ozawa N, Izumi SI, Sugi T, Yoshikata K, et al. Anti-paternal antibodies by flow cytometry in the management of alloimmunization on recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol.* 2000;44:284-8.
67. Miki A, Fujii T, Ishikawa Y, Hamai Y, Yamashita T, Tadokoro K, et al. Immunotherapy prevents recurrent abortion without influencing natural killer receptor status. *Am J Reprod Immunol.* 2000;43:98-106.
68. Katano K, Aoki K, Ogasawara MS, Suzumori K. Adverse influence of numbers of previous miscarriages on results of paternal lymphocyte immunization in patients with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol.* 2000;44:289-92.
69. Pandey MK, Agrawal S. Is allogenic immunization before and during pregnancy more effective? *Internet J Gynecol Obstet.* 2003;2(1).
70. Pandey MK, Halder A, Agarwal S, Srivastava M, Agarwal SS, Agrawal S. Immunotherapy in recurrent spontaneous abortion: randomized and non-randomized trials. *Internet J Gynecol Obstet.* 2003;2(1).
71. Gharesi-Fard B, Zolghadri J, Foroughinia L, Tavazoo F, Samsami Dehaghani A. Effectiveness of leukocyte immunotherapy in primary recurrent spontaneous abortion (RSA). *Iran J Immunol.* 2007;4(3):173-8.

Recebido em: 30/07/2008

Aprovado para publicação em: 12/11/2008

Papel atual da histeroscopia diagnóstica no diagnóstico das doenças intrauterinas

Role of hysteroscopic examination in the diagnosis of intrauterine pathology

Ivone Dirk de Sousa Filogônio¹, Ivete de Ávila²



A Doutora Ivone Dirk de Sousa Filogônio é graduada em Medicina pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). É especializada em Ginecologia e Obstetrícia pelo Hospital dos Servidores do Estado de Minas Gerais (IPSEMG). Possui título de Histeroscopia e Videolaparoscopia pela Sociedade Brasileira de Cirurgia Laparoscópica (Sobracil). Mestre em Ciências da Saúde pelo Instituto de Previdência dos Servidores do Estado de Minas Gerais (IPSEMG) e coordenadora do Serviço de Ginecologia do Biocor Instituto.

Resumo

A histeroscopia diagnóstica ocupa, atualmente, lugar de destaque na ginecologia moderna como método de diagnóstico ou terapêutico, sendo considerada padrão-ouro na avaliação das alterações intrauterinas como os pólipos, miomas, hiperplasia e câncer de endométrio. A indicação mais comum de histeroscopia diagnóstica é o sangramento uterino anormal, embora seja também importante em outras situações, como na propedêutica do casal infértil e em casos de perda gestacional de repetição. A capacidade diagnóstica não parece ser influenciada pela ocorrência de menopausa. O exame histeroscópico apresenta elevada sensibilidade (93%) e especificidade (95%) para o diagnóstico dos pólipos endometriais e miomas submucosos (87% de sensibilidade e 95% de especificidade). Quando se considera o diagnóstico de câncer e hiperplasia simples, a visão histeroscópica apresenta acurácia modesta na identificação da doença, não sendo um método adequado para excluir a presença de câncer de endométrio e hiperplasia simples, o que deve ser feito através do exame histopatológico. O aspecto da hiperplasia dificulta a interpretação da visão histeroscópica, mas nem por isso a histeroscopia deixa de ser importante, pois é complementar à análise histológica, fornece amostras globais das lesões e biopsias diretas das lesões focais e melhora sensivelmente a acurácia diagnóstica. Não há, até o momento, consenso na literatura entre a descrição da lesão vista à histeroscopia e os achados histológicos. Dessa forma, o exame histeroscópico deve ser complementado pela avaliação histológica e o diagnóstico adequado em casos de hiperplasia e câncer de endométrio.

Unitermos: Histeroscopia diagnóstica; Pólipo endometrial; Mioma submucoso; Hiperplasia endometrial; Câncer de endométrio.

Abstract

Diagnostic hysteroscopy plays an important role in the gynecologic practice in the diagnosis and treatment of intrauterine disease and is the current gold standard for evaluating intrauterine pathology, including submucous myomas, polyps, endometrial hyperplasia and cancer. Menopausal status does not seem to influence diagnostic accuracy. The most common indication for hysteroscopy is abnormal uterine bleeding, but it is also used in cases of infertility and in the workup of recurrent pregnancy loss. Hysteroscopy has high sensitivity (93%) and specificity (95%) for the diagnosis of endometrial polyps and submucous myomas (87% of sensitivity and 95% of specificity). As for the diagnosis of endometrial cancer and simple hyperplasia, hysteroscopy view cannot exclude any of them accurately and in both cases endometrial biopsy is mandatory. Endometrial hyperplasia remains a histological diagnosis but hysteroscopy helps directing biopsies and thus improves diagnostic accuracy. There is no consensus in the literature, so far, on the relationship between hysteroscopic imaging and endometrial histopathology. Thus, endometrial histology is mandatory to rule out endometrial hyperplasia and cancer.

Uniterms: Diagnostic hysteroscopy; Endometrial polyps; Submucous myomas; endometrial hyperplasia; Endometrial cancer.

Hospital Biocor e Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Belo Horizonte (MG), Brasil.

¹ Especialista em Ginecologia e Obstetrícia, Videolaparoscopia e Histeroscopia; Mestre em Ciências da Saúde (IPSEMG); coordenadora da Clínica Ginecológica do Hospital Biocor – Belo Horizonte (MG), Brasil.

² Especialista em Ginecologia e Obstetrícia, Videolaparoscopia e Histeroscopia; Mestre em Ciências da Saúde (IPSEMG); médica da Clínica Ginecológica do Hospital Biocor – Belo Horizonte (MG), Brasil.

Endereço para correspondência: Márcia Mendonça Carneiro – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFMG – Avenida Alfredo Balena, 110 – 7º andar – CEP 30130-100 – Belo Horizonte/MG – E-mail: marciamc@medicina.ufmg.br

A histeroscopia ocupa atualmente lugar de destaque na ginecologia moderna como método de diagnóstico ou terapêutico^{1,2}. Na verdade, as imagens da histeroscopia apresentam vantagens sobre os outros métodos propedêuticos, pois permitem percepções visuais e táteis integradas. A histeroscopia diagnóstica é uma abordagem direta que permite a observação do formato, contorno, relevo e cor de qualquer anormalidade¹. Os padrões vasculares podem ser analisados, os detalhes podem ser examinados de perto e até mesmo a consistência e a mobilidade das estruturas podem ser testadas colocando a extremidade distal do endoscópio em ligeiro contato com elas. Essas percepções visuais e táteis são integradas de forma a produzir diagnósticos presuntivos acerca da natureza de uma anormalidade intrauterina, na falta do exame anatomopatológico^{2,3}.

A indicação mais comum de histeroscopia diagnóstica é o sangramento uterino anormal (SUA), embora seja também importante em outras situações como na propedêutica do casal infértil e em casos de perda gestacional de repetição (Quadro 1)².

A dilatação e curetagem (D&C) foi, por décadas, o procedimento de escolha para o diagnóstico do SUA. Cedeu lugar à histeroscopia por ser uma técnica inadequada para o diagnóstico das alterações endometriais, como os pólipos e os miomas submucosos, além de apresentar elevados índices de falso-negativo para o câncer de endométrio^{4,5}. Além disso, a D&C requer intubação e anestesia, o que aumenta o custo e o risco de complicações, e por isso, vem sendo substituída por métodos menos invasivos e com maior precisão diagnóstica. Ceci et al.⁶ compararam a precisão diagnóstica da D&C com a da histeroscopia, tendo como padrão-ouro o exame anatomopatológico da histerectomia e acabaram encontrando sensibilidade e valor preditivo negativo significativamente maior da histeroscopia (Tabela 1). O diagnóstico final das alterações da cavidade endometrial é o exame do espécime obtido à histerectomia, o que claramente apresenta limitações na prática clínica⁶.

Quando comparada à biópsia endometrial às cegas, a histeroscopia mostrou elevada sensibilidade e acurácia no diagnóstico das lesões endometriais benignas (pólipos e miomas), mas é limitada em casos de hiperplasia e câncer de endométrio⁷.

Embora a histeroscopia com biópsia seja considerada atualmente o método padrão para avaliar macroscopicamente as doenças intrauterinas, incluindo pólipos endometriais, miomas submucosos, hiperplasias e câncer, ainda não foi estabelecida uma correlação adequada entre a visão histeroscópica e o exame histológico (padrão-ouro)².

A sensibilidade e especificidade da histeroscopia na identificação de lesões intrauterinas é reconhecida por alguns autores⁸⁻¹⁰, mas ainda não há consenso na literatura entre a descrição da lesão vista à histeroscopia e os achados histológicos⁸⁻¹⁰. Isto se deve à diversidade das classificações e critérios utilizados para definir as lesões identificadas à histeroscopia, o uso de testes estatísticos inadequados e o pequeno número de pacientes nos estudos publicados,

Quadro 1 – Indicações da histeroscopia diagnóstica²

- Avaliação do SUA
- Diagnóstico e tratamento de lesões intrauterinas focais (pólipos e miomas)
- Propedêutica da infertilidade
- Diagnóstico e tratamento de alterações uterinas (sinéquias e septo)
- Propedêutica da perda gestacional de repetição
- Localização e remoção de DIU

Tabela 1 - Comparação entre a acurácia diagnóstica de D&C e histeroscopia

	DC versus achados histológicos após histerectomia (397 pacientes)(%)	Histeroscopia versus achados histológicos após histerectomia (445 pacientes)
Sensibilidade	46	98%; p<0,005
Especificidade	100	95%; NS
VPP	100	96%; NS
VPN	7,1	98%; p<0,005

Fonte: Ceci et al.⁶

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; NS: não-significativo.

assim como a dificuldade na definição histopatológica de algumas lesões como a hiperplasia endometrial. Dessa forma, mais estudos são necessários para se estabelecer a correlação precisa das alterações visualizadas à histeroscopia e os achados histopatológicos.

Pólipos endometriais

Os pólipos endometriais são lesões em relevo, constituídos por glândulas e estroma, na superfície da cavidade uterina. Estima-se sua prevalência em 10 a 25% das mulheres, com predomínio a partir dos 40 anos. Acredita-se que tenham origem num adenoma na porção basal do endométrio, fazendo protrusão na zona funcional dessa mucosa ao crescer e aparecendo na cavidade uterina recoberto por camada de endométrio. Foi demonstrado decréscimo nos seus receptores de estrogênio e progesterona. Na maioria deles observa-se endométrio de tipo imaturo, fora de fase, com glândulas irregulares pouco responsivas a progesterona, provavelmente por serem de origem basal, sendo refratários às influências hormonais do ciclo menstrual e insensíveis aos tratamentos hormonais¹¹.

A etiologia e patogênese dos pólipos endometriais permanecem desconhecidas e a literatura cita uma chance de malignização dessas lesões de 0,8 a 4,9% lesões^{11,12}.

A histeroscopia pode ser considerada o padrão-ouro para diagnóstico macroscópico de pólipos endometriais e existe alta incidência de pólipos nos trabalhos baseados em histeroscopia^{8,11,12}. O exame histeroscópico apresenta elevada sensibilidade (93%) e especificidade (95%) para o diagnóstico dos pólipos endometriais^{3,8}.

Na histeroscopia, os pólipos benignos podem ser quantificados em números e sua localização é precisa quanto à região da cavidade em que se encontram. São visualizados e descritos como sendo pediculados ou sésseis, de superfície lisa, brilhantes, de cor vermelha muito clara ou de superfície translúcida com rede vascular pouco visível. Ao toque, sua superfície pode ser levemente deprimida^{1,3,12}.

Fernández-Parra et al.¹² analisaram 1.870 histeroscopias para avaliar a capacidade da mesma em identificar a presença de câncer nos pólipos endometriais. Também foi estabelecida uma correlação dos achados histeroscópicos dos pólipos com câncer de endométrio. Assim, a incidência de câncer em mulheres na pós-menopausa com mais de três pólipos foi maior (7,3%) do que naquelas que apresentaram número mais baixo (1,2%). Concluiu-se que o aspecto histeroscópico dos pólipos pode prever a presença de câncer, embora não dispense a realização de um estudo histológico dos mesmos. Lieng et al.¹³ realizaram biópsia concomitante à polipectomia e encontraram elevada prevalência de malignidade e hiperplasia atípica em mulheres com pólipo endometrial, o que enfatiza o valor da biópsia concomitante à polipectomia. Antunes A Jr et al., todavia, salientam que mulheres acima de 60 anos e aquelas com sangramento uterino na pós-menopausa apresentam risco elevado de malignidade e, nesses casos a ressecção do pólipo deve ser realizada¹⁴.

A necessidade de um diagnóstico preciso dos pólipos endometriais não se restringe aos casos de SUA ou a quando se busca o diagnóstico diferencial com o câncer de endométrio; é também de muita importância na propedêutica das mulheres inférteis¹⁵. Embora a realização rotineira da histeroscopia não seja recomendada na propedêutica da mulher infértil, há evidência de benefício da identificação e remoção de pólipos endometriais nessas mulheres^{15,16}.

Miomas uterinos

Os miomas uterinos, também conhecidos como fibromas ou leiomiomas, são tumores benignos compostos de células musculares bem diferenciadas. Ocorrem em aproximadamente 25 a 35% das mulheres em idade reprodutiva e aproximadamente 2% são submucosos. À histeroscopia, são visualizados como nódulos,

recobertos por fina camada de endométrio. Ao toque são firmes e não flutuam no líquido de distensão da cavidade uterina. É possível estabelecer em quais posições se encontram na cavidade, sendo que sua base de implantação é definida como pediculados ou sésseis. Eles têm sua rede vascular superficial devidamente visualizada¹. E, são classificados a partir de métodos de imagem pela Sociedade Européia de Ginecologia Endoscópica (ESGE) em:

- nível 0: quando o tumor se encontra totalmente na cavidade uterina, não havendo qualquer porção no miométrio.
- nível I: quando mais de 50% do nódulo está na cavidade.
- nível II: quando mais de 50% do mioma está dentro do miométrio

Os miomas submucosos são frequentes causas de sangramento vaginal e seu correto diagnóstico no pré-operatório é importante para escolher o tipo de anestesia, prever o tempo de cirurgia e discutir quais os riscos e vantagens com a paciente².

A histeroscopia cirúrgica é considerada o método de escolha para o tratamento cirúrgico dos miomas submucosos¹⁻³. Logo, a importância pré-operatória da localização exata dos miomas submucosos, inclusive, em alguns casos, até para contraindicar a cirurgia, cuja viabilidade é dependente da localização do mioma (fúndicos, sésseis, de base larga são inoperáveis, utilizando-se os ressectoscópios comuns). No pós-operatório, ela é útil em pacientes em tratamento de infertilidade, pois o diagnóstico precoce de sinéquias facilita o seu tratamento^{1,2}. A ultrassonografia endovaginal (USV) e a histeroscopia são métodos complementares na investigação pré-operatória e não-alternativas no planejamento da cirurgia histeroscópica. A USV fornece a informação da distância mínima entre a serosa e o mioma e a presença de outros achados, como adenomiose, o que pode influenciar na escolha do tratamento^{1,2}.

Pasqualotto et al.¹⁷ investigaram diagnósticos pré-operatórios em 375 mulheres tratadas por SUA, para validar a acurácia pré-operatória de histeroscopia diagnóstica, USV e biópsia de endométrio. As principais doenças encontradas por esses autores foram: 172 pólipos (45,9%) e 105 miomas (28%). A sensibilidade e especificidade para miomas e pólipos foram, na histeroscopia, 100 e 99%, na USV 74 e 39% e biópsia endometrial (Pipelle) 24 e 10%, respectivamente.

Farquhar et al.¹⁸ relataram, a partir de uma metanálise com 19 trabalhos comparando USV, histerossonografia e histeroscopia em pacientes com SUA que a histeroscopia e a histerossonografia têm excelente capacidade diagnóstica para miomas submucosos. A USV, entretanto, seria um exame subótimo para diagnóstico de mioma submucoso.

Birinyi et al.³ diagnosticaram 110 miomas submucosos em 835 histeroscopias e mostraram a alta acurácia desse método para o diagnóstico de miomas e pólipos, tendo como referência o resultado histopatológico (Tabela 2).

Tabela 2 - Acurácia da histeroscopia diagnóstica nas doenças endometriais

	Sensibilidade	Especificidade	VPN	VPP
Hiperplasia	0,52	0,92	0,95	0,35
Pólipo	0,87	0,89	0,96	0,66
Mioma	0,85	0,98	0,98	0,66
Câncer	0,68	0,99	0,99	0,68
Atrofia	0,73	0,96	0,99	0,44

Fonte: Birinyi et al.³

VPN: valor preditivo negativo; VPP: valor preditivo positivo.

Câncer e hiperplasia

Quando se considera o diagnóstico de câncer e hiperplasia simples, a visão histeroscópica apresenta elevada acurácia na identificação da doença, mas não é método adequado para excluir a presença de câncer de endométrio e hiperplasia simples, visto que a razão de probabilidade negativa não é baixa o suficiente, sendo necessário a complementação diagnóstica com a histologia^{3,9}.

A dificuldade do diagnóstico de hiperplasia, simples ou complexa, do ponto de vista histeroscópico, deve-se, segundo alguns autores^{3,7,9}, à complexidade de se estudar um tecido que sofre variações naturais frequentes (endométrio secretor/ovulatório/ proliferativo/pré-menstrual) e que também é suscetível de ser alterado por medicações usadas pela paciente e/ou doenças, como a endometrite, influenciando enormemente na visão macroscópica.

Há ainda preocupação com a disseminação de células malignas para a cavidade uterina em função da pressão intracavitária que é utilizada na histeroscopia. Ao longo da última década, entretanto, vários estudos metodologicamente bem estruturados concluíram que o fluido da histeroscopia, o qual alcança a cavidade abdominal, não influencia no prognóstico da doença¹⁹.

Lesões pré-neoplásicas de endométrio, como as hiperplasias (simples ou complexas, com ou sem atipias), são também causas comuns de SUA. As hiperplasias à histeroscopia apresentam-se como lesões em que há aumento da espessura do endométrio pelo acúmulo irregular de glândulas, aumento da vascularização, dilatações císticas e aspecto polipóide^{1,2}.

Garutti et al.⁸, analisando 1.500 histeroscopias, encontraram diferentes graus de acurácia entre elas quanto a algumas doenças intracavitárias – baixa acurácia (57,2%) para as hiperplasias e alta para os pólipos endometriais (95%).

Lasmar et al.²⁰, na avaliação de 4.054 histeroscopias, estabeleceram sensibilidade de 80% para o câncer de endométrio e 56% para a hiperplasia, ao passo que a especificidade para o

câncer chegou a 99% para o câncer e 89% para a hiperplasia. Os autores acreditam que o fato se deve, possivelmente, aos achados histeroscópicos de alterações morfológicas, vasculares e de consistência das lesões suspeitas de hiperplasias não serem suficientes para a conclusão diagnóstica, havendo necessidade da biópsia para o diagnóstico definitivo. Ressaltaram, ainda, que o grande diferencial da histeroscopia em relação à histerossonografia e ultrassonografia é justamente a possibilidade da biópsia direta sob visão.

Uma revisão de 65 estudos envolvendo 26.346 pacientes com o objetivo de determinar a acurácia da histeroscopia isoladamente para diagnóstico de hiperplasia e câncer endometrial mostrou que, para câncer, ela é alta e para hiperplasia é modesta⁹. Quando a cavidade uterina é adequadamente visualizada, a histeroscopia é extremamente acurada no diagnóstico de câncer endometrial, mas não consegue excluí-lo adequadamente. A capacidade diagnóstica não parece ser influenciada pela ocorrência de menopausa. O aspecto da hiperplasia dificulta a interpretação da visão histeroscópica, mas nem por isso a histeroscopia deixa de ser importante, pois é complementar à análise histológica, fornece amostras globais das lesões e biópsias diretas das lesões focais e melhora sensivelmente a acurácia diagnóstica.

Conclusões

A histeroscopia é importante método propedêutico nas alterações endometriais, que permite avaliação da cavidade uterina e realização de biópsias dirigidas com baixa incidência de complicações. Embora apresente elevada sensibilidade e especificidade na identificação de lesões intracavitárias benignas, como os pólipos e os miomas, a visão histeroscópica deixa a desejar quando se trata de hiperplasia e câncer endometrial. Não há, até o momento, consenso na literatura entre a descrição da lesão vista à histeroscopia e os achados histológicos. Dessa forma, o exame histeroscópico deve ser complementado pela avaliação histológica.

