




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.

Reprodução & Climatério

Volume 24 • Número 1
Janeiro/Março 2009

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
Goiania, GO - 74675-830 - Brasil
Tel (+55 -62) 3207.2800

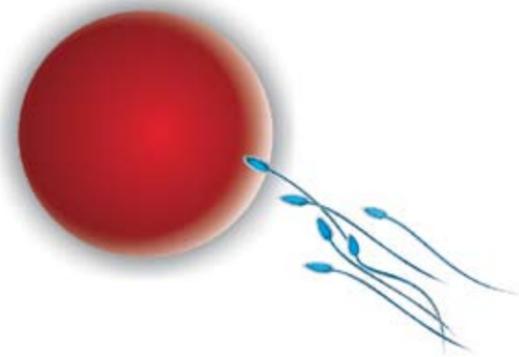


Meizler
BIOPHARMA S/A

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



XXXV CONGRESSO BRASILEIRO DE



REPRODUÇÃO HUMANA TEÓRICO E PRÁTICO

24 A 27 NOVEMBRO 2010

CENTRO DE CONVENÇÕES DE GOIÂNIA - GO

Realização:



SOCIEDADE BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO HUMANA
SBRH

www.sbrh.org.br
Tel.: (11) 5055-6494 / 5055-2438



UNICRED



"Banco Oficial:"

Apoio:

Secretaria Executiva:

Al. Cel. Joaquim Bastos, nº 243,
Setor Marista - Goiânia-GO
Cep: 74175-150
Telefax: (62) 3092-5407
site: www.sbrhcongresso2010.org.br
e-mail: congresso2010@sbrh.org.br

Inscreeva-se já

Faça sua inscrição pelo site: "www.sbrhcongresso2010.org.br"

Nome:			Taxa de Inscrição	Até	Até
Nome para crachá:				10/07/09	10/11/09
CPF:		Sócio da SBRH			
CRM:	UF do CRM:	RG:	Não Sócio	R\$ 280,00	R\$ 320,00
Endereço:			Pós-Graduando	R\$ 150,00	R\$ 200,00
CEP:	Cidade:	UF:	Acadêmico	R\$ 100,00	R\$ 150,00
Telefone:		E-mail:			

53º Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia

14 a 17 de novembro de 2009
Expominas - Belo Horizonte/MG



Igreja São Francisco de Assis - foto Carla Cruz

Informações: 31 3261-3873 | Inscrições: www.febrasgo.org.br/53cbgo

REALIZAÇÃO



www.sogimig.org.br

EMPRESA ORGANIZADORA



tel.: 31 3261-3873
cbgo2009@febrasgo.com.br
www.suporteeventos.com.br

AGÊNCIA DE TURISMO OFICIAL



tel.: 31 3281-6414
www.macviagens.com.br

COMERCIALIZAÇÃO



tel.: 11 3825-2163
carve@carve.com.br

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@sbrh.org.br Site: www.sbrh.org.br

Diretoria Biênio 2009-2010

Presidente

Dr. Waldemar Naves do Amaral

1º Vice-Presidente

Dr. Álvaro Petracco

2º Vice-Presidente

Dr. Ivis Alberto Lourenço Bezerra de Andrade

Secretário Executivo

Dr. Artur Dzik

Secretário Adjunto

Dr. Claudio Barros Leal Ribeiro

Tesoureiro Geral

Dr. Vilmon de Freitas

Tesoureiro Adjunto

Dr. Luiz Augusto Antonio Batista

Diretor Científico

Dr. Dirceu Henrique Mendes Pereira

Presidente do Conselho de Delegados

Dr. João Pedro Junqueira Caetano

Delegados da SBRH — Biênio 2009-2010

AC - Julio Eduardo Gomes Pereira

AL - Fábio Castanheira

AP - Gisele Ghammachi

AM - Lourivaldo Rodrigues de Sousa

BA - Karina de Sá Adami Gonçalves Brandão

CE - Fábio Eugênio Magalhães Rodrigues

DF - Vinicius Medina Lopes

ES - Jules White Soares Sousa

GO - Mário Approbato

MA - Evaldo Reis Silva

MT - Sebastião Freitas de Medeiros

MS - Suely de Souza Resende

MG - Rivia Mara Lamaita

PA - Nelson Luiz de Oliveira Santos

PB - Antonio Araujo Ramos Junior

PR - César Augusto Cornel

PE - Arminio Motta Collier

PI - André Luiz Eigenheer da Costa

RJ - Isaac Moise Yadid

RN - Angélica Maria Faustino de Souza

RS - Adriana Cristine Arent

RO - Marines Rodrigues Santos César

RR - José Antonio Nascimento Filho

SC - Jean Lois Maillard

SP (interior) - Antônio Hélio Oliani

SP (capital) - Nilka Donadio

SE - George Hamilton Caldas

TO - Fábio Roberto Ruiz de Moraes

Editorial

- 5 Endometriose no início da vida reprodutiva: laparoscopia sempre?