Referências bibliográficas

1. Hamou JE. Hysteroscopy and microcolposcopy: text and atlas. East Norwalk: Appleton & Lange, 1991.
2. Bakour SH, Jones SE, O'Donovan P. Ambulatory hysteroscopy: evidence-based guide to diagnosis and therapy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006;20(6):953-975.
3. Birinyi L, Daragó P, Török P, Csiszár P, Major T, Borsos A, et al. Predictive value of hysteroscopic examination in intrauterine abnormalities. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;115(1):75-9.
4. Gimpelson RJ, Rappold HO. A comparative study between panoramic hysteroscopy with directed biopsies and dilatation and curettage. A review of 276 cases. *Am J Obstet Gynecol*. 1988;158(3 Pt 1):489-92.
5. Bettocchi S, Ceci O, Vicino M, Marelló F, Impedovo L, Selvaggi L. Diagnostic inadequacy of dilatation and curettage. *Fertil Steril*. 2001;75(4):803-5.
6. Ceci O, Bettocchi S, Pellegrino A, Impedovo L, Di Venere R, Pansini N. Comparison of hysteroscopic and hysterectomy findings for assessing the diagnostic accuracy of office hysteroscopy. *Fertil Steril*. 2002;78(3):628-31.
7. de Wit AC, Vleugels MP, de Kruif JH. Diagnostic hysteroscopy: a valuable diagnostic tool in the diagnosis of structural intra-cavitary pathology and endometrial hyperplasia or carcinoma?. Six years of experience with non-clinical diagnostic hysteroscopy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003;110(1):79-82.

8. Garuti G, Sambruni I, Colonnelli M, Luerti M. Accuracy of hysteroscopy in predicting histopathology of endometrium in 1500 women. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 2001;8(2):207-13.
9. Clark TJ, Voit D, Gupta JK, Hyde C, Song F, Khan KS. Accuracy of hysteroscopy in the diagnosis of endometrial cancer and hyperplasia: a systematic quantitative review. *JAMA.* 2002;288(13):1610-21.
10. Angioni S, Loddo A, Milano F, Piras B, Minerba L, Melis GB. Detection of benign intracavitary lesions in postmenopausal women with abnormal uterine bleeding: a prospective comparative study on outpatient hysteroscopy and blind biopsy. *J Minim Invasive Gynecol.* 2008;15(1):87-91.
11. Savelli L, De Iaco P, Santini D, Rosati F, Ghi T, Pignotti E, et al. Histopathologic features and risk factors for benignity, hyperplasia, and cancer in endometrial polyps. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188(4):927-31.
12. Fernández-Parra J, Oliver AR, Criado SL, Fernández FP, Ventoso FM. Hysteroscopic evaluation of endometrial polyps. *Int J Gynaecol Obstet.* 2006;95(2):144-48.
13. Lieng M, Qvigstad E, Sandvik L, Jørgensen H, Langebrekke A, Istre O. Hysteroscopic resection of symptomatic and asymptomatic endometrial polyps. *J Minim Invasive Gynecol.* 2007;14(2):189-94.
14. Antunes A Jr, Costa-Paiva L, Arthuso M, Costa JV, Pinto-Neto AM. Endometrial polyps in pre- and postmenopausal women: factors associated with malignancy. *Maturitas.* 2007;57(4):415-21.
15. de Sá Rosa e de Silva AC, Rosa e Silva JC, Cândido dos Reis FJ, Nogueira AA, Ferriani RA. Routine office hysteroscopy in the investigation of infertile couples before assisted reproduction. *J Reprod Med.* 2005;50(7):501-6.
16. Pérez-Medina T, Bajo-Arenas J, Salazar F, Redondo T, Sanfrutos L, Alvarez P, et al. Endometrial polyps and their implication in the pregnancy rates of patients undergoing intrauterine insemination: a prospective, randomized study. *Hum Reprod.* 2005;20(6):1632-5.
17. Pasqualotto EB, Margossian H, Price LL, Bradley LD. Accuracy of preoperative diagnostic tools and outcome of hysteroscopic management of menstrual dysfunction. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 2000;7(2):201-9.
18. Farquhar C, Ekeroma A, Furness S, Arroll B. A systematic review of transvaginal ultrasonography, sonohysterography and hysteroscopy for the investigation of abnormal uterine bleeding in premenopausal women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003;82(6):493-504.
19. Vilos GA, Edris F, Al-Mubarak A, Ettler HC, Hollett-Caines J, Abu-Rafea B. Hysteroscopic surgery does not adversely affect the long-term prognosis of women with endometrial adenocarcinoma. *J Minim Invasive Gynecol.* 2007;14(2):205-10.
20. Lasmar RB, Barrozo PR, de Oliveira MA, Coutinho ES, Dias R. Validation of hysteroscopic view in cases of endometrial hyperplasia and cancer in patients with abnormal uterine bleeding. *J Minim Invasive Gynecol.* 2006;13(5):409-12.

Recebido em: 16/07/2008

Aprovado para publicação: 08/10/2008

Efeito da terapia hormonal de baixa dose com norgestimato na densidade mamográfica de mulheres na pós-menopausa

Effect of low-dose hormone therapy with norgestimate in mammographic breast density of post-menopausal women

Ana Maria Nogueira Silva¹, Maria Bethânia da Costa Chein², Luciane Maria Oliveira Brito³, Brainerd Bernardes Pinto Bandeira⁴, Sofia Andrade Calderoni⁴, Luiz Gustavo Oliveira Brito⁵, Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro⁶



A Doutora Ana Maria Nogueira da Silva é médica formada pela Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Tem mestrado em Saúde Materno Infantil pela UFMA. É especialista em ginecologia e obstetrícia e atua na área de ultrassonografia.

Resumo

Objetivo: avaliar mudanças no padrão da densidade mamográfica (DM) de mulheres na pós-menopausa, após um ano de utilização de terapia estroprogestativa de baixa dose com uso intermitente de norgestimato (NMG). **Material e métodos:** estudo prospectivo com 40 pacientes menopausadas, divididas em dois grupos: tratado (n=20) usando 1 mg de 17-beta-estradiol diariamente e 90 mcg de NMG, de forma intermitente (três dias utilizando e três dias não); e controle (placebo). As mamografias foram realizadas antes e depois de 12 meses do início do tratamento. A DM foi aferida por dois métodos qualitativos (classificação de Wolfe e do Breast Imaging Reporting and Data System – BIRADS) por dois observadores. A variabilidade interobservador foi considerada baixa nas duas classificações, assim como houve ótima concordância entre os dois métodos. Os testes *t* de Student e McNemar foram utilizados para, respectivamente, comparação de médias e variáveis binomiais. **Resultados:** ambos os grupos foram considerados homogêneos quanto à idade, índice de massa corpórea, idade da menarca e da menopausa, duração do menacme, tempo de menopausa e paridade. Após 12 meses de seguimento, uma paciente (5%) do Grupo de Estudo e duas pacientes do Grupo Controle (10%) apresentaram aumento da densidade mamária de acordo com a classificação de Wolfe, sem diferença significativa entre os grupos. Observou-se aumento da densidade mamária, de acordo com a classificação de BIRADS em duas pacientes (10%) do Grupo de Estudo e três pacientes do Grupo Controle (15%), sem diferença significativa entre os grupos. **Conclusões:** a terapia hormonal de baixa dose com uso intermitente de NMG não foi associada com aumento de densidade mamária após 12 meses de tratamento, ratificando literatura corrente.

Unitermos: Mamografia; Densidade mamária; Terapia de reposição hormonal.

Abstract

Objective: to assess the effects between non-treatment (placebo group) and a low dosage estrogen-progestin regimen with norgestimate on changes in mammographic breast density (BD) in postmenopausal women after 12 months of hormone therapy. **Material and methods:** a prospective study was performed with 40 postmenopausal patients, divided into two groups: treated (n=20) using beta-estradiol 1 mg daily plus intermittent

Ambulatório de Climatério do Hospital Universitário Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – São Luís (MA), Brasil.

¹ Professora do Instituto Superior de Educação Continuada (Isec); Mestre em Saúde Materno-Infantil do Programa de Pós-graduação em Saúde Materno-Infantil (PPGMSMIN) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – São Luís (MA), Brasil.

² Professora Doutora da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Medicina III da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – São Luís (MA), Brasil.

³ Professora-associada da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Medicina III da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – São Luís (MA), Brasil.

⁴ Bolsistas do Programa de Implementação de Bolsas de Iniciação Científica (Pibic) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Acadêmicos de Medicina da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – São Luís (MA), Brasil.

⁵ Residente do Setor de Mastologia e Oncologia Ginecológica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

⁶ Professora Doutora do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Luciane Maria Oliveira Brito – Rua Frei Querubim, 59 – Apicum – Centro – CEP 65025-420 – São Luís/MA – Fone: (98) 3231-7410 – E-mail: luciane2406@yahoo.com.br

norgestimate (NGM) 90 micro g (three days off, three days on); and control (placebo). The mammograms were done before and after a 12-month period of hormone therapy and BD between the two exams in each group was compared. BD was measured by two qualitative methods (Wolfe and Breast Imaging Reporting and Data System – BIRADS classification) by two different observers. T-student test was used for means and McNemar test for binomial variables. **Results:** both groups were considered homogeneous according to age, menarche, menopause and menacme duration's, parity and body mass index (BMI). After a 12-month follow-up period, one patient (5%) from the Treated Group and two patients (10%) from the Control Group presented an increase of BD according to Wolfe classification, without statistical difference between them. Similarly, it was observed an increase in BD according to BIRADS classification in two patients (10%) from the Treated Group and three patients (15%) from the Control Group, with no statistical difference. **Conclusions:** low dosage hormone therapy with NGM was not associated with increased BD after 12 months of treatment, supporting current literature.

Uniterms: Mammography; Breast density; Hormone replacement therapy.

Introdução

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres. Mais da metade dos novos casos ocorre em países desenvolvidos¹. Para o ano de 2008 no Brasil são estimados 49.400 novos casos, com risco de 51/100 mil mulheres/ano¹.

A mamografia é o exame mais simples e eficaz para a detecção precoce do câncer de mama, detectando-o, em alguns casos, anos antes de seu diagnóstico clínico². Sua sensibilidade varia na dependência de diversos fatores, destacando-se a densidade mamográfica (DM), que está diretamente relacionada com a idade cronológica da mulher e, por conseguinte, da composição da mama, que apresenta uma quantidade variável de tecido adiposo, conjuntivo e glandular³.

A DM aumenta proporcionalmente com a quantidade de tecido fibroglandular em atividade, em resposta ao estímulo hormonal proveniente, sobretudo, da função ovariana³. Nas mulheres jovens, há predomínio de tecido fibro-ducto-glandular, que radiologicamente é expresso por DM elevada.

Durante o climatério, ocorre uma diminuição da atividade folicular ovariana, resultando em um declínio contínuo na produção de estradiol pelos ovários. Nos tecidos e órgãos que sofrem ação deste hormônio ocorre uma diminuição gradativa de sua atividade proliferativa. Nas mamas, instala-se um processo de substituição do tecido fibro-ducto-glandular pelo tecido adiposo (lipossustituição), cuja velocidade de instalação varia de pessoa a pessoa⁴. A capacidade de retenção hídrica, induzida ou não por hormônios, também estaria relacionada ao aumento da DM, o que explicaria o fato de que algumas mulheres na pós-menopausa, mesmo sem reposição hormonal, possuem mamas densas.

O primeiro a postular a associação entre câncer de mama e DM foi Wolfe em 1976⁵. Baseado na proporção dos tecidos que compõem a mama, Wolfe classificou a DM em quatro padrões, baseados na relação ducto/glândula, graduados em percentuais. O padrão mamográfico denso, além de diminuir a sensibilidade

e a especificidade do exame, provoca retardo no diagnóstico do câncer de mama e é considerado fator de risco para o seu desenvolvimento⁴⁻¹². Vários estudos⁶⁻¹⁶ demonstraram, por meio de exames mamográficos, associação positiva entre terapia hormonal (TH) e DM, embora se saiba da pluralidade etiopatogênica do câncer de mama.

A Sociedade Internacional de Menopausa (IMS) publicou, em 2007, um consenso sobre a utilização da TH no climatério, recomendando doses mais baixas do que as usadas até então e destacando a necessidade de pesquisas adicionais com diferentes esquemas e vias de administração¹⁷.

A utilização da TH de baixa dose com norgestimate (NMG) é bem descrita na literatura atual^{18,19}. Rozenberg²⁰ identificou em usuárias deste esquema um alívio nos sintomas vasomotores, diminuição de sangramentos uterinos, ausência de hiperplasia endometrial, efeitos benéficos sobre os lipídeos e excelente tolerabilidade. Curran e Wagstaff¹⁸ acrescentaram que, além de ser uma terapia eficiente para alívio dos sintomas climatéricos e de boa tolerabilidade, atuam diminuindo a perda óssea. Gelfand et al.²¹ concluíram que esta terapia realmente melhora a qualidade de vida, sendo bem tolerada entre suas usuárias. Contudo, como na maioria das TH's de baixa dose, existem muito poucos trabalhos estudando o seu efeito sobre a DM.

O presente estudo objetiva avaliar as potenciais mudanças no padrão da DM de mulheres na pós-menopausa, após um ano de utilização de terapia estroprogestativa, contendo 1 mg de 17 beta-estradiol (uso contínuo) e 90 mcg de NMG, administrado de forma intermitente (três dias utilizando e três dias não), comparando-a com um Grupo Controle (placebo).

Material e métodos

Foi realizado um estudo prospectivo e não-randomizado de pacientes provenientes do Ambulatório de Climatério do Hospital Universitário Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), durante um período de 12 meses (janeiro

a dezembro de 2005). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da UFMA sob o nº 320/2004.

Foram selecionadas mulheres na pós-menopausa (mediana de cinco anos de duração da menopausa) que apresentavam como critérios de inclusão a indicação de TH combinada estroprogestativa em função de queixas vasomotoras (fogachos associados ou não à sudorese e insônia) e/ou urogenitais, decorrentes de atrofia. Todas as pacientes foram submetidas a exames laboratoriais, colpocitologia oncológica, ultrassonografia transvaginal e mamografia simples bilateral, cuja normalidade permitia a utilização de TH estroprogestativa.

Foram excluídas aquelas com menopausa cirúrgica e/ou precoce, histerectomizadas, tabagistas, com antecedentes de hepatopatias, endocrinopatias, eventos tromboembólicos, doenças cardiovasculares (acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio, hipertensão arterial sistêmica não-controlada), usuárias de qualquer medicação hormonal nos últimos 12 meses e/ou com antecedentes familiares de 1º grau para câncer de mama, ovário e endométrio.

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foi oferecida a realização de TH a todas as pacientes selecionadas. Aquelas que concordaram em utilizar a TH, constituíram o Grupo Tratado (15 comprimidos de 1 mg de 17 beta-estradiol + 15 comprimidos de 1 mg de beta-estradiol e 90 mcg de NMG) e aquelas que não a aceitaram, integraram o Grupo Controle (utilização de placebo). Foram inicialmente incluídas 62 pacientes para participarem do presente estudo, sendo 32 no Grupo de Estudo e 30 no Grupo Controle. Vinte e duas pacientes interromperam a sua participação no estudo antes de completar os 12 meses de tratamento (dez pacientes abandonaram o seguimento sem justificativa e 12 em virtude do aparecimento de efeitos adversos associados ou não a TH). Ao final de 12 meses de seguimento 40 pacientes, 20 em cada grupo, concluíram o estudo. Verificou-se nos dois grupos um percentual maior de mulheres com parceiro, tempo de escolaridade maior que quatro anos e de cor negra/parda.

Utilizou-se uma ficha protocolo para registro das seguintes variáveis: idade, idade da menarca, paridade, idade da menopausa, duração do menacme e índice de massa corpórea (IMC).

A DM foi analisada em dois momentos: inicial (basal) e 12 meses após o início do seguimento. As mamografias foram analisadas em incidência médio-lateral oblíqua e crânio-caudal, perfazendo um total de 160 imagens analisadas. As imagens foram realizadas no mesmo Serviço, pela responsabilidade de um mesmo técnico de radiologia. A DM foi aferida segundo dois métodos qualitativos: Sistema BI-RADS – Breast Imaging

Reporting and Data System (composição 1: mama lipossubstituída; 2: mama moderadamente densa; 3: mama heterogeneamente densa; 4: mama extremamente densa)²² e Classificação de Wolfe⁵ (Quadro 1). Após 12 meses de seguimento, a DM foi classificada de acordo com a sua evolução em: aumentada, diminuída e inalterada.

Ao final do seguimento, dois médicos radiologistas avaliaram as mamografias das 40 pacientes que concluíram o estudo, comparando-as antes e depois de 12 meses, desconhecendo a que grupo a paciente em questão pertencia, bem como em qual momento (inicial ou ao término do seguimento) o exame havia sido realizado. Para tal, as mamografias foram numeradas de 1 até 40. O controle desta identificação ficou sob guarda dos pesquisadores responsáveis pelo projeto.

Para avaliar a concordância entre os achados radiológicos obtidos pelos dois observadores, utilizou-se o teste de kappa²³, cujos valores são: <0,0=ruim; 0,21-0,40=sofrível; 0,41-0,60=regular; 0,61-0,80=boa; 0,81-0,99=ótima; >1,00=perfeita).

Os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística utilizando o programa Epi-Info, versão 3.2.2. Os valores foram apresentados em números inteiros e relativos, médias e desvios padrão. Foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman para verificar a associação da DM com a idade, duração de menacme e menopausa, idade da menarca e IMC. O teste *t* de Student foi usado para comparar os grupos e o teste de McNemar também foi realizado para avaliar se houve diferença estatística na DM dentro de cada grupo após o seguimento de um ano. Todos os testes foram feitos considerando $p < 0,05$.

Resultados

A Tabela 1 sintetiza as características clínicas gerais dos dois grupos estudados, previamente ao início do estudo, potencialmente passíveis de interferir com a densidade mamária. Verificou-se que os grupos foram homogêneos em relação a todas as variáveis estudadas (idade, IMC, idade da menarca e da menopausa, duração do menacme, tempo de menopausa e paridade). O IMC

Quadro 1 - Classificação de Wolfe para DM

Categoria	Padrão de densidade mamográfica
N1	Predominantemente adiposo composto quase inteiramente por gordura
P1	Fibro-ducto-glandular com ductos proeminentes ocupando até um quarto (menor que 25%) do seu volume
P2	Fibro-ducto-glandular com ductos proeminentes ocupando mais que um quarto (maior ou igual que 25%) do seu volume
DY	Fibro-ducto-glandular ocupando quase toda a mama com áreas densas nodulares

Fonte: Wolfe (1976).

N=normal; P=proeminente; DY=displasia/radio-opaca.

não se modificou significativamente após 12 meses de seguimento nos dois grupos estudados (Grupo Controle: 25,04±2,76 e Grupo de Estudo: 25,72±4,23).

A DM inicial não apresentou correlação com a duração do menacme e menopausa, paridade e IMC nos dois grupos avaliados. Observou-se correlação negativa com a idade.

Previamente ao início do estudo, observou-se que a DM, segundo a classificação de BI-RADS, da maioria das pacientes do Grupo Tratado (13 de 20 pacientes, 65%), pertenceu à composição 1, ao passo que quase metade das pacientes do Grupo Controle (9 de 20 pacientes, 45%), pertenciam à composição 2. Após 12 meses de seguimento, não houve alteração estatisticamente significativa da DM nos dois grupos, ao dividir a DM em mamas densas e não-densas (Tabela 1).

Segundo a classificação de Wolfe, 60% (12 de 20 pacientes) das pacientes do Grupo Tratado apresentavam um padrão N1, ao

passo que 40% das mulheres do Grupo Controle apresentavam um padrão P1; contudo, não houve diferença estatisticamente significativa ao agrupar-se a DM em dois grupos (densas – P2/DY e não-densas – N1/P1) (Tabela 1).

Houve um aumento da DM em uma paciente no Grupo Tratado e duas pacientes no Grupo Controle durante um ano de seguimento, segundo a classificação de BI-RADS. Quanto à análise pela classificação de Wolfe, duas pacientes sofreram aumento da DM no Grupo Tratado, enquanto três pacientes do Grupo Controle apresentaram ganho na DM (Tabela 2).

O valor médio do kappa encontrado para a análise da DM pelas classificações de Wolfe e BI-RADS foram, respectivamente, 0,811 e 0,870, significando baixa variabilidade interobservador. A concordância entre os dois métodos foi considerada boa ($k=0,765$).

Discussão

Neste estudo, foi observado que a utilização de terapia estroprogestativa de baixa dose, com o uso intermitente de NMG, não alterou a DM de pacientes na pós-menopausa após 12 meses consecutivos de utilização, segundo análise por dois métodos qualitativos (Classificação de BI-RADS e de Wolfe).

Vários estudos⁶⁻¹⁶ demonstraram associação positiva entre diferentes esquemas de TH e o aumento da DM de suas usuárias. Existem estudos randomizados e controlados evidenciando um aumento maior do risco relativo e absoluto de câncer de mama entre as usuárias de TH combinada, quando comparadas às usuárias de estrogênioterapia isolada¹⁶, sugerindo um potencial papel dos progestágenos na carcinogênese mamária. Há também estudos mostrando que o aumento da DM parece ser mais proeminente nas usuárias de

Tabela 1 - Comparação entre as características clínicas iniciais das pacientes do Grupo Tratado (1 mg de 17 beta estradiol contínuo e 90 mcg de NMG intermitente) e Grupo Controle

Variáveis	Basal		Valor de p
	Grupo Tratado (n=20)	Grupo Controle (n=20)	
Idade (anos)	49,05±7,53	52,10±4,59	0,13
IMC (kg/m ²)	25,21±4,25	25,11±3,02	0,93
Idade da menarca (anos)	12,35±1,46	12,25±1,71	0,84
Idade da menopausa (anos)	45,5±5,06	47,15±2,66	0,20
Tempo de menopausa (anos)	3,55±3,35	5,45±4,12	0,12
Duração do menacme (anos)	33,15±5,46	34,9±2,9	0,20
Paridade (número de filhos)	2±1,66	2±1,66	1,00

Diferença significativa se $p<0,05$ (teste t de Student, valores expressos como média± desvio padrão); A paridade foi expressa em mediana e desvio padrão.

Tabela 2 - Classificação do padrão de DM segundo o Colégio Americano de Radiologia (BI-RADS 1, 2, 3, 4) e Wolfe (N1, P1, P2, NY) antes e ao término de 12 meses de seguimento das pacientes do Grupo Tratado (1 mg de 17 beta estradiol contínuo e 90 mcg de NMG intermitente) e Grupo Controle

Densidade mamográfica	Grupo Tratado		Valor de p	Grupo Controle		Valor de p
	Basal	12 meses		Basal	12 meses	
	n/%	n/%		n/%	n/%	
BI-RADS						
Composição 1	13/65	10/50	1,00	4/20	6/30	1,00
Composição 2	5/25	7/35		9/45	8/40	
Composição 3	2/10	2/10		5/25	6/30	
Composição 4	0/0	1/5		2/10	0/0	
Classificação de Wolfe						
N1	12/60	11/55	0,68	5/25	6/30	0,54
P1	5/25	6/30		8/40	10/50	
P2	3/15	3/15		6/30	4/20	
DY	0/0	0/0		1/5	0/0	

p=teste de McNemar com correção de Yates agrupando-se a classificação BI-RADS em 1 e 2 (não-densas), 3 e 4 (densas); Wolfe, N1-P1 (não-densas), P2-DY (densas).

esquemas combinados contínuos, quando comparados ao uso cíclico²⁴.

Tais achados despertaram maior atenção para os progestágenos, inicialmente delegados a um segundo plano na TH clássica, associados à estrogenerioterapia nas pacientes com útero, com o objetivo primordial de prevenir a hiperplasia e o carcinoma endometrial. Assim, despertou-se a atenção ao sentido de elaboração de novas formulações de TH, contendo diferentes tipos de progestágenos e distintas formas de administração, com o objetivo de prevenir ou minimizar os variados efeitos adversos associados aos progestágenos.

Atualmente, recomenda-se, para as mulheres na pós-menopausa com indicação de TH, a utilização de menores doses hormonais passíveis de promoverem o alívio sintomático, as quais motivam seu uso¹⁷. Neste sentido, citamos uma formulação diferenciada de TH, constituída por 30 comprimidos, sendo 15 com 1 mg de 17-beta-estradiol e 15 com 1 mg de 17-beta-estradiol associado a 90 mcg de NMG, habitualmente utilizando-se três comprimidos de cada um dos dois esquemas, de forma contínua. Este esquema visa promover os benefícios secundários à estrogenerioterapia contínua, minimizando aqueles secundários ao uso contínuo dos progestogênios. Todavia, até o presente momento, não há estudos avaliando as modificações da DM em usuárias deste esquema específico de reposição hormonal, utilizando baixa dose de estrogênio e administração intermitente de progestagênio (NMG) a cada três dias.

Verificou-se que os grupos foram homogêneos em relação a todas as variáveis basais estudadas (idade, IMC, idade da menarca e da menopausa, duração do menacme, tempo de menopausa e paridade), que, potencialmente, poderiam interferir com a DM, e que não houve mudança significativa do IMC durante o estudo, minimizando o impacto de variáveis passíveis de introduzir vieses na interpretação dos dados obtidos.

A DM inicial não apresentou correlação com a duração do menacme e da menopausa, paridade e IMC nos dois grupos avaliados. Observou-se correlação negativa com a idade, confirmando os achados previamente publicados.

Foi verificado nesta pesquisa que, no início do seguimento, a maioria das pacientes de ambos os grupos apresentavam mamas predominantemente adiposas (85% das pacientes do Grupo Tratado e 65% das pacientes do Grupo Controle). Não foram observadas mudanças significativas após 12 meses de seguimento, quando comparadas as variações na DM do Grupo Tratado e Controle. No Grupo Tratado, a maioria das pacientes permaneceu com DM na composição 1 (segundo a classificação BI-RADS; 80% das pacientes) ou na categoria de mamas não-densas (N1 ou P1, segundo Wolfe; 75% das pacientes). No Grupo Controle, também não ocorreram

mudanças significativas na DM ao longo dos 12 meses de seguimento.

Utilizando a classificação de Wolfe, observou-se um aumento da DM em três pacientes, sendo uma (5%) no Grupo Tratado e duas (10%) no Grupo Controle, sem diferença significativa. Segundo a classificação de BI-RADS, detectou-se aumento da DM em cinco pacientes estudadas, sendo duas (10%) no Grupo Tratado e três (15%) no Grupo Controle, sem diferença estatisticamente significativa. A percentagem de casos que evoluíram com aumento da DM após 12 meses de TH, foi similar à descrita por outros autores, utilizando diferentes esquemas de TH. Junkermann et al.¹⁵, comparando os efeitos de dois tipos de TH sobre os padrões mamográficos, observaram que tanto as usuárias de TH contínua de baixa dose (1 mg de 17β-E2 e 0,5 mg de acetato de noretisterona), como as de esquema sequencial (0,625 mg de estrogênios equinos conjugados e 5 mg de acetato de medroxiprogesterona), apresentaram aumento de 30% na DM. Após nove meses de seguimento, Christodoulakos et al.²⁵, avaliando o efeito de três diferentes regimes de TH (Grupo 1: 2 mg de estradiol – E2 + 1 mg de acetato de noretisterona – NETA; Grupo 2: 0,625 mg de estrogênio conjugados equinos – EEC + 5 mg de acetato de medroxiprogesterona – AMP; Grupo 3: 1 mg de E2 + 0,5 mg de NETA) sobre a DM, observaram aumento da DM nos três grupos, após 12 meses de tratamento (31,8% no Grupo 1, 13,2% no Grupo 2 e 12,2%, respectivamente nos Grupos 1, 2 e 3).

Os dois métodos qualitativos utilizados para a análise da DM (Classificação de BI-RADS e de Wolfe) apresentaram boa concordância. Contudo, alguns autores defendem a utilização de métodos quantitativos, em substituição aos métodos qualitativos, entre os quais são citados os dois empregados no presente estudo, por serem considerados mais subjetivos.

Os critérios de Wolfe foram inicialmente criados para avaliar risco de câncer e não a densidade mamária. Porém, não existem critérios universalmente aceitos para a sua análise, e uma forma qualitativa de se utilizá-la é usando sua classificação. Um estudo recentemente publicado por Silvério et al.²⁶, comparando a densidade mamária antes e após seis meses de uso de raloxifeno, avaliada por um método qualitativo (BI-RADS) e um quantitativo (digitalização da imagem), evidenciou um fraco valor de concordância ($k=0,25$) entre a classificação de BI-RADS e a digitalização de imagem. A análise da DM pela digitalização das imagens evidenciou uma elevação da DM em quatro pacientes do Grupo Tratado e cinco pacientes do Grupo Controle, de um total de 40 pacientes por grupo avaliado, o que não foi identificado pela avaliação da DM pelo método qualitativo, diferentemente do que foi observado no presente estudo. Outra limitação do estudo é o tamanho amostral, que seria necessário um grupo

maior de pacientes para tornar tais conclusões mais confiáveis. Dessa forma, são necessários outros estudos com maiores casuísticas para confirmar se realmente os métodos quantitativos apresentam melhor acurácia diagnóstica e devam ser mais largamente utilizados.

Agradecimentos

Ao fomento concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processos no. 108321/2004-5 e 108320/2004-9.

Referências bibliográficas

1. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Estimativa 2008: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2008. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp>>. Acesso em: 20 jan. 2008.
2. American Cancer Society. Statistics for 2007 – Breast Cancer Facts & Figure, 2007. Disponível em: <http://www.cancer.org/docroot/stt/stt_o.asp>. Acesso em: 23 jun. 2007.
3. Fernandes CE, Baracat EC, Lima GR. Climatério: manual de orientação. São Paulo: Ponto, 2004.
4. Figueira RNM, Santos AI, Camargo ME, Koch HA. Fatores que influenciam o padrão radiológico de densidade das mamas. *Radiol Bras*. 2003;36(5):287-92.
5. Wolfe JN. Breast patterns as an index of risk for developing breast cancer. *Am J Roentgenol*. 1976;126(6):1130-7.
6. Greendale GA, Reboussin BA, Sie A, Singh HR, Olson LK, Gatewood O, et al. Effects of estrogen and estrogen-progestin on mammographic parenchymal density. Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Investigators. *Ann Intern Med*. 1999;130(4 Pt 1):262-9.
7. van Gils CH. Mammographic density and breast cancer risk. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999;86(2):127-8.
8. Day N, Warren R. Mammographic screening and mammographic patterns. *Breast Cancer Res*. 2000;2(4):247-51.
9. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, et al. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 2003;289(24):3243-53.
10. Boyd NF, Martin LJ, Li Q, Sun L, Chiarelli AM, Hislop G, et al. Mammographic density as a surrogate marker for the effects of hormone therapy on risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(5):961-6.
11. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, Sun L, Stone J, Fishell E, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med*. 2007;356(3):227-36.
12. Marchesoni D, Driul L, Lanni A, Fabini G, Della Martini M, Zuiani C, et al. Postmenopausal hormone therapy and mammographic breast density. *Maturitas*. 2006;53(1):59-64.
13. Araújo HR, Costa LOBF, Miranda NMM, Colares MCR. Densidade mamográfica em mulheres climatéricas e uso de terapia de reposição hormonal. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2004;26(7):563-71.
14. Siqueira RFCB, Bezerra-Sá DS, Pinto Neto AM, Cabello C, Conde DM, Paiva LHSC, et al. Fatores associados à densidade mamográfica de mulheres na pós-menopausa. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2004;26(1):45-52.
15. Junkermann H, von Holst T, Lang E, Rakov V. Influence of different HRT regimens on mammographic density. *Maturitas*. 2005;50(2):105-10.
16. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288(3):321-33.
17. Board of the International Menopause Society, Pines A, Sturdee DW, Birkhäuser MH, Schneider HP, Gambacciani M, et al. IMS updated recommendations on postmenopausal hormone therapy. *Climacteric*. 2007;10(3):181-94.
18. Curran MP, Wagstaff AJ. Spotlight on estradiol and norgestimate as hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Treat Endocrinol*. 2002;1(2):127-9.
19. Ylikorkala O, Wahlström T, Caubel P, Lane R. Intermittent progestin administration as part of hormone replacement therapy: long-term comparison between estradiol 1 mg combined with intermittent norgestimate and estradiol 2 mg combined with constant norethisterone acetate. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2002;81(7):654-60.
20. Rozenberg S. Clinical evidence supporting the rationale for constant oestrogen, intermittent progestogen hormone replacement therapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001;94(1):86-91.
21. Gelfand MM, Moreau M, Ayotte NJ, Hilditch JR, Wong BA, Lau CY. Clinical assessment and quality of life of postmenopausal women treated with a new intermittent progestogen combination hormone replacement therapy: a placebo-controlled study. *Menopause*. 2003;10(1):29-36.
22. American College of Radiology. Illustrated breast imaging reporting and data system (BI-RADS): mammography. 4th ed. American College of Radiology, Reston (VA), 2004.

23. Landis JR, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
24. Bülbül NH, Ozden S, Dayicioglu V. Effects of hormone replacement therapy on mammographic findings. *Arch Gynecol Obstet*. 2003;268(1):5-8.
25. Christodoulakos GE, Lambrinoudaki IV, Vourtsi AD, Vlachou S, Creatsa M, Panoulis KP, et al. The effect of low dose hormone therapy on mammographic breast density. *Maturitas*. 2006;54(1):78-85.
26. Silvério CD, Nahas-Neto J, Nahas EAP, Guazeelli MMO, Gomes MA, Dias R. Efeito do raloxifeno sobre a densidade mamográfica em mulheres na pós-menopausa. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007;29(10):525-31.

Recebido em: 28/08/2008

Aprovado para publicação em: 10/12/2008

Bloqueio da meiose sem aumento da incidência de anomalias meióticas

Blockage of meiosis without increase of meiotic abnormalities incidence

Elisa Melo Ferreira¹, Alessandra Aparecida Vireque², Paulo Roberto Adona³, Rui Alberto Ferriani⁴, Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro⁵



A Doutora Elisa Melo Ferreira é bióloga pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). É mestre em Ciências Médicas na área de concentração Biologia da Reprodução, pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Resumo

Objetivo: investigar o efeito da pré-maturação com o inibidor de maturação nuclear, butirolactona-I (BLI), sobre o fuso meiótico e distribuição cromossômica de oócitos bovinos, o que poderia melhorar a qualidade oocitária e embriogênese. **Material e métodos:** oócitos imaturos, obtidos de vacas abatidas em matadouro (n=610), foram subdivididos nos grupos: Controle (n=208), submetidos à maturação *in vitro* (MIV) em TCM 199, por 24 horas; BLI 18 horas (n=208) submetidos à pré-maturação com 100 µM de BLI, por 24 horas e posterior indução da MIV em TCM 199, por 18 horas; BLI 24 horas (n=195), pré-maturados com 100 µM de BLI, por 24 horas, seguida por 24 horas de MIV em TCM 199. Em seguida, os oócitos foram fixados, corados por imunofluorescência e avaliados. **Resultados:** o bloqueio meiótico ocorreu em 88,8% dos oócitos pré-maturados. As taxas de maturação foram similares (79,3; 73,5 e 82%, respectivamente, para Controle, BLI 18 horas e BLI 24 horas). Observou-se 82,5% oócitos normais em metáfase II no Controle e 80 e 82% nos grupos BLI 18 horas e BLI 24 horas, respectivamente. A incidência de anomalias meióticas não diferiu (17,5; 20 e 18%, respectivamente, para Controle, BLI 18 horas e BLI 24 horas) – $p < 0,05$, teste do χ^2 . **Conclusões:** a BLI bloqueia a meiose sem promover danos ao fuso meiótico e distribuição cromossômica oocitária após a MIV.

Unitermos: Meiose; Inibidores; Microtúbulos; Óvulo; Técnicas reprodutivas assistidas.

Abstract

Objective: to investigate the effect of the nuclear maturation inhibitor, butyrolactone-I (BLI), on the meiotic spindle and chromosomal configuration of bovine oocytes, which could increase the oocyte quality and embryogenesis. **Material and methods:** immature oocytes, obtained from cows slaughtered in abattoirs (n=610), were subdivided into the groups: Control (n=208), submitted to *in vitro* maturation (IVM) in TCM 199, for 24 hours; Group 2 (n=208), submitted to prematuration with 100 µM of BLI, for 24 hours and further induction of the IVM in TCM 199, for 18 hours; Group 3 (n=195), prematured with 100 µM of BLI for 24 hours, followed by 24 hours of IVM in TCM 199. Afterwards, the oocytes were fixed, stained using immunofluorescence staining and evaluated. **Results:** the meiotic arrest occurred in 88.8% of prematured oocytes. Maturation rates were similar (79.3; 73.5 and 82%, respectively for Control, BLI 18 hours and BLI 24 hours). It was observed 82.5% normal metaphase II oocytes in the Control Group and 80 and 82% in the groups BLI 18 hours and BLI 24 hours, respectively. The incidence of meiotic anomalies did not differ (17.5; 20 and 18%, respectively, for Control, BLI 18 hours and BLI 24 hours) – $p < 0,05$, χ^2 test. **Conclusions:** butyrolactone I arrests meiosis without promoting damage in oocyte meiotic spindle and chromosome distribution after IVM.

Uniterms: Meiosis; Inhibitors; Microtubules; Ovum; Reproductive techniques, assisted.

¹ Pós-graduanda do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

² Pós-graduanda do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

³ Pós-graduando do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (USP) – Pirassununga (SP), Brasil.

⁴ Professor Titular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

⁵ Professora doutora do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Avenida Bandeirantes, 3.900 – Monte Alegre – CEP 14049-00 – Ribeirão Preto/SP – Fone: (16) 3602-2821 – Fax: (16) 3633-0946 – E-mail: paasnavarro@uol.com.br

Fonte de auxílio: Elisa Melo Ferreira é bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

Introdução

Os programas de fertilização *in vitro* (FIV) nos laboratórios de todo o mundo, frequentemente, utilizam oócitos recuperados no estágio de maturidade plena (metáfase II), em detrimento daqueles recuperados em estádios menos avançados de desenvolvimento (prófase I e/ou metáfase I), para a obtenção dos embriões. Isso se explica pelo fato dos oócitos meioticamente competentes resultarem em taxas de gravidez superiores, após a fertilização¹. Entretanto, os oócitos imaturos recuperados durante o processo de captação constituem um pool de gametas que poderiam, potencialmente, ser utilizados para aumentar as chances da obtenção de uma gravidez por meio de tecnologias de reprodução assistida, após a realização da maturação *in vitro* (MIV)².

É possível utilizar a MIV em oócitos imaturos obtidos em ciclos não-estimulados ou em ciclos estimulados com gonadotrofinas. Em ciclos não-estimulados, a MIV apresenta diversas aplicabilidades clínicas, dentre as quais estão a prevenção da ocorrência da hiperestimulação ovariana pelo uso de indutores da ovulação e a diminuição dos custos do tratamento, pela diminuição ou abolição do uso de gonadotrofinas, o que facilitaria o acesso de casais com baixo poder econômico aos procedimentos de reprodução assistida, além de ser uma estratégia para a obtenção de oócitos com o objetivo de preservação da fertilidade, em pacientes a serem submetidas a procedimentos potencialmente esterilizantes. Nos ciclos estimulados com gonadotrofinas, esta estratégia poderia ser aplicada especialmente em casos, nos quais fossem obtidos predominantemente oócitos imaturos após punção folicular, na tentativa de se obter oócitos maduros para serem fertilizados *in vitro*.

Embora gravidezes e nascimentos terem sido alcançados após a maturação e FIV de oócitos humanos recuperados de pequenos folículos antrais³, as taxas de gravidez clínica e implantação embrionária são geralmente mais baixas do que aquelas obtidas utilizando-se a FIV convencional⁴. Acredita-se que as causas dos baixos resultados encontrados até o momento sejam secundárias à inadequada qualidade oocitária, decorrente, pelo menos em parte, da assincronia entre maturação nuclear e citoplasmática, promovida pela retirada dos oócitos do ambiente folicular inibitório e por possíveis danos ao fuso meiótico oocitário. Sabe-se que, se removidos do ambiente folicular, os oócitos de mamíferos retomam a meiose espontaneamente⁵ e, assim, apesar da ocorrência da maturação nuclear *in vitro*, esses oócitos frequentemente não adquirem maturação citoplasmática ou diferenciação terminal, pois o ambiente de cultura falha em recapitular a complexa sinalização e comunicação entre células somáticas e gaméticas, necessárias para que ela ocorra⁶.

A adaptação de um sistema de cultivo em duas etapas, ou seja, uma pré-maturação com um potente inibidor de retomada

da meiose, como a butirolactona-I (BLI)⁷, seguida pela indução da MIV, poderia aumentar a capacidade de desenvolvimento dos oócitos maturados *in vitro*. Em oócitos bovinos, embora eficazes em inibir a quebra da vesícula germinativa (VG) e promoverem a obtenção de taxas satisfatórias de produção de embriões *in vitro* até o estágio de blastocisto (30 a 40%), o uso desses inibidores não tem superado o percentual de produção dos sistemas de MIV convencionais, como seria de se esperar, uma vez que, hipoteticamente, tais sistemas favoreceriam a sincronização entre a maturação nuclear e citoplasmática⁸. Nesse contexto, a BLI destaca-se, pelo fato de demonstrar um bloqueio efetivo da quebra da VG em oócitos bovinos, após a retirada do ambiente folicular e cultivo *in vitro* e promover a formação de embriões com um potencial de desenvolvimento satisfatório, por meio da maturação, comparado com o controle⁷. Não se tem, contudo, dados conclusivos a respeito dos potenciais efeitos deste inibidor sobre o fuso meiótico oocitário.

O fuso meiótico de oócitos humanos em metáfase II é uma estrutura temporária e dinâmica, composta pelos microtúbulos. Os microtúbulos do fuso estão ligados aos cinetócoros dos cromossomos⁹ e, por isso, participam da segregação durante a meiose. Esse aparato meiótico é extremamente sensível a mudanças de temperatura¹⁰ e a outros tipos de perturbações como, manipulação oocitária¹¹ e exposição a agentes químicos presentes no ambiente¹². A despolimerização dos microtúbulos pode, potencialmente, deter o processo meiótico e levar à ocorrência de aneuploidias⁹. Sendo assim, o uso de inibidores da retomada da meiose, como a BLI, poderiam resultar em danos ao fuso meiótico e isso explicaria a razão dos resultados obtidos até o momento após a utilização do sistema de pré-maturação com essa droga não superarem aqueles obtidos na MIV convencional.

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da pré-maturação de oócitos bovinos com BLI sobre a progressão meiótica, a morfologia do fuso meiótico e a configuração cromossômica após MIV.

Material e métodos

Foi realizado um estudo experimental com oócitos bovinos. Os procedimentos experimentais foram realizados no laboratório de experimentação animal, nas dependências do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). O estudo foi dispensado de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP por não incluir atividades de biotério. Os meios de cultivo e reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA), exceto quando indicado. O inibidor BLI foi preparado como uma solução estoque de

50 μ M diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenada em freezer em 20 °C até o uso.

Coleta dos oócitos

Foram coletados ovários de vacas abatidas em frigorífico local, mantidos em solução fisiológica (0,9% NaCl), acrescida de 0,05 g/L de sulfato de estreptomicina a 35-38,5 °C. No laboratório, os ovários foram mergulhados rapidamente em etanol e lavados em solução fisiológica pré-aquecida também a 38,5 °C e mantidos nesta mesma solução em banho-maria até o final da aspiração¹³. Os complexos *cumulus*-oócito (COCs) imaturos foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro, utilizando agulhas de 18 mm, acopladas a seringas de 20 mL e selecionados, sob estereomicroscópio, em placas de Petri de 100 mm contendo o meio de lavagem Talp Hepes¹⁴. Para o cultivo *in vitro*, somente os COCs morfologicamente saudáveis foram selecionados, ou seja, aqueles com citoplasma homogêneo e pelo menos três camadas de células do *cumulus-oophorus*¹⁵. Os oócitos foram, então, divididos aleatoriamente, lavados duas vezes em meio Talp Hepes e cultivados em sistema de bloqueio da maturação ou de MIV.

Bloqueio meiótico

Os COCs destinados à pré-maturação com BLI, para inibição da quebra da VG (Grupos BLI 18 horas e BLI 24 horas), foram lavados uma vez em meio de inibição TCM 199 com sais Earle e bicarbonato (Invitrogen, Gibco Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY), suplementado com 0,2 mM de piruvato, 100 UI/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina, 3 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) e 100 μ M de BLI (Biomol, Plymouth Meeting, PA), transferidos para gotas de 0,1 mL do mesmo meio, preparadas em placas de Petri 35 mm, cobertas com óleo mineral, e cultivados por um período de 24 horas em estufa incubadora com 95% de umidade, 5% de CO₂ e 38,5 °C. A dose de 100 μ M de BLI foi escolhida de acordo com curva de dose-reposta descrita previamente^{16,17}.

Avaliação do *status* nuclear após inibição

Para a avaliação do estágio da meiose após pré-tratamento por 24 horas com BLI, ou seja, a porcentagem de inibição da quebra da VG após cultivo em presença da droga, os oócitos foram desnudados (completa retirada das células do *cumulus-oophorus*) enzimaticamente com 2,5 μ g/mL de hialuronidase por dois minutos e mecanicamente com vórtex, em tubos de 2,5 mL com 0,3 mL de Talp Hepes, suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB), por quatro minutos¹⁵. Em seguida, os

oócitos foram colocados entre lâmina e lamínula, apoiada em cola de silicone, fixados em etanol-ácido acético 3:1 (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) por 24 horas e corados com aceto-orceína a 2%. Os oócitos foram analisados em microscópio de contraste de fase e classificados em: VG com presença de lâmina nuclear, refletindo o bloqueio meiótico exercido pela droga; estádios intermediários (metáfase I, anáfase I e telófase I); e metáfase II com presença de um corpúsculo polar e um fuso meiótico, identificado pela disposição cromossômica alinhada, característica da placa metafásica).

Reversão da inibição

Após o período de inibição, os oócitos foram lavados cinco vezes em meio de maturação padrão TCM 199 com sais Earle e bicarbonato (Invitrogen, Gibco Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY), suplementado com 0,2 mM de piruvato, 100 UI/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina, 0,5 μ g/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 5,0 μ g/mL de hormônio luteinizante (LH) e 10% de SFB, para a completa retirada do inibidor. Eles também foram transferidos para gotas de 0,1 mL do mesmo meio, preparadas em placas de Petri 35 mm, cobertas com óleo mineral e cultivados por um período de 18 ou 24 horas em estufa incubadora com 95% de umidade, 5% de CO₂, 38,5 °C, de acordo com a curva de maturação descrita previamente^{7,15}.

Fixação e coloração por imunofluorescência para visualização de microtúbulos e cromossomos

Ao final da MIV, os oócitos foram desnudados, fixados e corados para microscopia de fluorescência como descrito previamente¹⁸. Após o desnudamento, os oócitos foram fixados no fixador MTSB XF, composto por 1X de tampão estabilizador (0,1 M de Pipes, 5 mM de MgCl₂ e 2,5 mM de ethylene glicol (b-aminoe-thyl) – EGTA), 50% de óxido de deutério, 0,01% de apronitina de pulmão bovino, 1 mM de dithiothreitol (DTT), 1 μ M de taxol, 0,5% de triton-X, 2% de formaldeído e água de MilliQ, aquecido previamente por 30 minutos em estufa a 38,5 °C. Após esse período, foram acondicionados a 4 °C até a realização da reação de imunofluorescência. Em seguida, os oócitos foram lavados em solução tampão composta por 0,02% de NaN₃, 0,01% de triton-X, 0,2% de leite desnatado, 2% de soro normal de cabra, 0,1 M de glicina, 2% de BSA(V) e phosphate buffer solution (PBS), no qual permaneciam a 4 °C durante a noite.

Após esse período, os oócitos foram incubados com o anticorpo primário anti-beta-tubulina de camundongo (diluição 1:1.000), a 4 °C durante a noite, e secundário imunoglobulina de cabra anticamundongo conjugada com FITC (Zymed

Laboratories, Invitrogen Corporation, Calsbad, CA, USA, diluição 1:200) por duas horas a 38,5 °C. Os cromossomos e cromatina de DNA foram corados com Hoechst 33342 (10 µg/mL) em meio de montagem composto por 50% de glicerol e 25 mg/mL de NaN₃ durante dez minutos à temperatura ambiente, montados entre lâmina e lamínula. As lâminas foram estocadas a 4 °C até observação em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiovert 40, Carl Zeiss Optical, Inc., Chester, VA).

Classificação dos oócitos quanto à morfologia do fuso meiótico e configuração cromossômica

Os oócitos foram classificados, como previamente descrito¹⁹, em: metáfase I, anáfase I, telófase I, metáfase II. Para uma maior acurácia das análises, os oócitos em metáfase II foram subdivididos em analisáveis, quando apresentavam-se em visão lateral ou sagital²⁰, possibilitando uma avaliação global do fuso meiótico; e não-analisáveis, quando apresentavam-se em visão polar²⁰, impossibilitando a avaliação global do fuso, apenas da disposição cromossômica. Os oócitos foram considerados normais quando apresentavam um fuso meiótico em forma de barril, com cromossomos alinhados na placa metafásica e um corpúsculo polar; e anormais, quando apresentavam fuso e/ou configuração cromossômica alterados.

Desenho experimental

Experimento 1 : bloqueio meiótico com BLI

Esse experimento foi desenhado para avaliar as porcentagens de inibição da quebra da VG pelo inibidor farmacológico BLI em oócitos bovinos cultivados por 24 horas na presença da droga. Os oócitos foram subdivididos em dois grupos: Controle, oócitos cultivados por 24 horas em meio de maturação padrão; BLI 24 horas, oócitos cultivados por 24 horas em meio de cultivo contendo 100 µM de BLI, de acordo com curva de dose-resposta descrita previamente^{16,17}. A avaliação foi feita por meio da técnica de coloração com aceto-orceína e a observação, em microscópio de contraste de fase. Considerou-se sob bloqueio meiótico, oócitos que apresentavam envelope nuclear intacto, isto é, mantidos em estágio de VG após cultivo em presença de BLI. O experimento foi realizado em duas replicatas.

Experimento 2 : reversibilidade do uso de BLI e avaliação do fuso meiótico após MIV

Nesse experimento, foi testada a reversibilidade da inibição da retomada meiótica pela BLI (porcentagem de oócitos que atingiram metáfase II após pré-maturação com o inibidor) e a porcentagem de normalidade e anormalidade do fuso meiótico, após a MIV, nos oócitos cultivados previamente na presença da

droga. Os oócitos foram subdivididos em três grupos: Controle, oócitos submetidos à MIV por 24 horas em meio de cultura padrão, imediatamente após a aspiração folicular, fixados e corados pela técnica de imunofluorescência e avaliados em microscópio de fluorescência; BLI 18 horas, oócitos cultivados por 24 horas na presença do inibidor (BLI) e, posteriormente, maturados *in vitro* por 18 horas, fixados e corados para microscopia de fluorescência; BLI 24 horas, oócitos pré-maturados com BLI por 24 horas e, posteriormente, maturados *in vitro* por 24 horas, fixados e corados para microscopia de fluorescência. O grupo BLI 18 horas foi incluído para avaliar se há, efetivamente, um envelhecimento oocitário após 24 horas de MIV, em resposta à aceleração do processo meiótico após inibição⁷.

Análise estatística

Para a análise dos resultados, foi utilizado o software Graph Pad Prisma 3.0. O efeito da BLI sobre a maturação meiótica (proporção de oócitos normais e anormais em metáfase II e em outros estádios da meiose) após 18 ou 24 horas de MIV foram avaliados pelo teste do χ^2 . Um valor de p menor do que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

A eficácia do inibidor de retomada prematura da meiose, BLI, foi confirmada pelo bloqueio meiótico no estágio de VG em 46 (90,1%) dos 51 oócitos cultivados por 24 horas na presença da droga (Figura 1 A,B), enquanto no Controle, nenhum oócito permaneceu em VG e 57 (79,1%) dos 72 oócitos cultivados, progrediram até o estágio de MII. Tais resultados foram obtidos após duas replicatas.

Como evidenciado na Tabela 1, a reversibilidade do uso da droga foi demonstrada em 73,5 e 82% dos oócitos após a indução da MIV por 18 e 24 horas, respectivamente, nos grupos cultivados no sistema de pré-maturação em presença de BLI. No Grupo Controle, 79,3% dos oócitos alcançaram o estágio de metáfase II. Não houve diferença estatística significativa com relação ao número de oócitos em metáfase II e em outros estádios de desenvolvimento, entre os Grupos Tratados BLI 18 horas e BLI 24 horas quando comparados com o Controle (Tabela 1) ($p>0,05$). Somente o número de oócitos em outros estádios de desenvolvimento (VG, metáfase I, anáfase I, telófase I), inclusive os que sofreram ativação partenogenética espontânea (Figura 2A) e degeneração, diferiu em relação aos que atingiram metáfase II (Tabela 1). No Grupo Controle, 20,7% dos oócitos estavam em outros estádios de desenvolvimento, enquanto nos Grupos 18 e 24 horas, 26,5% e 18%, respectivamente, dos oócitos estavam em outros estádios.

Foram avaliados nos Grupos Controle, BLI 18 horas e BLI 24 horas, respectivamente, 208, 208 e 195 oócitos em metáfase II. Esses oócitos foram, então, classificados em analisáveis e não-analisáveis, de acordo com a posição de visualização do fuso meiótico. Portanto, como mostra a Tabela 2, nos grupos tratados com BLI e maturados por 18 e 24 horas, as porcentagens de oócitos analisáveis foram 75,2 e 76,2%, respectivamente, enquanto no Controle, 76,3% dos oócitos foram classificados como passíveis de análise. Dentre os oócitos analisáveis nos grupos tratados, BLI 18 horas e BLI 24 horas, 80 e 82%, respectivamente, apresentavam fuso normal (Figura 2 B,C). Consequentemente, as porcentagens de anormalidade nos dois grupos foram 20 e 18%, respectivamente. No Controle, a porcentagem de normalidade foi de 82,5% e anormalidade 17,5% (Figura 2D). Não houve diferença estatística significativa entre

as porcentagens de oócitos analisáveis, normais e anormais entre os grupos ($p>0,05$).

Discussão

Nesse estudo, foi demonstrado que o potente inibidor farmacológico de retomada prematura da meiose, BLI, bloqueou efetivamente a progressão meiótica em cerca de 90% dos oócitos bovinos, utilizados como modelo experimental, cultivados por 24 horas na presença da droga. Tal comportamento corrobora os achados de Kubelka et al.¹⁶, Hashimoto et al.⁷ e Adona e Lima Verde Leal¹⁵, que obtiveram porcentagens de inibição de 89, 87 e 98%, respectivamente, ao utilizar a BLI na mesma concentração (100 μ M) empregada no presente estudo. A reversão da inibição ou indução da MIV pós-inibição, para a obtenção de oócitos

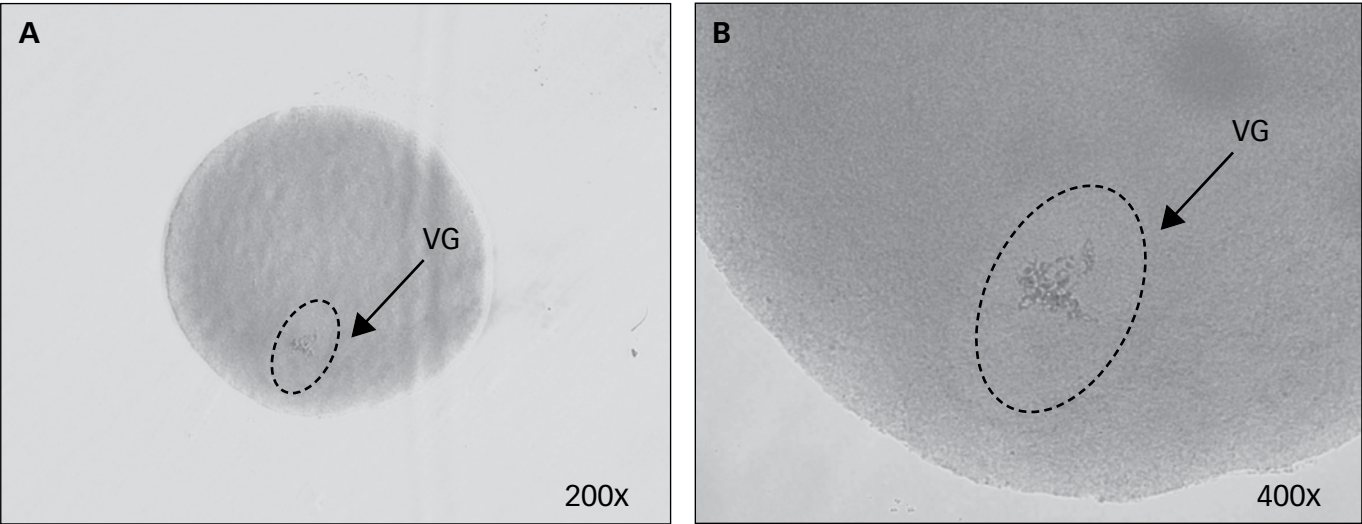


Figura 1 - Oócito em estágio de VG, após 24 horas de inibição em meio TCM 199, na presença de BLI; (A) VG (aumento 200x); (B) detalhe da VG em maior aumento (400x), no qual se observa a cromatina descondensada circundada pela lâmina nuclear (pontos tracejados).

Tabela 1 - Porcentagens de oócitos bovinos normais em diferentes estádios do desenvolvimento após pré-maturação por 24 horas em BLI e, posteriormente induzidos à MIV por 18 e 24 horas

Total de oócitos n		Estádios do desenvolvimento						
		VG	MI	AI	TI	MII	AP	Degenerados
Controle	208	2(0,9%) ^a	26(12,5%) ^b	0(0,0%)	5(2,4%) ^a	165(79,3%) ^c	5(2,4%) ^a	5(2,4%) ^a
BLI 18 horas	208	0(0,0%) ^a	20(9,6%) ^b	2(0,9%) ^a	20(9,6%) ^a	153(73,5%) ^c	3(1,4%) ^a	10(4,8%) ^a
BLI 24 horas	195	1(0,5%) ^a	15(7,7%) ^b	2(1%) ^a	8(4,1%) ^a	160(82%) ^c	5(2,6%) ^a	4(2%) ^a

Os oócitos do Grupo Controle não foram submetidos ao pré-tratamento com BLI. MI: metáfase I; AI: anáfase I; TI: telófase I; MII: metáfase II; AP: ativação partenogenética espontânea. Resultados de cinco replicatas; ^{a-c}: diferentes letras dentro da mesma linha indicam diferença significativa ($p<0,05$).

Tabela 2. Efeitos da pré-maturação com BLI por 24 horas e posterior indução da MIV por 18 e 24 horas sobre a morfologia do fuso meiótico e distribuição cromossômica de oócitos bovinos

Total de oócitos n		MII*			
		Total MII n (%)	Analisáveis n (%)	Normal n (%)	Anormal n (%)
Controle	208	165/208 (79,3%) ^a	126/165 (76,3%) ^a	104/126 (82,5%) ^a	22/126 (17,5%) ^b
BLI 18 horas	208	153/208 (73,5%) ^a	115/153 (75,2%) ^a	92/115 (80%) ^a	23/115 (20%) ^b
BLI 24 horas	195	160/195 (82%) ^a	122/160 (76,2%) ^a	100/122 (82%) ^a	22/122 (18%) ^b

*Resultados obtidos de cinco replicatas. MII: metáfase II; ^{a,b}: letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa; $p>0,05$.

meioticamente competentes (em metáfase II), também apresentaram resultados similares aos encontrados por esses autores.

No grupo de oócitos maturados por 24 horas após a inibição, a porcentagem de oócitos que atingiram MII (79,3%) esteve próxima à encontrada por Kubelka et al.¹⁶ (90,1%). Os oócitos cultivados por 18 horas em meio de MIV após a retirada do ambiente de inibição, no entanto, apresentaram resultados inferiores (73,5%) em relação aos encontrados por Adona e Lima Verde Leal¹⁵ (94%). É possível que esse fato se deva a diferenças bioquímicas espécie-específicas entre os oócitos, como consequência do aporte nutricional oferecido aos animais por seus tratadores.

As pesquisas que envolvem o estudo do fuso meiótico após o uso de inibidores farmacológicos, nesse contexto, a BLI, são muito escassos e se restringem, em sua maioria, à avaliação da cinética da MIV após a pré-maturação. Apenas um único estudo publicado, até o momento, abordou o aspecto da integridade do aparato meiótico depois de utilizada essa metodologia. Sendo assim, comparou-se a porcentagem de normalidade do fuso

meiótico e da distribuição cromossômica nos grupos com os resultados obtidos no referido estudo e foi observado que essa porcentagem não diferiu entre os três grupos do estudo (82,5, 80 e 82% para Controle, 18 horas e 24 horas, respectivamente) e, embora um pouco menor, foi semelhante aos dados encontrados por Adona et al.²¹, que observaram 100% oócitos normais e apenas um oócito com fuso anormal após 24 horas de MIV.

Além disso, também é possível comparar os resultados aos encontrados em estudos de morfologia do fuso, após bloqueio meiótico com outro inibidor da retomada prematura da meiose, roscovitina, que possui ação semelhante à da BLI, de impedir a formação do fator promotor de metáfase (MPF) e, consequentemente, a quebra da VG. Albarracín et al.²² avaliaram oócitos de bezerras tratados com 50 μ M de roscovitina e observaram que não houve diferença significativa entre os oócitos tratados (75,8%) e o Grupo Controle (82,1%), quanto à normalidade do fuso e distribuição cromossômica, o que é confirmado pelos resultados aqui encontrados.

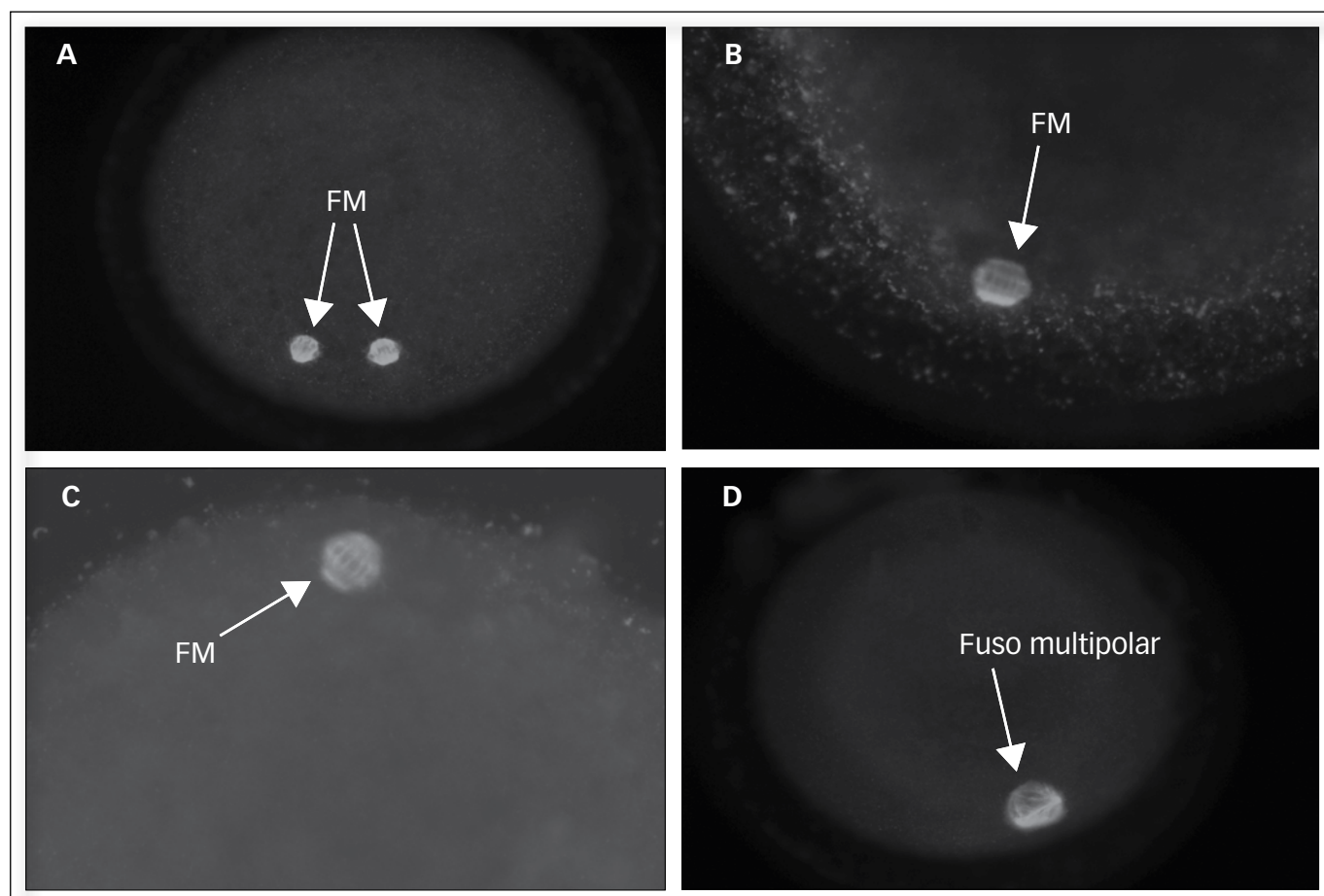


Figura 2 - Oócitos submetidos à inibição com BLI e posteriormente MIV por 18 ou 24 horas. No Grupo Controle, os oócitos foram submetidos apenas à MIV por 24 horas. (A) oócito com dois fusos meióticos (FM), ativação partenogenética espontânea (aumento 200x, barra de escala 5 μ m); (B) oócito com FM normal em MII Grupo BLI 18 horas (aumento 400x, barra de escala 5 μ m); (C) oócito com FM normal em MII grupo BLI 24 horas (aumento 400x, barra de escala 5 μ m); (D) oócito anormal em MII com fuso multipolar Grupo Controle (aumento 200x, barra de escala 5 μ m); verde: tubulina (microtúbulos); azul: cromatina (DNA).

Há vários relatos na literatura da ocorrência de uma aceleração da cinética da maturação após o bloqueio da meiose^{7,23}, que poderia levar a um envelhecimento oocitário pelo tempo de cultivo²⁴. Neste estudo, o cultivo dos oócitos por um período de 24 horas não mostrou diferença significativa, com relação à normalidade do aparato meiótico, quando comparado com o grupo em que os oócitos foram cultivados apenas por 18 horas. Dessa forma, a possibilidade de que o envelhecimento oocitário pós-inibição estivesse promovendo efeitos deletérios sobre fuso meiótico, em decorrência de um prolongado período de exposição às condições de cultura, no processo de aquisição de competência meiótica foi afastada.

Os achados representam um dos primeiros relatos de avaliação da morfologia do aparato meiótico após o bloqueio da meiose (sistemas de cultivo em duas etapas ou de pré-maturação) e confirmam a eficácia da BLI em inibir, de maneira reversível, a quebra da VG. As observações aqui apresentadas sugerem que, em nível de fuso meiótico, não há alterações morfológicas expressivas que expliquem as razões pelas quais os resultados relativos ao desenvolvimento embrionário após o bloqueio com BLI não tenham superado aqueles obtidos nos protocolos de MIV convencionais, como seria de se esperar, uma vez que a inibição da maturação nuclear forneceria tempo suficiente para que o citoplasma do oócito acumulasse RNAm e proteínas, que serão utilizadas posteriormente no momento da ativação do genoma embrionário^{15,25}. Não havendo diferenças significativas quanto à morfologia do fuso entre os Grupos Tratados (BLI 18 horas e BLI 24 horas) e o Controle, é possível inferir que outros mecanismos ainda não totalmente esclarecidos, que atuam durante o período de MIV, estão interferindo no processo de capacitação oocitária, quando são utilizados sistemas de pré-maturação com BLI.

Um dos fatores que podem estar envolvidos é o fato de que, como os meios de inibição utilizados nos estudos, inclusive neste, são considerados relativamente pobres, isto é, acrescidos apenas com BSA^{15,16}, SFB⁷ ou hormônios, supõe-se que esse sistema de pré-maturação não seja ainda capaz de mimetizar as

condições em que o oócito está inserido no ambiente folicular e, dessa forma, a reprogramação molecular, que ocorre no período de maturação oocitária e dá suporte à embriogênese inicial, permanece deficiente.

Embora os resultados das pesquisas envolvendo o uso da BLI em sistemas de pré-maturação de oócitos bovinos sejam satisfatórios e ainda promissores, é prematuro pensar na utilização dessa droga em protocolos de MIV de oócitos humanos, apesar de já existirem estudos envolvendo o uso de sistemas de pré-maturação em oócitos humanos, nos quais inibidores farmacológicos, como o inibidor da fosfodiesterase-3, foram utilizados para bloquear a retomada da meiose por interferir na via da adenosina monofosfato cíclico (AMPc)²³.

Assim, novos estudos devem ser conduzidos no sentido de investigar os efeitos de uma possível toxicidade da BLI sobre a qualidade de oócitos humanos após a MIV e embriões produzidos a partir dessa técnica e preencher, também, as lacunas ainda existentes na pesquisa experimental, para que seja possível pensar em uma transferência de tecnologia, com o aprimoramento e implantação da técnica de MIV nas rotinas de FIV, em reprodução assistida humana.

No presente estudo, demonstrou-se que o pré-tratamento de oócitos bovinos com o inibidor da retomada meiótica, BLI, não comprometeu a MIV oocitária subsequente e não promoveu aumento da incidência de anomalias meióticas. Dessa forma, sugere-se que outros fatores, que não danos ao fuso meiótico e anomalias cromossômicas, estejam interferindo na aquisição de competência para o desenvolvimento, após bloqueio meiótico com BLI.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pela concessão de bolsa. À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da FMRP-USP e ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, pelo apoio institucional e financeiro.

Referências bibliográficas

1. Lanzendorf SE. Developmental potential of *in vivo* and *in vitro* matured human oocytes collected from stimulated and unstimulated ovaries. *Fertil Steril*. 2006;85(4):836-7.
2. Smith SD, Mikkelsen AL, Lindenberg S. Development of human oocytes matured *in vitro* for 28 or 36 hours. *Fertil Steril*. 2000;73(3):541-4.
3. Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Reproduction*. 2001;121(1):51-75.
4. Roberts R, Franks S, Hardy K. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Hum Reprod*. 2002;17(11):2950-6.
5. Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*: the activation of ovarian eggs. *J Exp Med*. 1935;62(5):665-75.
6. Eppig JJ, O'Brien M, Wigglesworth K. Mammalian oocyte growth and development *in vitro*. *Mol Reprod Dev*. 1996;44(2):260-73.

7. Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Imai H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. *Biol Reprod.* 2002;66(6):1696-701.
8. Dode MAN. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. *Acta Sci Vet.* 2006;34(1):115-30.
9. Mandelbaum J, Anastasiou O, Lévy R, Guérin JF, de Larouzière V, Antoine JM. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol.* 2004;113:17-23.
10. Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Oldenbourg R, Keefe DL. Limited recovery of meiotic spindle in living human eggs after cooling-rewarming observed with polarization light microscope. *Hum Reprod.* 2001;16:2374-78.
11. Eichenlaub-Ritter U, Shen Y, Tinneberg Hr. Manipulation of the oocyte: possible damage to the spindle apparatus. *Reprod Biomed Online.* 2002;5(2):117-24.
12. Navarro PA, Liu L, Keefe DL. In vivo effects of arsenite on meiosis, preimplantation development, and apoptosis in the mouse. *Biol Reprod.* 2004;70(4):980-5.
13. Sirard MA, Bilodeau S. Effects of granulosa cell co-culture on in vitro meiotic resumption of bovine oocytes. *J Reprod Fertil.* 1990;89(2):459-65.
14. Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. Culture of preimplantation embryos of the Golden hamster in a defined culture medium. *Biol Reprod.* 1983;28:235-43.
15. Adona PR, Lima Verde Leal C. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. *Zygote.* 2004;12(3):197-204.
16. Kubelka M, Motlík J, Schultz RM, Pavlok A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biol Reprod.* 2000;62(2):292-302.
17. Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Yang X, Boland M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Mol Reprod Dev.* 2000;57(2):204-9.
18. Liu L, Ju JC, Yang X. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol Reprod.* 1998;59(3):537-45.
19. Li GP, Liu Y, Bunch TD, White KL, Aston KI. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. *Mol Reprod Dev.* 2005;71(2):220-6.
20. Ju JC, Jiang S, Tseng JK, Parks JE, Yang X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology.* 2005;64(8):1677-89.
21. Adona PR, Pires PR, Quetglas MD, Schwarz KR, Leal CL. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. *Anim Reprod Sci* 2008;108(1-2):49-65.
22. Albarracín JL, Morató R, Izquierdo D, Mogas T. Effects of roscovitine on the nuclear and cytoskeletal components of calf oocytes and their subsequent development. *Theriogenology.* 2005;64(8):1740-55.
23. Nogueira D, Ron-El R, Friedler S, Schachter M, Raziel A, Cortvrindt R, et al. Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. *Biol Reprod.* 2006;74(1):177-84.
24. Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci.* 2004;82 E-Suppl:E14-23.
25. Meirelles FV, Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambula SF, Merighe GK, et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:13-20.

Recebido em: 24/09/2008

Aprovado para publicação em: 10/12/2008

O uso popular de plantas como emenagogas e abortivas

The use of plants as emmenagogue and abortifacient agents

Tatiana Montanari¹



A Doutora **Tatiana Montanari** é bióloga formada pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com mestrado em Biologia Celular na Unicamp e doutorado em Ciências, com ênfase em Biologia Celular e Tecidual, pela Universidade de São Paulo (USP). É professora-associada do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, onde coordena o Laboratório de Biologia da Reprodução e desenvolve projetos na linha de pesquisa: "Efeito de plantas medicinais utilizadas como reguladoras da fertilidade sobre a reprodução e o desenvolvimento embrionário e fetal".

Resumo

O emprego de plantas para indução da menstruação e do aborto é amplamente difundido, e há uma grande diversidade de espécies vegetais utilizadas. Este trabalho revisa a literatura sobre o uso popular de plantas como emenagogas e abortivas, visando a contribuir com a divulgação de informações etnofolclóricas e dados experimentais a respeito das espécies vegetais mais utilizadas. Foram apresentados os dados sobre: "carrapichinho" (*Acanthospermum hispidum*), "cipó-mil-homens" (*Aristolochia triangularis*), "losna" (*Artemisia absinthium*), "erva-de-santa-maria" (*Chenopodium ambrosioides*), "buchinha-do-norte" (*Luffa operculata*), "pariparoba" (*Piper* sp.) e "arruda" (*Ruta graveolens*). A ação das plantas deve-se à presença de substâncias estrogênicas, citotóxicas e/ou que estimulem a contratilidade uterina. Se o aborto não ocorrer, anomalias ou malformações podem ser produzidas. O uso de plantas para indução do aborto é prática comum, apesar dos riscos de intoxicação. Essa conduta deveria ser desestimulada por programas de saúde comunitária, com esclarecimento sobre os riscos à saúde da mulher e do feto e com acesso a métodos contraceptivos. Por outro lado, os produtos de origem vegetal devem ser considerados pela indústria farmacêutica como importante fonte na busca de agentes interceptivos e de medicamentos para o tratamento das desordens menstruais.

Unitermos: Plantas medicinais; Abortivos; Gestação.

Abstract

The use of plants to induce menstruation and abortion is widespread and there is a diversity of species used. This paper reviews the literature on the use of plants as emmenagogue or abortifacient, aiming at contributing to the dissemination of ethnofolkloric information and experimental data about the plant species' most used. The plants cited are: "carrapichinho" (*Acanthospermum hispidum*), "cipó-mil-homens" (*Aristolochia triangularis*), "losna" (*Artemisia absinthium*), "erva-de-santa-maria" (*Chenopodium ambrosioides*), "buchinha-do-norte" (*Luffa operculata*), "pariparoba" (*Piper* sp.) and "arruda" (*Ruta graveolens*). The plants might act due to the presence of estrogenic, cytotoxic and/or that stimulate uterine contractility substances. If abortion does not occur, anomalies or malformations might be produced. The use of plants for induction of abortion is of common practice, despite the risk of intoxication. This conduct should be avoided by community health programs, with information on the risks to the health of women and fetus, and with access to contraceptive methods. Moreover, the products of herb origin should be considered by the pharmaceutical industry as an important source in the search for interceptive agents and drugs for the treatment of menstrual disorders.

Uniterms: Plants, medicinal; Abortifacient agent; Pregnancy.

Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICBS-UFRGS) – Porto Alegre (RS), Brasil.

¹ Bióloga pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com mestrado em Biologia Celular na UNICAMP e doutorado em Ciências, com ênfase em Biologia Celular e Tecidual pela Universidade de São Paulo (USP); professora-associada do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Porto Alegre (RS), Brasil.

Endereço para correspondência: Profa Dra. Tatiana Montanari – Laboratório de Biologia da Reprodução do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Rua Sarmento Leite, 500 – CEP 90050-170 – Porto Alegre/RS. E-mail: t.montanari@bol.com.br

Introdução

O emprego de plantas para o controle da fertilidade é uma prática antiga de diferentes civilizações. Os indígenas da América do Norte e do Sul, povos da Europa e de outros continentes realizavam preparados com uma ampla variedade de espécies vegetais para contracepção ou indução do aborto ou da menstruação.

Atualmente o uso de plantas medicinais não é restrito às poucas tribos indígenas existentes. Grande parte das populações das zonas rural e urbana serve-se delas como substituto aos medicamentos e receitas com plantas para provocar o aborto ou a menstruação.

Neste artigo, será apresentada uma revisão sobre o tema, incluindo informações sobre as espécies vegetais mais usadas.

Material e métodos

A revisão bibliográfica foi elaborada a partir de levantamento nas bases de dados Medline, Biological Abstract, Chemical Abstract, Life Sciences, Index Medicus e Pubmed, utilizando, além do nome científico das plantas, diferentes termos de consulta (incluindo sua tradução em inglês), como plantas medicinais, reguladores da fertilidade, agentes abortivos e contracepção. Não houve restrição de período. Além dos artigos científicos, também foram usados como fonte de informações publicações sobre plantas medicinais e da área de Farmacologia e Teratogênese.

Resultados

Várias revisões sobre plantas ditas reguladoras da fertilidade estão disponíveis na literatura¹⁻¹³ e muitas destas incluem resultados experimentais, buscando apresentar uma visão mais científica das informações folclóricas^{1,4,9,10,12,13}. Entretanto, contrastando com as extensas compilações de espécies usadas, pouco se fez para verificar a real eficácia destas plantas e conhecer o seu mecanismo de ação.

As investigações fitoquímicas relacionadas com a caracterização de agentes abortivos iniciaram-se com a descoberta de que certas pastagens tornavam o gado infértil. O isolamento e a purificação de muitos desses compostos, associados à experimentação em animais de laboratório, têm mostrado que a grande maioria apresenta uma significativa atividade estrogênica^{12,14}.

Substâncias estimuladoras de contrações uterinas podem também estar presentes nas plantas, o que explicaria o uso comum de muitas espécies como abortivas e emenagogas^{8,15}. A ação abortiva também pode ser consequência de efeito citotóxico, embriotóxico ou teratogênico.

Países de alto índice demográfico, como a China e a Índia, com um especial interesse pelo controle populacional, são os

que mais pesquisam nesta área, concentrando seus esforços no estudo da flora local. O Brasil, apesar da riqueza de sua flora e de sua cultura indígena e popular, ainda tem uma contribuição científica pequena sobre o tema¹⁶⁻²⁸.

A seguir é apresentada uma compilação das informações etnofolclóricas e dos dados experimentais sobre as espécies vegetais mais comumente usadas como emenagogas e/ou abortivas.

Acanthospermum hispidum DC (Asteraceae)

É usada como contraceptiva no nordeste da Argentina¹¹. No Brasil, o decocto de “carrapichinho” com folhas de *Cajanus cajan* (L.) Millsp (“feijão-guandu”) é tomado para promover aborto. Esse preparado, dado a ratas em doses de 150, 300 e 600 mg/kg/dia, durante o período organogênico, não causou diferença significativa no número de reabsorções e de fetos vivos, mas aumentou a incidência de anomalias internas e malformações externas²⁰.

Aristolochia triangularis Cham. (Aristolochiaceae)

Preparados obtidos com a decocção ou a infusão do caule e dos ramos ou das folhas de “cipó-mil-homens” são tomados para induzir a menstruação e o aborto no Brasil, no Paraguai e na Argentina^{2,6,11,29}. Outras espécies desse gênero são usadas para esses fins. As sementes de *Aristolochia clematitis* L. são consumidas como contraceptivas e emenagogas na Hungria¹. *Aristolochia indica* L. é empregada para contracepção e abortamento na Índia⁴. O extrato clorofórmico das raízes de *A. indica*, administrado a camundongos fêmeas no sexto ou no sétimo dia após o coito, demonstrou efeito abortivo¹². A ação dessas espécies pode estar relacionada à presença de ácido aristolóquico, que é citotóxico. Devido ao potencial mutagênico e carcinogênico, este componente também é responsável pela toxicidade da planta, envolvendo inclusive dano renal severo^{5,29}.

Artemisia absinthium L. (Asteraceae)

A “losna” é usada como emenagoga e/ou abortiva na América Central e na América do Sul^{2,4,9,11,29}. As mulheres paraguaias ingerem o decocto, a infusão ou o macerado frio preparado com as folhas e os ramos de *Artemisia absinthium*, podendo acrescentar *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze e *A. triangularis*².

O extrato hidroalcoólico das folhas de *Artemisia absinthium*, ao ser administrado a ratas entre o primeiro e o sétimo dia de gestação, por via oral, numa dose de 200 mg/kg, provocou um efeito de anti-implantação de 66%, isto é, não houve sítios de implantação em quatro das seis fêmeas acasaladas. A interferência com a implantação não se deve à supressão dos hormônios

ovarianos ou a um aumento da contratilidade uterina, já que o extrato não alterou o ciclo estral, nem provocou contrações do músculo uterino isolado. Este extrato, quando administrado entre o 11º e o 13º dia de gestação, diminuiu o número de fetos¹⁸.

Além de *Artemisia absinthium*, várias outras espécies de *Artemisia* L. são utilizadas como reguladoras da fertilidade^{4,8,10,13}. Seu efeito sobre a reprodução pode estar relacionado com a presença de substâncias com atividade estrogênica, como o β -sitosterol, os quais afetam o balanço hormonal adequado para a gestação; de compostos que estimulam a contratilidade uterina, como rutina, quercetina e betaína, ou ainda de substâncias que prejudicam o desenvolvimento do embrião, como lactonas sesquiterpênicas, que são citotóxicas, e tujona, uma cetona terpenica, a qual é neurotóxica³⁰.

A tujona também pode ser responsável pela intoxicação causada pelo consumo de *Artemisia absinthium*, cujos sinais incluem distúrbios visuais, alterações de personalidade, convulsões e toxicidade hepática²⁹.

Chenopodium ambrosioides L. (Chenopodiaceae)

No seu uso medicinal, a “erva-de-santa-maria” é contraindicada para gestantes. O ascaridol, o principal componente do óleo volátil, exerce efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso, o fígado e os rins^{29,31}. Por outro lado, o decocto das folhas ou da planta inteira é tomado com o objetivo de abortar, e pequenos supositórios feitos com as folhas são aplicados para induzir a menstruação^{4,8,29}.

Para regular a fertilidade, *Chenopodium santaeclearae* Johow é empregada no Chile³². *Chenopodium album* L. é usada como contraceptiva na Hungria e abortiva na Argentina. O pó dessa planta, misturado com a dieta numa concentração de 25 a 50%, suprimiu o estro de ratas^{1,11}.

Outras espécies de *Chenopodium* são usadas na Etiópia. Em trabalhos experimentais, os extratos aquoso e etanólico das folhas não demonstraram efeito sobre a implantação, nem atividade uterotônica. A fração n-butanólica do extrato etanólico, no entanto, reduziu o número de sítios de implantação em mais de 60%, quando administrada em ratas entre o 1º e o 10º dia de gestação¹³.

Cinnamomum zeylanicum Ness (Lauraceae)

O decocto das folhas e o óleo volátil da “canela” são tomados para induzir a menstruação^{4,21}. Esta planta demonstrou atividade estrogênica⁵. Em trabalho experimental, o decocto e o extrato em clorofórmio das folhas foram administrados a ratas durante toda a gestação, na dose de 70 mg/kg (equivalente à dose humana), por via oral e promoveram um aumento

significativo no número de reabsorções embrionárias. Foram encontrados fetos mortos no grupo tratado com o extrato em clorofórmio, porém este número não era significativo. O número de malformações e de anomalias presentes nos grupos tratados também não era significativo²¹.

Luffa operculata (L.) Cogn. Cucurbitaceae

O decocto concentrado do fruto seco da “buchinha-do-norte” é tomado para induzir aborto em várias regiões do Brasil com registro de casos de intoxicação^{29,33-34}. Investigação experimental demonstrou um efeito inibitório significativo da implantação dos embriões. Os fetos gerados por camundongos fêmeas que receberam o decocto no período da implantação apresentaram um retardo no crescimento ósseo²⁸.

Várias espécies dessa família são usadas como abortivas em outros países, tendo sido estudadas quanto à sua eficácia e ação e isolados os princípios ativos para uso na clínica, como, por exemplo, para a expulsão de mola hidatiforme. Elas agem provocando contrações da musculatura uterina, diminuição dos níveis de progesterona, supressão da resposta decidual, necrose placentária e efeitos citotóxico, embriotóxico e teratogênico³⁵⁻⁴².

Piper sp. (Piperaceae)

No sul do Brasil, efeitos abortivos no gado têm sido atribuídos a *Piper* sp., popularmente chamada de “pariparoba”. O extrato aquoso de suas folhas e dos seus galhos, administrado a ratas, numa dose de 300 mg/kg/dia, entre o 9º e o 21º dia de gestação, não provocou diferença significativa entre os animais tratados e os controles ao que se refere aos índices de implantação e de reabsorção, ao número e peso dos fetos e à presença de malformações¹⁹.

“Pariparoba” é também usada pelas mulheres para abortar, sendo denominadas com esse nome popular duas espécies: *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel e *Potomorphe umbellata* (L.) Miq., ambas da família Piperaceae²⁹.

Várias espécies de *Piper* são empregadas como emenagogas, contraceptivas e/ou abortivas na Ásia, especialmente na Índia: *Piper aurantiacum* Wall., *Piper betle* L., *Piper leptostachyum* Wall., *Piper longum* L. e *Piper nigrum* L.^{4,43-46}.

A suspensão das raízes de *Piper longum* L., administrada a ratas entre o primeiro e o terceiro dia de gestação, o quarto e o sétimo dia de gestação e o primeiro e o sétimo dia de gestação, por via oral, numa dose de 100 mg/kg, reduziu a taxa de prenhez e diminuiu o número de sítios de implantação. Entre o sexto e o nono dia de gestação, seu efeito foi mais severo, reduzindo em 80% a taxa de prenhez e promovendo a reabsorção dos poucos sítios de implantação ocorridos⁴³.

A piperina, o principal alcalóide presente em várias espécies desta família, inibiu a implantação em 91,7 e 71,4%, quando administrada a camundongos fêmeas por via intraperitoneal e oral, respectivamente, entre o segundo e o quinto dia após o coito, na dose de 12,5 mg/kg, duas vezes ao dia. Um efeito abortivo foi observado quando administrada entre o 8º e o 12º dia após o coito. Quando administrada após o 15º dia de gestação, ela atrasou a data do parto em um dia, aumentou a taxa de mortalidade fetal e reduziu o peso dos fetos. Ela não teve efeito estrogênico ou antiestrogênico, mas inibiu as contrações uterinas⁴⁴.

Administração crônica do extrato de *Piper betle* L. diminuiu o peso do útero e dos ovários e produziu alteração morfológica desses órgãos. As fêmeas apresentaram diestro prolongado e tornaram-se inférteis (60 a 100%) pela supressão da esteroidogênese ovariana. As fêmeas que ficaram prenhas tiveram uma diminuição no número de sítios de implantação e, em altas doses, malformações nos fetos^{45,46}.

Ruta graveolens L. (Rutaceae)

A “arruda” é possivelmente a planta mais empregada com o intuito de provocar o aborto. É usada como emenagoga e abortiva na Europa, no Vietnã, no Paquistão, na China, na Índia, na Etiópia, na África do Sul, nos Estados Unidos, no México, na Guatemala, no Peru, no Paraguai, na Argentina, no Uruguai e no Brasil. Entretanto, o consumo na tentativa de abortar implica em risco à saúde da mulher, podendo ocorrer falência múltipla dos órgãos e morte^{1,2,8,29,47-49}.

As suspensões aquosas das raízes e das partes aéreas e o extrato seco obtido pela infusão das partes aéreas moídas reduziram significativamente o número de ratas prenhes, quando administrados em doses de 4 ou 8 g/kg, por via oral, entre o 1º e o 10º dia de gestação. A suspensão aquosa das partes aéreas, administradas entre o primeiro e o terceiro dia de gestação, o quarto e o sexto dia de gestação ou o sétimo e o nono dia de gestação, por via oral, reduziu o número de fêmeas prenhes em 60%⁴⁸.

O extrato hidroalcoólico das folhas de *R. graveolens*, administrado a ratas entre o primeiro e o sétimo dia de gestação, na dose de 125 mg/kg/dia, por via oral, não teve efeito significativo sobre a implantação, mas quando administrado entre o 11º e o 13º dia de gestação teve um efeito abortivo (66%), evidenciado pelo sangramento vaginal no 14º dia de gestação em três dos seis animais tratados e pela ausência de fetos em quatro dos seis animais. O extrato não alterou o ciclo estral, mas teve um forte efeito estimulante da musculatura uterina¹⁸.

Experimentos com administração em diferentes períodos da primeira metade da gestação foram realizados para melhor compreender a ação de *R. graveolens*. O extrato hidroalcoólico das partes aéreas foi administrado oralmente a camundongos

fêmeas, na dose de 1.000 mg/kg/dia, do primeiro ao terceiro dia de gestação (período pré-implantação), do quarto ao sexto dia de gestação (período em que ocorre a implantação) e do sétimo ao nono dia de gestação (quando inicia a placentação e a organogênese). O extrato não causou perda embrionária antes da implantação, nem afetou esse processo. A presença de quatro fetos mortos em uma fêmea que recebeu o extrato quando a organogênese iniciava sugere fetotoxicidade por *R. graveolens*. Atividade estrogênica não foi identificada no bioensaio do peso uterino de camundongos fêmeas imaturas sexualmente²⁷.

Discussão

O emprego de plantas para indução da menstruação e do aborto é amplamente difundido, e há uma grande diversidade de espécies vegetais utilizadas. Algumas, como a “arruda” (*Ruta graveolens*), são consumidas em vários países com esse intuito. Há, ainda, aquelas que pertencem a gêneros e/ou famílias botânicas com vários representantes empregados como emenagogos ou abortivos, como o “carrapichinho” (*Acanthospermum hispidum*) e a “losna” (*Artemisia absinthium*) da família *Asteraceae*, o “cipó-mil-homens” (*Aristolochia triangularis*) da família *Aristolochiaceae*, a “erva-de-santa-maria” (*Chenopodium ambrosioides* L.) da família *Chenopodiaceae*, a “buchinha-do-norte” (*Luffa operculata*) da família *Cucurbitaceae* e a “pariparoba” (*Piper* sp.) da família *Piperaceae*. Essas situações já indicam atividade por parte dessas plantas.

Contudo, vale ressaltar que o índice de sucesso de aborto com plantas é baixo. É estimado em cerca de 30% entre as usuárias do decocto das raízes do “algodoeiro” (*Gossypium thurberi*) em um levantamento realizado no Novo México⁸. O risco de intoxicação talvez seja maior: há relatos de toxicidade provocada pelo consumo de preparados com “arruda”, “cipó-mil-homens”, “erva-de-santa-maria”, “losna” e “buchinha-do-norte” na tentativa de abortar.

As plantas podem induzir a menstruação ou o aborto devido à presença de substâncias estrogênicas, que desequilibram o balanço hormonal, ou de compostos que estimulam a contratilidade uterina. Ainda, podem promover o aborto por meio de citotoxicidade e embriotoxicidade. Entretanto, se o aborto não ocorrer, anomalias ou malformações podem ser produzidas.

A prática de induzir o aborto por meio dos preparados com plantas deveria ser desestimulada por programas de saúde comunitária, com esclarecimento sobre os riscos à saúde da mulher e do feto e com acesso a métodos contraceptivos. Por outro lado, os produtos de origem vegetal devem ser considerados pela indústria farmacêutica como importante fonte na busca de agentes interceptivos, ou seja, que evitem a implantação de medicamentos para o tratamento das desordens menstruais.

Referências bibliográficas

- De Laszlo H, Henshaw PS. Plant materials used by primitive peoples to affect fertility. *Science*. 1954;119(3097):626-31.
- Hnatyszyn O, Arenas P, Moreno Azorero R, Rondina RVD, Coussio JD. Estudio fitoquímico preliminar de plantas medicinales paraguayas. I. Plantas reguladoras de la fecundidad segun la medicina folklorica. *Rev Soc Cient*. 1974;14:23-57.
- Barnes CS, Price JR, Hughes RL. An examination of some reputed antifertility plants. *Lloydia*. 1975;38(2):135-40.
- Farnsworth NR, Bingel AS, Cordell GA, Crane FA, Fong HS. Potential value of plants as sources of new antifertility agents I. *J Pharm Sci*. 1975;64(4):535-98.
- Farnsworth NR, Bingel AS, Cordell GA, Crane FA, Fong HS. Potential value of plants as sources of new antifertility agents II. *J Pharm Sci*. 1975;64(5):717-54.
- Arenas P, Azorero RM. Plants of common use in Paraguayan folk medicine for regulating fertility. *Econ Bot*. 1977;31(3):298-301.
- Arenas P, Azorero RM. Plants used as means of abortion, contraception, sterilization and fecundation by Paraguayan indigenous people. *Econ Bot*. 1977;31(3):302-6.
- Conway GA, Slocumb JC. Plants used as abortifacients and emmenagogues by Spanish New Mexicans. *J Ethnopharmacol*. 1979;1(3):241-61.
- Weniger B, Haag-Berrurier M, Anton R. Plants of Haiti used as antifertility agents. *J Ethnopharmacol*. 1982;6(1):67-84.
- Kong YC, Xie JX, But PP. Fertility regulating agents from traditional Chinese medicines. *J Ethnopharmacol*. 1986;15(1):1-44.
- Martínez Crovetto R. Plantas reguladoras de la fecundidad utilizadas en nordeste argentino. *América Indígena*. 1987;47:279-93.
- Bhargava SK. Antifertility agents from plants. *Fitoterapia*. 1988;59:163-77.
- Desta B. Ethiopian traditional herbal drugs. Part III: Anti-fertility activity of 70 medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 1994;44(3):199-209.
- Bickoff EM, Booth AN, Lyman RL, Livingston AL, Thompson CR, Deeds F. Coumestrol, a new estrogen isolated from forage crops. *Science*. 1957;126(3280):969-70.
- Piyachaturawat P, Glinsukon T, Chanjarunee A. Antifertility effect of *Citrus hystrix* DC. *J Ethnopharmacol*. 1985;13(1):105-10.
- Guerra MO, Andrade ATL. Contraceptive effects of native plants in rats. *Contraception*. 1978;18:191-7.
- Guerra MO, Araújo FC, Peters VM, Andrade ATL. Aborto em ratas após administração de barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* M.). *Braz J Med Biol Res*. 1980;13(4-6):111-3.
- Rao VSN, Menezes AMS, Gadelha MGT. Antifertility screening of some indigenous plants of Brazil. *Fitoterapia*. 1988;59:17-20.
- Schneid ES, Obelar E, Colares MI, Rodegheri VJ, Bizzotto JH, Battastini AM, et al. Effects of *Piper* sp extract on pregnancy in rats. *Braz J Med Biol Res*. 1988;21(1):111-3.
- Lemonica IP, Alvarenga CMD. Abortive and teratogenic effect of *Acanthospermum hispidum* D.C. and *Cajanus cajan* (L.) Millps. in pregnant rats. *J Ethnopharmacol*. 1994;43:39-44.
- Lemonica IP, Macedo AMRB. Abortive and/or embryofetotoxic effect of *Cinnamomum zeylanicum* leaf extracts in pregnant rats. *Fitoterapia*. 1994;65:431-4.
- Lemonica IP, Damasceno DC, di-Stasi LC. Study of the embryotoxic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(2):223-7.
- Almeida FC, Lemonica IP. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. *J Ethnopharmacol*. 2000;73(1-2):53-60.
- Almeida ER, Melo AM, Xavier H. Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and boldine in rats. *Phytother Res*. 2000;14:99-102.
- Damasceno DC, Volpato GT, Sartori TC, Rodrigues PF, Perin EA, Calderon IM, et al. Effects of *Annona squamosa* extract on early pregnancy in rats. *Phytomedicine*. 2002;9(7):667-72.
- Montanari T, Bevilacqua E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. *Contraception*. 2002;65(2):171-5.
- de Freitas TG de, Augusto PM, Montanari T. Effect of *Ruta graveolens* L. on pregnant mice. *Contraception*. 2005;71(1):74-7.
- Barilli SLS, Santos ST dos, Montanari T. An experimental investigation on *Luffa operculata* (Cogn.) as abortifacient plant. *Reprod.Clim*. 2007;22:165-8.
- Mengue SS, Mentz LA, Schenkel EP. Uso de plantas medicinais na gravidez. In: Sanseverino MTV, Spritzer DT, Schüler-Faccini L. *Manual de Teratogênese*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2001. p. 423-50.
- Ferrão SK. Descrição e caracterização de espécies de *Artemisia* L. (Asteraceae) e seu uso como reguladora da fertilidade. Trabalho de conclusão do curso de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, 1997.
- Simões CMO, Mentz LA, Schenkel EP, Irgang BE, Stehmann JR. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. 4. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1995. 173 p.
- Mandich L, Bittner M, Silva M, Barros C. Phytochemical screening of medicinal plants studies of flavonoids. *Rev Latinoam Quím*. 1984;15:80-82.
- Schenkel EP, Zannin M, Mentz LA, Bordignon SA de L, Irgang B. Plantas tóxicas. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello

- JCP de, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2000. p.755-88.
34. Schwartzman L, Abeche AM. Abortivos. In: Sanseverino MTV, Spritzer DT, Schüler-Faccini L. Manual de Teratogênese. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2001. p.261-73.
 35. Ojewole JAO, Elujoba AA. Preliminary investigation of the oxytocic action of an aqueous extract of *Lagenaria breviflora* fruit. Int J Crude Drug Res. 1982;20:157-63.
 36. Aguwa CN, Mittal GC. Abortifacient effects of the roots of *Momordica angustisepala*. J Ethnopharmacol. 1983;7(2):169-73.
 37. Chan WY, Tam PP, So KC, Yeung HW. The inhibitory effects of beta-momorcharin on endometrial cells in the mouse. Contraception. 1985;31(1):83-90.
 38. Elujoba AA, Olagbende SO, Adesina SK. Anti-implantation activity of the fruit of *Lagenaria breviflora* Robert. J Ethnopharmacol. 1985;13(3):281-8.
 39. Chan WY, Tam PP, Choi HL, Ng TB, Yeung HW. Effects of momorcharins on the mouse embryo at the early organogenesis stage. Contraception. 1986;34(5):537-44.
 40. Ng TB, Wong RNS, Yeung HW. Two proteins with ribosome-inactivating, cytotoxic and abortifacient activities from seeds of *Luffa cylindrical* Roem (Cucurbitaceae). Bioch Int. 1992;27:197-207.
 41. Ng TB, Chan WY, Yeung HW. Proteins with abortifacient, ribosome inactivating, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS activities from Cucurbitaceae plants. Gen Pharmacol. 1992;23(4):575-90.
 42. Ng TB, Chan WY, Yeung HW. The ribosome-inactivating, antiproliferative and teratogenic activities and immunoreactivities of a protein from seeds of *Luffa aegyptiaca* (Cucurbitaceae). Gen Pharmacol. 1993;24(3):655-8.
 43. Garg SK. Antifertility effect of *Embelia ribes* and *Piper longum* in female rats. Fitoterapia. 1981;52:167-9.
 44. Piyachaturawat P, Glinsukon T, Peugvicha P. Postcoital antifertility effect of piperine. Contraception. 1982;26(6):625-33.
 45. Adhikary P, Banerji J, Chowdhury D, Das AK, Deb CC, Mukherjee SR, et al. Antifertility effect of *Piper betle* Linn. extract on ovary and testis of albino rats. Indian J Exp Biol. 1989;27(10):868-70.
 46. Adhikary P, et al. Effect of oral administration of stalk of leaves of *Piper betle* L. on estrous cycle and its antifertility activity in rats. Indian J Physiol Allied Sci. 1990;44:116-23.
 47. Kong YC, Lau CP, Wat KH, Ng KH, But PP, Cheng KF, et al. Antifertility principle of *Ruta graveolens*. Planta Med. 1989;55(2):176-8.
 48. Ganghi M, Lal R, Sankaranarayanan A, Sharma PL. Post-coital antifertility action of *Ruta graveolens* in female rats and hamsters. J Ethnopharmacol. 1991;34(1):49-59.
 49. Ciganda C, Laborde A. Herbal infusions used for induced abortion. J Toxicol Clin Toxicol. 2003;41(3):235-9.

Recebido em: 29/08/2008

Aprovado para publicação: 09/12/2008

Apoptose e peroxidação lipídica antes e após criopreservação

Apoptosis and lipid peroxidation before and after cryopreservation

Alessandro Schüffner¹, Mahmood Morshedi², Sergio Oehninger³, Newton Sérgio de Carvalho⁴, Maria Theresa Costa Ramos De Oliveira⁵, Thiago Placido⁶, Almir Antonio Urbanetz⁷



O **Doutor Alessandro Schuffner** se formou em Medicina no ano de 1995, com especialização em Ginecologia e Obstetrícia de 1996 a 1999. É especialista em Laparoscopia pela Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (Febrasgo). Possui diversas publicações em Medicina Reprodutiva, destacando-se sua formação complementar no Jones Institute for Reproductive Medicine, Norfolk, onde fez pós-graduação entre 1999 e 2003 no Reproductive Medicine Associates, Morristown, ambos renomados centros no cenário internacional. Mestre em Medicina Interna pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Atua como revisor das revistas *Fertility and Sterility* e *The New England Journal of Medicine*, importantes publicações científicas na área de Reprodução Humana e de Medicina. É diretor clínico da Conceber – Centro de Medicina Reprodutiva em Curitiba.

Resumo

Objetivo: avaliar a existência da associação entre os parâmetros da análise seminal básica e a porcentagem de apoptose e peroxidação lipídica antes e após criopreservação. **Material e métodos:** foram avaliados ejaculados de 16 homens portadores de infertilidade primária atendidos no Laboratório de Andrologia do Jones Institute for Reproductive Medicine nos Estados Unidos. A porcentagem de apoptose foi avaliada pela aderência à anexina V, a peroxidação lipídica espontânea por meio de análise espectrofotométrica e os parâmetros da motilidade por meio da análise computadorizada. **Resultados:** antes do congelamento, houve maior porcentagem de espermatozoides apoptóticos (41,4%) e menor porcentagem de espermatozoides vivos (49,7%) em homens com menor concentração espermática ($p < 0,05$). Após criopreservação, a porcentagem de espermatozoides vivos foi menor nos sujeitos com menor concentração espermática (42,6%; $p = 0,06$). Não houve diferenças significativas da morfologia e motilidade antes e após criopreservação. Antes do congelamento, houve correlação entre espermatozoides vivos e sua concentração ($p < 0,05$); uma correlação negativa entre a concentração de espermatozoides e apoptose ($p < 0,05$); e uma correlação entre motilidade e apoptose ($p < 0,05$). **Conclusões:** antes e após criopreservação, houve maior proporção de espermatozoides apoptóticos em homens com menor concentração espermática; não foi encontrada associação entre a motilidade e morfologia com a apoptose e a peroxidação lipídica não apresentou associação com qualquer parâmetro da análise seminal básica.

Unitermos: Espermograma; Criopreservação; Apoptose; Peroxidação lipídica (de lipídeos).

Abstract

Objective: to check whether or not a correlation between sperm concentration; motility, morphology and apoptosis percentage; and lipid peroxidation before and after cryopreservation. **Material and methods:** samples of 16 men undergoing evaluation for infertility at the Andrology Laboratory of the Jones Institute for Reproductive Medicine in USA were analyzed. Apoptosis level was assessed by annexin V binding, spontaneous lipid peroxidation by spectrophotometric assay and motion parameters by computer assisted semen analyzer. **Results:** in terms of sperm concentration, before freezing there was a higher percentage of apoptotic sperm (41.4%) and less live sperm percentage (49.7%) in patients with less sperm concentration ($p < 0.05$). After the cryopreservation, the percentage of live sperm was less in patients with less sperm concentration (42.6%; $p = 0.06$). No differences were observed between either motility or sperm morphology before freezing or after thawing. Before freezing it was observed a negative correlation between sperm concentration and apoptosis ($p < 0.05$) and a positive correlation between sperm motility and apoptosis ($p < 0.05$). **Conclusions:** there was higher proportion of spermatozoa showing apoptosis before and after cryopreservation in men with less concentration of sperm. No association was observed between motility and morphology with apoptosis, and lipid peroxidation did not show association to any of the basic semen analysis parameters.

Uniterms: Sperm count; Cryopreservation; Apoptosis; Lipid peroxidation.

¹ Mestre em Medicina Interna pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Curitiba (PR), Brasil; diretor clínico da Conceber – Centro de Medicina Reprodutiva – Curitiba (PR), Brasil.

² Professor-associado da Eastern Virginia Medical School; diretor do Laboratório de Andrologia e Criopreservação do Jones Institute for Reproductive Medicine – Norfolk, EUA.

³ Professor e Diretor da Divisão de Endocrinologia Reprodutiva e Infertilidade da Eastern Virginia Medical School; diretor Clínico do Jones Institute for Reproductive Medicine – Norfolk, EUA.

⁴ Professor Adjunto do Departamento de Tocoginecologia do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Curitiba (PR), Brasil.

⁵ Médica pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Curitiba (PR), Brasil.

⁶ Embriologista da Conceber – Centro de Medicina Reprodutiva – Curitiba (PR), Brasil.

⁷ Professor Titular do Departamento de Tocoginecologia do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Curitiba (PR), Brasil.

Endereço para correspondência: Alessandro Schüffner – Avenida República Argentina, 210 – CEP 80240-210 – Curitiba/PR – E-mail: alessandro@clinicaconceber.com.br

Introdução

A análise seminal básica tem um valor clínico limitado em prever a fertilidade, sendo assim vários outros testes de avaliação e de função espermática humana têm sido desenvolvidos. Entre estes, estão a morfologia de espermatozoides normal (critério estrito), avaliação da motilidade assistida por computador, teste hipo-osmótico, análise de anticorpos antiespermatozoides pela reação mista de aglutinina (MAR), teste para maturidade nuclear de espermatozoides, penetração de oócito de hamster livre de zona pelúcida e aderência do espermatozoide na zona pelúcida de oócitos humanos^{1,2}. Apesar desses testes fornecerem uma informação adicional valiosa que pode ajudar no diagnóstico de normalidade masculina para a fertilidade, não existe um teste único de função espermática que possa fazer esta afirmação com acurácia³.

Na abordagem da reprodução humana, frequentemente é necessário o congelamento do sêmen do homem por vários motivos. Com isso, torna-se desejável conhecer os fatores que possam interferir no resultado do sêmen criopreservado.

A criopreservação pode causar danos estruturais e modificações funcionais dos espermatozoides. Danos na viabilidade, motilidade, velocidade e potencial de fertilização dos espermatozoides são parcialmente devidos a distúrbios da integridade da membrana plasmática e a outros fatores ainda não-definidos³⁻⁷.

Durante as fases iniciais de distúrbios da função da membrana, a assimetria de fosfolipídios dessa estrutura ocorre antes de um dano progressivo em sua integridade. Sob diferentes cenários biológicos, distúrbios da função da membrana estão associados com a translocação da fosfatidilserina do folheto interno para o externo da membrana^{7,8}. Essa translocação pode ser identificada pela aderência da fosfatidilserina à anexina V, que é um método amplamente aceito como uma determinação precoce de rompimento da integridade da membrana em células danificadas^{3,7,8}. Essa alteração de membrana é um dos eventos mais precoces de morte celular programada, o qual é denominado apoptose^{8,9}.

Foi relatado que a anexina V é mais sensível em detectar uma deterioração de função de membrana do que a coloração com iodeto de propídio em amostra de sêmen criopreservado/descongelado e pode ser usado para detectar a integridade dessa estrutura^{10,11}.

Estudos relataram que a enzima transferase aminofosfolipídica intermedeia especificamente uma rápida translocação de aminofosfolipídio do folheto externo para o folheto interno da membrana plasmática, dependente de trifosfato de adenosina (ATP) em espermatozoides de carneiro¹² e de porco¹³. Em espermatozoides congelados de carneiro, o sequestro de fosfatidilserina para o folheto interno da membrana plasmática é mantido íntegro em células intactas, mas não nas com algum

comprometimento¹². Se a atividade dessa enzima é inibida em espermatozoide humano criopreservado, espera-se que haja uma externalização de fosfatidilserina aumentada.

Foi relatada uma correlação significativa entre a ligação com a anexina V e a porcentagem de espermatozoides linearmente móveis e a velocidade direta linear desses gametas¹⁰, levando à hipótese de que possa haver uma relação entre a estrutura da membrana e a motilidade dos espermatozoides. Outros autores encontraram uma associação entre perda da motilidade de espermatozoides humanos selecionados, com alta motilidade, e a externalização da fosfatidilserina quando incubados por um período de até 24 horas¹⁴. A integridade da membrana plasmática pela externalização da fosfatidilserina é usada para determinar a porcentagem de apoptose.

O conteúdo fosfolipídico da membrana diminui após criopreservação, sendo mais pronunciadas as perdas da fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. Os fosfolipídios, que normalmente se localizam na porção interna da membrana plasmática, movem-se para a porção externa durante a criopreservação/descongelamento^{10,15,16}. A difusão lipídica através da membrana plasmática está bastante comprometida em espermatozoides humanos congelados/descongelados quando comparados com espermatozoides a fresco¹⁵.

O espermatozoide humano tem alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados em sua membrana e pouca proteção adequada com antioxidante. Ácidos graxos poli-insaturados são necessários para eventos de fusão da membrana associados à fertilização¹⁷; no entanto, a presença deles acarreta uma vulnerabilidade para os danos peroxidativos. Sob várias condições de tensão oxidativa, o início da cascata da peroxidação lipídica resulta em perda da fluidez e prejuízo da função espermática¹⁸. O estresse da membrana contribui mais que a peroxidação lipídica para o criodano subletal em espermatozoides¹⁹.

Em estudos realizados para acessar a integridade do espermatozoide humano por meio de avaliação da membrana plasmática (anexina V) e do DNA (TUNEL) em amostras criopreservadas/descongeladas e outras incubadas por vários períodos de tempo a 37 °C¹⁹, verificou-se que os espermatozoides de homens doadores de sêmen sempre apresentavam melhores resultados, em relação a homens subfêrteis, com respeito a esses marcadores de funcionalidade da membrana plasmática e integridade de DNA^{15,20-22}.

A Sociedade Americana para Medicina Reprodutiva publicou critérios para que se obtenha maior sucesso na seleção de doadores de sêmen com melhores taxas de criosobrevivência de espermatozoides. As características da análise seminal básica, como número de espermatozoides móveis $>50 \times 10^6/\text{mL}$ e movimentação ativa propulsiva $>60\%$, são alguns parâmetros que podem prever um maior sucesso com o congelamento de

sêmen²³. No entanto, não se conhece o mecanismo específico pelo qual essas características do espermograma resultariam em melhor criosobrevivência.

Este estudo foi feito para avaliar a associação entre as características do espermograma, a translocação da fosfatidilserina e a aferição da peroxidação lipídica com o objetivo de avaliar a existência de associação com os parâmetros da análise seminal básica antes e após criopreservação do sêmen. Além disso, é possível ainda propor a necessidade de outra abordagem para a criopreservação/descongelamento em determinados pacientes.

Material e métodos

Este é um estudo coorte, prospectivo, analítico e transversal. Foram avaliados ejaculados de 16 homens portadores de infertilidade primária que se submeteram à avaliação no Laboratório de Andrologia do Jones Institute for Reproductive Medicine, na Eastern Virginia Medical School em Norfolk, EUA. Em cada amostra foram avaliados cerca de 200 espermatozoides. Os critérios de inclusão foram: homens submetidos à avaliação durante investigação de infertilidade, com período de abstinência sexual de dois a quatro dias; contagem leucocitária no espermograma menor que $1 \times 10^6/\text{mL}$, avaliados pela técnica de peroxidase; teste de anticorpo antiespermatozoide negativos no sêmen; espermograma com concentração de espermatozoides maior que $20 \times 10^6/\text{mL}$, com intuito de fornecer número suficiente de células para as diversas análises. Foram considerados critérios de exclusão: pacientes fumantes, indivíduos com volume testicular reduzido, ginecomastia, e/ou varicocele.

A concentração dos espermatozoides e motilidade espermática foi objetivamente avaliada usando um Hamilton-Thorne®, analisador computadorizado assistido de sêmen (computer assisted semen analyzer – CASA) IVOS versão 10.8 (Hamilton Thorne Research, Beverly, Massachusetts, MA, EUA). As medidas eram duplicadas e manualmente monitorizadas. A avaliação da morfologia foi feita colocando-se 5 μL sobre uma lâmina de microscópio e espalhando a gota com uma segunda lâmina. As lâminas eram secas a 37 °C. Esfregaços secos eram corados com o corante Diff-Quik (Dade Behring AG, Düringen, Suíça). Foram analisados pelo menos 200 espermatozoides por dois diferentes observadores.

Para cada amostra, a fração com espermatozoides com alta motilidade foi isolada por meio do gradiente descontínuo (camadas 90 e 45%) usando Percoll® (Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA). O Percoll® isotônico foi preparado misturando Percoll® com meio de cultura Human Tubal Fluid (HTF – fluido tubário humano, Irvine Scientific, Santa Ana, EUA) concentrado 10X numa razão 1:10. A mistura resultante foi usada com Percoll® isotônico 100%. Percoll® isotônico 90% foi preparado adicionando

o meio HTF numa razão 1:10. O Percoll® isotônico 45% foi preparado pela diluição 1:2 do Percoll® isotônico 90% com o meio HTF. A separação dos gradientes foi preparada colocando 1 mL do Percoll® isotônico 45% sobre 1 mL do Percoll® isotônico 90% em um tubo de centrifugação cônico de 15 mL (Fisher Scientific, EUA). Um máximo de 2 mL de sêmen era cuidadosamente colocado no topo do gradiente (Percoll® 90%). Amostras com mais de 2 mL eram divididas em quantidades iguais em vários tubos de centrifugação.

A centrifugação foi realizada a 546 xg por 20 minutos. A população de células no sedimento, na base do Percoll® 90% foi coletada e lavada com HTF a 425 xg por dez minutos. O sobrenadante foi removido e descartado e o pellet ressuspense em HTF. Nenhuma albumina humana ou outra fonte de proteína foi utilizada para evitar fatores de confusão na aferição da peroxidação lipídica.

A translocação da fosfatidilserina para o folheto externo da membrana plasmática foi avaliada pela ligação da anexina V a ela e essa externalização foi quantificada. Para isso, foi usado o kit annexin V – Cy3.18 (Apoptosis Detection Kit, Annexin V-Cy3; Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA), com o objetivo da diferenciação entre células com ou sem translocação da fosfatidilserina e células necróticas, e foi usado diacetato de 6-carboxifluoresceína (6-CFDA) em combinação com anexina V-Cy3.18. A não-fluorescente 6-CFDA entra na célula e é convertida para um componente fluorescente, ou seja, o 6-carboxifluoresceína (6-CF). Essa conversão é uma função das esterases presentes somente em células vivas. Dessa forma, nenhuma fluorescência seria observada em células necróticas.

Na microscopia fluorescente, 6-CF é observada como fluorescência verde e anexina V-Cy3.18 como vermelha. São três os padrões de fluorescência observados: células normais vivas que se coram somente com 6-CF (verde) (Figura 1); células vivas com translocação da fosfatidilserina, corando-se, portanto com 6-CF (verde) e com anexina V-Cy3.18 (vermelho) (Figura 2); e células necróticas que se coram somente com anexina V-Cy3.18 (vermelho) (Figura 3).

A suspensão de espermatozoides da fração com alta motilidade era lavada com HTF (Irvine Scientific) suplementado com 0,3% de albumina humana sérica (Human Serum Albumin – HSA, Irvine) e a concentração ajustada para $10 \times 10^6/\text{mL}$. Este valor foi estabelecido após estudo piloto para determinar qual concentração ideal para se conseguir uma boa leitura com o microscópio de imunofluorescência utilizando esta técnica (anexina V) e, sem que fosse preciso uma concentração inicial no espermograma muito elevada.

Duplicadas de 25 μL da suspensão com espermatozoides foram colocadas em uma lâmina com camada de poli-L-lisina e coradas com solução 6-CFDA e annexine V-Cy3 na presença de

cálcio. Depois de uma incubação no escuro por dez minutos, lavou-se essa suspensão já na lâmina, apenas para melhorar o fundo, duas vezes num intervalo de dez minutos. A seguir, adicionou-se 3 μ L de uma solução antidescolorimento para minimizar a perda de fluorescência. Depois disso, a lâmina era coberta com uma lamínula 24 *versus* 50 mm e imediatamente lida por dois investigadores usando um microscópio de fluorescência (Eclipse 600, Nikon, New York, EUA) num aumento de 600 vezes com filtro ultravioleta de excitação/barreira (450 a 490 nm/515 nm). Pelo menos 200 espermatozoides foram contados por lâmina.

As frações de espermatozoides purificados com alta motilidade numa concentração de 20×10^6 /ml foram avaliadas para peroxidação lipídica (LPO), pré-congelamento e pós-descongelamento usando o kit ensaio LPO-586 (LPO-586 Byotech SA, Portland, OR, EUA) de acordo com instruções do fabricante. O ensaio envolve um “endpoint” espectrofotométrico e é capaz de detectar tanto malonaldeído (MA) quanto 4-hidroxialquenal (4HA). A quantidade de LPO nas amostras pré-congelamento era avaliada em alíquota com ou sem o meio de criopreservação (TYB-G). Isso foi feito devido aos experimentos preliminares nos quais foi observado LPO sob incubação por 30 minutos com TYB-G em temperatura ambiente (dado não mostrado). A avaliação das amostras pós-descongelamento era realizada seguindo duas lavadas a 380 xg por dez minutos com o intuito de remover o TYB-G.

Suspensões de espermatozoides eram misturadas vagarosamente, 100 μ L a cada minuto, agitando-se gentilmente após cada adição do meio de congelamento, TEST-Yolk Buffer (tampão de gema de ovo) contendo 12% de glicerol (Freezing medium, Irvine Scientific, cat # 9971) até que uma razão de volume 1:1 fosse atin- gida. Essa mistura era transferida para um criofrasco de 2.0 mL (Corning, cat # 430488) num volume de 0.4 mL por frasco, numa bandeja com altura regulável (Taylor-Wharton, EUA) e refrigerado (4 °C) por uma hora. Depois era congelado a 5 cm acima do nível superior do nitrogênio (~-78 °C) por 20 minutos, pela colocação da bandeja, que se acopla à abertura do botijão de nitrogênio líquido. Então, os frascos eram carregados nos racks e posteriormente imersos no nitrogênio líquido a -196 °C. Os espécimes eram descongelados em banho-maria a 42 °C por quatro minutos após no mínimo 24 horas de armazenamento congelado.

A análise estatística foi realizada com o emprego do teste não-paramétrico e não-pareado de Mann-Whitney para as variáveis quantitativas contínuas e análise por regressão linear múltipla para cada uma das variáveis dependentes. Os dados são apresentados com média $\pm$ erro padrão (EP). O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$.

Todos os experimentos desse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Institutional Review Board – IRB) da Eastern Virginia Medical School, sob o número IRB 07-06-94-0292.

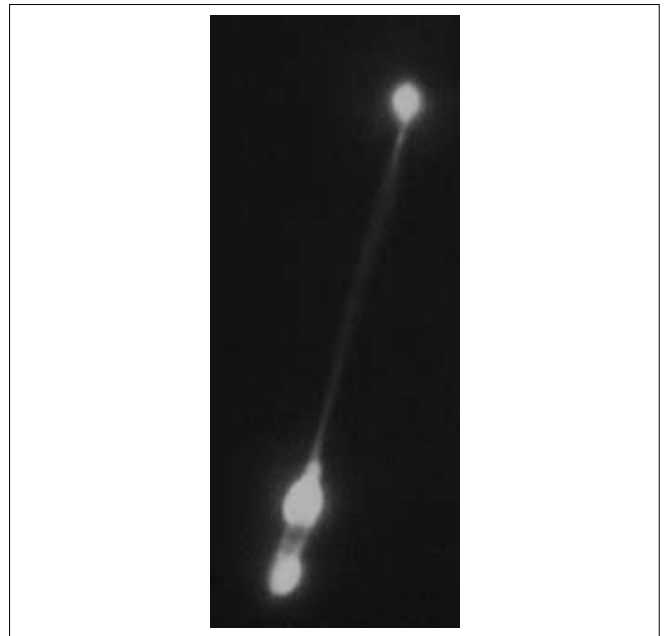


Figura 1 - Padrão de fluorescência observado em células normais vivas.



Figura 2 - Padrão de fluorescência observado em células vivas com translocação da fosfatidilserina.



Figura 3 - Padrão de fluorescência observado em células necróticas.

Resultados

A concentração média de espermatozoides foi de $81,6 \pm 20,5 \times 10^6/\text{mL}$, motilidade média de $73,4 \pm 6,8\%$ e morfologia normal de $9 \pm 2,2\%$.

A porcentagem média de espermatozoides vivos, apoptóticos e mortos antes do congelamento foi de $61,6 \pm 8,1\%$, $32,5 \pm 7,0\%$ e $6,0 \pm 4,1\%$, respectivamente. Após o congelamento/descongelamento, estas médias foram respectivamente de $49,4 \pm 8,9\%$, $42,9 \pm 6,8\%$ e $7,7 \pm 4,6\%$.

Tabela 1 - Valores médios da proporção de espermatozoides vivos, apoptóticos e mortos ligados à anexina V segundo a concentração, antes do congelamento

Ligação à anexina V	Concentração de espermatozoides ($\times 10^6/\text{mL}$)		p*
	20-60 (n=8)	> 60 (n=8)	
	Média (EP)	Média (EP)	
Vivos	49,7 (5,8)	73,4 (3,2)	0,004
Apoptóticos	41,4 (4,0)	23,6 (3,1)	0,013
Mortos	8,9 (4,0)	3,1 (1,2)	0,177

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney; EP: erro padrão.

Tabela 2 - Valores médios da peroxidação lipídica segundo a motilidade espermática, antes do congelamento

Peroxidação lipídica MA + 4HA ($\mu\text{mol/L}/10^6$ espermatozoide)	Motilidade de espermatozoides (%)	
	≤ 75	> 75
Média	0,74	0,54
EP	0,32	0,24
n	8	8
p*	0,635	

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Tabela 3 - Valores médios da peroxidação lipídica, segundo a morfologia dos espermatozoides antes do congelamento

Peroxidação lipídica MA + 4HA ($\mu\text{mol/L}/10^6$ espermatozoide)	Morfologia de espermatozoides (% normal)	
	≤ 8	> 8
Média	0,81	0,46
EP	0,31	0,24
n	8	8
p*	0,398	

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Tabela 4 - Valores médios da proporção de espermatozoides vivos, apoptóticos e mortos ligados à anexina V segundo a concentração, após o congelamento/descongelamento

Ligação à anexina V	Concentração de espermatozoides ($\times 10^6/\text{mL}$)		p*
	20-60 (n=8)	>60 (n=8)	
	Média (EP) (%)	Média (EP) (%)	
Vivos	42,6 (6,2)	56,1 (6,8)	0,063
Apoptóticos	46,4 (3,4)	39,4 (6,6)	0,200
Mortos	11,0 (4,7)	4,4 (1,0)	0,274

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Verificou-se que o valor médio de MA+4HA antes do congelamento e após o congelamento/descongelamento foi de $0,63 \pm 0,39$ e $4,11 \pm 1,8 \mu\text{mol/L}/10^6$ espermatozoide, respectivamente.

Antes do congelamento, no grupo com concentração espermática acima de $60 \times 10^6/\text{mL}$, quase 3/4 dos espermatozoides estavam vivos, menos de 25% eram apoptóticos e apenas 3% estavam mortos. No grupo com concentração espermática de 20 a $60 \times 10^6/\text{mL}$, 50% estavam vivos, mais de 40% eram apoptóticos e menos de 10% estavam mortos (Tabela 1).

Houve diferenças não-significativas na proporção de espermatozoides vivos ($58,3 \pm 7,0\%$ e $64,9 \pm 6,2\%$), apoptóticos ($32,6 \pm 4,1\%$ e $32,4 \pm 6,0\%$) e mortos ($9,3 \pm 3,9\%$ e $2,7 \pm 1,2\%$) entre os grupos com motilidade $\leq 75\%$ e > 75 , respectivamente. A proporção de espermatozoides mortos foi quatro vezes maior no grupo com menos motilidade, porém esta diferença não chegou a atingir significação estatística ($p=0,08$).

Não houve diferença significativa na aderência à anexina V, segundo a morfologia dos espermatozoides na avaliação realizada pré-congelamento, vivos ($61,1 \pm 8,5\%$ e $62,0 \pm 4,3\%$), apoptóticos ($31,7 \pm 5,6\%$ e $33,3 \pm 4,6\%$) e mortos ($7,1 \pm 4,3\%$ e $4,9 \pm 1,2\%$), respectivamente entre os grupos com morfologia ≤ 8 e > 8 .

A peroxidação lipídica, antes do congelamento, foi 100% maior no grupo com concentração de espermatozoides acima de $60 \times 10^6/\text{mL}$ ($0,82 \pm 0,25 \mu\text{mol/L}/10^6$ espermatozoide) quando comparado com o grupo entre 20 a $60 \times 10^6/\text{mL}$ ($0,40 \pm 0,31 \mu\text{mol/L}/10^6$ espermatozoide) mas, no entanto esta diferença não foi significativa ($p=0,08$).

Não houve diferença na peroxidação lipídica segundo a motilidade dos espermatozoides na avaliação realizada pré-congelamento (Tabela 2).

A mensuração da peroxidação lipídica antes do congelamento foi quase 100% maior no grupo com a morfologia espermática normal $\leq 8\%$ do total de espermatozoides quando comparado com o grupo de melhor morfologia ($> 8\%$), mas a diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 3).

A proporção de espermatozoides vivos pós-congelamento foi 14 pontos percentuais maior no grupo com concentração acima de $60 \times 10^6/\text{mL}$, que no grupo com menor concentração, mas essa diferença não atingiu significação estatística ($p=0,07$), conforme Tabela 4.

Houve apenas pequenas diferenças segundo motilidade na proporção de espermatozoides vivos, apoptóticos e mortos na avaliação realizada pós-congelamento/descongelamento (Tabela 5). Não houve diferenças na aderência à anexina V segundo a morfologia dos espermatozoides na avaliação realizada pós-congelamento (Tabela 6).

Após o congelamento/descongelamento dos espermatozoides, a peroxidação lipídica foi duas vezes maior no grupo com menor concentração espermática (20 a $60 \times 10^6/\text{mL}$), no

Tabela 5 - Valores médios da proporção de espermatozoides vivos, apoptóticos e mortos ligados à anexina V segundo a motilidade, após o congelamento-descongelamento.

Ligação à anexina V	Motilidade de espermatozoides (%)		p*
	≤75 (n=8)	>75 (n=8)	
	Média (EP) (%)	Média (EP) (%)	
Vivos	46,7 (6,4)	52,0 (7,5)	0,564
Apoptóticos	43,9 (4,5)	42,0 (6,1)	0,848
Mortos	9,4 (4,4)	6,0 (2,5)	0,440

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Tabela 6 - Valores médios da proporção de espermatozoides vivos, apoptóticos e mortos ligados à anexina V segundo a morfologia dos espermatozoides, após o congelamento-descongelamento

Ligação à anexina V	Morfologia		p*
	≤8 (n=8)	>8 (n=8)	
	Média (EP) (%)	Média (EP) (%)	
Vivos	52,4 (7,3)	46,3 (6,5)	0,701
Apoptóticos	38,9 (4,9)	47,0 (5,4)	0,481
Mortos	8,7 (4,5)	6,7 (2,4)	0,949

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Tabela 7 - Valores médios da peroxidação lipídica segundo a concentração de espermatozoides, após o congelamento-descongelamento

Peroxidação lipídica MA + 4HA (μmol/L/10 ⁶ espermatozoide)	Concentração de espermatozoides (x10 ⁶ /mL)	
	20-60	>60
Média	5,72	2,87
EP	1,42	0,94
N	7	9
p*	0,101	

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

entanto esta diferença não foi significativa (p=0,07), de acordo com a Tabela 7.

Não houve diferença na peroxidação lipídica segundo a motilidade espermática na avaliação realizada pós-congelamento/descongelamento (Tabela 8). A Tabela 9 mostra que não houve diferença na peroxidação lipídica segundo a morfologia dos espermatozoides na avaliação realizada pós-congelamento/descongelamento.

Houve uma correlação entre espermatozoides vivos e sua concentração antes do congelamento (p=0,015), conforme a Tabela 10. Também ocorreu uma correlação negativa entre a concentração de espermatozoides e sua aderência à anexina V

Tabela 8 - Valores médios da peroxidação lipídica segundo a motilidade espermática, após o congelamento-descongelamento

Peroxidação lipídica MA + 4HA (μmol/L/10 ⁶ espermatozoide)	Motilidade (%)	
	≤75	>75
Média	4,41	3,83
EP	1,22	1,32
n	8	8
p*	0,674	

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Tabela 9 - Valores médios da peroxidação lipídica segundo a morfologia dos espermatozoides, após o congelamento-descongelamento

Peroxidação Lipídica MA + 4HA (μmol/L/10 ⁶ espermatozoide)	Morfologia	
	≤8	>8
Média	3,00	5,24
EP	0,90	1,44
n	8	8
p*	0,208	

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Tabela 10 - Variáveis associadas à proporção média de espermatozoides vivos, apoptóticos e mortos antes do congelamento – regressão linear múltipla (n=16)

Ligação à anexina V/ análise seminal básica	Coefficiente	EP coeficiente	p	r
Vivos				0,64
Concentração de espermatozoides	0,25	0,09	0,015	
Constante	40,71	8,18	<0,001	
Apoptóticos				0,98
Concentração de espermatozoides	-0,28	0,05	<0,001	
Motilidade de espermatozoides	0,76	0,07	<0,001	
Mortos				
Sem variáveis associadas				

r: coeficiente de correlação.

(apoptóticos) antes do congelamento. Ocorreu ainda uma correlação entre a motilidade e a presença de espermatozoides apoptóticos no ejaculado.

Nesse estudo, encontrou-se uma associação entre a concentração de espermatozoides e a aderência à anexina V antes do congelamento. No entanto, não foi encontrada associação da motilidade e morfologia com a aderência à anexina V. Adicionalmente, não foi encontrada associação entre qualquer parâmetro da análise seminal básica com peroxidação lipídica espontânea. A presença de espermatozoides vivos (anexina V negativa) foi 50% maior, antes do congelamento, naqueles pacientes com concentração maior que 60 x 10⁶/mL que entre aqueles

com concentrações menores. Já a presença de células apoptóticas (anexina V positiva) foi 57% maior no grupo com menor concentração espermática. A proporção de espermatozoides mortos foi três vezes maior no grupo com menor motilidade antes do congelamento, mas o valor de p foi $>0,05$ $<0,10$. O baixo poder estatístico do tamanho amostral não permite descartar que essa associação possa existir.

Por outro lado, houve uma tendência à associação entre a concentração de espermatozoide antes do congelamento e a aderência à anexina V após o congelamento. A perda da motilidade foi maior em pacientes com menor concentração de espermatozoides antes do congelamento. No pós-congelamento/descongelamento houve essa diferença, mas menos pronunciada, não atingindo significância estatística.

Discussão

Tem sido mostrado que a aderência à anexina V, combinado com iodeto de propídio é mais sensível para detectar a deterioração das funções da membrana do que o corante vital iodeto de propídio isolado¹⁰. A membrana é normalmente impermeável ao iodeto de propídio. No entanto, células mortas perdem sua capacidade de resistir ao influxo do propídio resultando numa coloração intracelular. Nesse estudo, foi usado anexina V em combinação com 6-CFDA, sendo que este componente é convertido para 6-CF por meio da enzima estearase nas células vivas, o qual permite clara distinção sob microscópio epifluorescente células vivas normais, células vivas com membrana alterada (aqui apresentando translocação da fosfatidilserina) e células necróticas (mortas). Foi observado que a anexina V cora o espermatozoide como um todo (cabeça, peça intermediária e flagelo) em mais de 90% das células anexina V⁺ numa lâmina¹⁵. Dessa forma postula-se que a fosfatidilserina é translocada para o folheto externo da membrana celular. Em outros sistemas celulares, esse fenômeno é considerado um sinal precoce da morte celular programada⁹.

Foi relatado que pacientes com parâmetros anormais do espermograma eram mais suscetíveis ao dano do congelamento/descongelamento, o que poderia explicar a maior aderência à anexina V encontrada nesta pesquisa. Outros estudos não encontraram correlação entre a qualidade seminal e apoptose em espermatozoides humanos^{7,8,24}.

Em estudos utilizando espermatozoides humanos^{15,20-22} foi evidenciada uma diminuição mais acentuada na porcentagem de espermatozoides vivos, após congelamento/descongelamento em pacientes masculinos de casais inférteis quando comparados com doadores. A concentração de espermatozoides era maior em doadores do que em pacientes subférteis, apesar de estarem ambos os grupos dentro dos limites da normalidade. É possível postular que possa existir uma relação entre aspectos da análise

seminal básica e maior suscetibilidade ao criodano da membrana plasmática medido por meio da aderência à anexina V. Esta hipótese está de acordo com os achados desta pesquisa, na qual observou-se uma menor porcentagem de espermatozoides vivos após congelamento/descongelamento naqueles homens subférteis com menor concentração espermática no ejaculado. Outros autores relataram haver um menor dano no DNA de homens voluntários, com análise seminal normal, quando comparados com homens sendo examinados por infertilidade, explicando sua subfertilidade^{3,25}.

A literatura registra a medida do MA e 4-hidroxiálkenal, indicadores de peroxidação lipídica cumulativa^{5,26}. A combinação do sulfato de ferro e ascorbato de sódio tem sido utilizada para induzir a peroxidação lipídica, assim como promover a divisão dos peróxidos de lipídios em alquenois menores como o MA, desse modo sensibilizando o sistema de detecção da LPO¹. Níveis de MA podem variar em até dez vezes entre doadores de sêmen, e variações consideráveis ocorrem em diferentes ejaculados de um mesmo indivíduo.

A ausência de associação entre peroxidação lipídica e parâmetros do espermograma encontrada neste estudo, está de acordo com evidências já publicadas na literatura. O uso do kit LPO-586 em espermatozoides móveis é o método mais sensível e confiável para avaliar LPO, incluindo a falta de dependência na remoção de leucócitos contaminantes²⁶. Existem evidências de que o estresse da membrana plasmática pode contribuir mais do que peroxidação lipídica para o criodano subletal do espermatozoide humano. A contribuição peroxidativa é negligível, mas a contribuição de transições de fases da membrana, tornando-a mais susceptível a fraturas durante a criopreservação, é substancial⁵, o que vem ao encontro ao relatado nesse estudo, no qual não se observou um incremento da peroxidação lipídica relacionado a qualquer característica seminal básica em espermatozoides humanos congelados/descongelados.

Alguns autores não encontraram correlação significativa entre morfologia pré-congelamento ou LPO e perda da motilidade pós-descongelamento^{2,3-5}. Esses achados poderiam justificar a ausência de associação entre LPO e parâmetros da análise seminal básica encontrada nesse estudo.

Alguns estudos encontraram uma correlação negativa entre a motilidade e LPO em espermatozoides humanos frescos, atribuindo o decréscimo na motilidade ao acréscimo da LPO. Em outros sistemas celulares (células neurais e gliais), a mudança da composição lipídica não previne mudanças na estrutura da membrana induzidas pelas baixas temperaturas. Ao contrário, elas podem permitir a reversibilidade dessas mudanças e neutralizar o efeito deletério potencial²⁷.

Esse é o primeiro estudo, até onde chega ao conhecimento, em que se comparou parâmetros da análise seminal básica (concentração

de espermatozoides, motilidade, morfologia), com a aderência à anexina V e peroxidação lipídica espontânea relacionados ao congelamento/descongelamento em espermatozoides humanos.

Aqui há um pequeno tamanho amostral, que se justifica pelo alto custo do material utilizado e por tratar-se do primeiro estudo sobre o tema. Por outra parte, considerando que para cada análise da aderência à anexina V eram contados de 200 a 400 espermatozoides, pode-se considerar que o valor deste estudo está longe de ser desprezível.

Por meio de uma melhor análise, pode ser fornecido um melhor aconselhamento quanto ao dano de membrana plasmática aos homens subfêrteis que se submetem ao congelamento/descongelamento.

Pacientes com menor concentração de espermatozoides têm maior probabilidade de criodano medido pela anexina V. A necessidade de estabelecer um limite de concentração que indicaria ou não o congelamento deve ser motivo de estudos futuros.

Do ponto de vista prático, este estudo sugere fortemente que os limites inferiores de normalidade do espermograma podem não ser válidos quando o que se propõe é conservar os

espermatozoides por meio de congelamento para posterior utilização. Pelo pequeno número de casos, não foi possível neste estudo precisar um limite de concentração, abaixo do qual não se justificaria a criopreservação. Os resultados aqui apresentados justificam, no entanto, um chamado de alerta ao uso deste procedimento no caso de indivíduos com ejaculados com concentrações baixas, próximas ao limite inferior da normalidade.

A observação de que homens com menor concentração de espermatozoides no ejaculado apresentam maior percentagem de espermatozoides com apoptose antes e após o congelamento levanta a questão de que esses poderiam ter maior dano durante o processo de criopreservação. Outros estudos são necessários para se determinar qual seria o ponto de corte na concentração espermática que determinaria um prejuízo importante da função espermática após a criopreservação. Este estudo abre também uma nova linha de pesquisa que é avaliar o efeito destas alterações de exposição de fosfatidilserina da membrana plasmática no potencial do espermatozoide em sofrer a reação acrossômica espontânea ou induzida, avaliando desta forma o potencial reprodutivo destes homens.

Referências bibliográficas

1. Aitken, RJ. Sperm function tests and fertility. *Int J Androl.* 2006;29(1):69-75.
2. Weber RF, Dohle GR, Romijn JC. Clinical laboratory evaluation of male subfertility. *Adv Clin Chem.* 2005;40:317-64.
3. Paasch U, Grunewald S, Glander HJ. Sperm selection in assisted reproductive techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;65:515-25.
4. The American Fertility Society. New guidelines for the use of semen donor insemination: 1990. *Fertil Steril.* 1990;53(1):1S-3S.
5. Wang Y, Sharma RK, Agarwal A. Effect of cryopreservation and sperm concentration on lipid peroxidation in human semen. *Urology.* 1997;50(3):409-13.
6. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. *Curr Opin Urol.* 2006;16(6):428-34.
7. Said TM, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Glander HJ, Paasch U. Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reprod Biomed Online.* 2006;13(3):336-9.
8. Grunewald S, Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *Int J Androl.* 2008;31(3):325-30.
9. Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gaviño F, Oehninger S. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril.* 2006;85(1):149-54.
10. Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod.* 1999;5(2):109-15.
11. Anzar M, Buhr MM, Pauls KP. Flow cytometric detection of early apoptosis in bull sperm using fluorescein-labeled annexin V. *Biol Reprod.* 2000;62(1):135.
12. Müller K, Pomorski T, Müller P, Herrmann A. Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *J Cell Sci.* 1999;112(Pt 1):11-20.
13. Gadella BM, Miller NG, Colenbrander B, van Golde LM, Harrison RA. Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. *Mol Reprod Dev.* 1999;53(1):108-25.
14. Schuffner A, Morshedi V, Vaamonde D, Duran EH, Oehninger S. Effect of different incubation conditions on phosphatidylserine externalization and motion parameters of purified fractions of highly motile human spermatozoa. *J Androl.* 2002;23(2):194-201.
15. Schuffner A, Morshedi M, Oehninger S. Cryopreservation of fractionated, highly motile human spermatozoa: effect on membrane

- phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. *Hum Reprod.* 2001;16(10):2148-53.
16. Harrison RA, Gadella BM. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology.* 2005;63(2):342-51.
 17. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. *Curr Opin Urol.* 2006;16(6):428-34.
 18. Kotwicka M, Filipiak K, Jedrzejczak P, Warchol JB. Caspase-3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: is there a relationship? *Reprod Biomed Online.* 2008;16(5):657-63
 19. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;250(1-2):66-9.
 20. Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-thawing of fractionated spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. *Fertil Steril.* 2001;75(2):263-8.
 21. Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J Androl.* 2001;22(4):646-51.
 22. Schuffner A, et al. Apoptosis-related changes of fractionated human spermatozoa: effects of cryopreservation-thawing and incubation conditions. *J Bras Reprod Assist.* 2001b; 5(3):7-13.
 23. The American Fertility Society. Guidelines for gamete donation: 1993. *Fertil Steril.* 1993; 59(1):1S-9S.
 24. Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, et al. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod.* 2002;17(10):2665-72.
 25. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod.* 2004;19(1):129-38.
 26. Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl.* 1998;21(2):81-94.
 27. Azzam NA, Hallenbeck JM, Kachar B. Membrane changes during hibernation. *Nature.* 2000;407(6802):317-8.

Recebido em: 11/12/2008

Aprovado para publicação: 19/12/2008