Mario Cavagna

Atualização

- 7 Uso dos marcadores endócrinos da reserva ovariana em reprodução assistida

Use of ovarian reserve endocrine markers in assisted reproduction

Bruno Ramalho de Carvalho, Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva, Júlio César Rosa e Silva, Rodrigo Alves Ferreira, Rui Alberto Ferriani, Marcos Felipe Silva de Sá

Artigo Original

- 13 A terapia hormonal como causa de sangramento uterino após a menopausa: avaliação histeroscópica de 469 casos

Hormonal replacement therapy as cause of abnormal uterine bleeding in postmenopausal women: hysteroscopy evaluation of 469 cases

Caio Parente Barbosa, Ângela Mara Bentes de Souza, Marcelo Ettruri Santos, Karina Zulli, Denise Maria Christofolini, Bianca Bianco, Lourdes Conceição Martins

- 18 Inseminação intrauterina: uma alternativa realista em reprodução assistida

Intrauterine insemination: a realistic alternative in assisted reproduction

Alessandro Schuffner, Rodrigo Sell Poletto, Thiago Placido

- 23 Ação do estrogênio na resistência vascular da artéria central da retina em mulheres na pós-menopausa

Effect of estrogen on vascular resistance of the central retinal artery in postmenopausal women

Alice Fátima Melgaço Faria, Marco Aurélio Martins de Souza, Gisele Rotschild, Selmo Geber

- 29 *In vitro* embryo development after pre- and/or postnatal exposure of five-month-old Swiss Albino female mice to particulate air pollution

Desenvolvimento embrionário in vitro após a exposição pré e/ou pós-natal de fêmeas de camundongo da linhagem Swiss Albino com cinco meses de idade à poluição ambiental particulada

Mariangela Maluf, Paulo Marcelo Perin, Daniela Aparecida Nicolosi Foltran Januário, Paulo Hilário Nascimento Saldiva

Opinião

- 41 Bioética e biojuridicização na reprodução humana assistida

Bioethics and biolaw in assisted human reproduction

Kalyne Lobão

Errata

No volume 23, número 4, página 150, a autoria correta do artigo “Papel atual da histeroscopia diagnóstica no diagnóstico das doenças intrauterinas” é: Ivone Dirk de Sousa Filogônio, Ivete de Ávila, Márcia Mendonça Carneiro.

Márcia Mendonça Carneiro é professora do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

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 seqüência:

Página de rosto: título do trabalho em português e inglês (o título não deverá ser colocado em negrito ou caixa alta); título conciso (de 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&tIng=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.

Endometriose no início da vida reprodutiva: laparoscopia sempre?

Nos últimos anos, tem-se notado significativo aumento na incidência de endometriose em adolescentes e em adultos jovens no início da vida reprodutiva. O maior conhecimento da doença e métodos diagnósticos mais acessíveis participam desse fato, que se reveste de particular importância ao se considerar que a endometriose é uma doença evolutiva que pode, com a reação inflamatória crônica induzida pelas lesões, levar a importantes alterações anatômicas na pelve, com aderências generalizadas e perda da função tubárea. Como resultado, dor pélvica e infertilidade são frequentes. Na população geral, a endometriose incide em cerca de 10% das mulheres em idade reprodutiva¹. A prevalência de endometriose pode chegar a 30-50% em mulheres que apresentem dor pélvica crônica ou infertilidade^{1,2}. Dados do grupo italiano para o estudo da endometriose sugerem que a afecção atinge 30% das mulheres com diagnóstico de infertilidade, 45% das mulheres com dor pélvica crônica e 35% das mulheres com diagnóstico de cisto ovariano³. Outros estudos relatam incidência de 22% em mulheres férteis e assintomáticas que se submetem à esterilização tubárea⁴. Em adolescentes, relata-se que até 70% dos jovens com dor pélvica crônica que não respondem a medicamentos habituais, podem apresentar endometriose⁵. A conduta nessas jovens pacientes deve ser cuidadosa e particularizada. Chama atenção o recente relato de Di Prospero e Micucci⁶, que descrevem falência ovariana prematura em dez pacientes submetidas à laparoscopia para tratamento de endometriose ovariana em um período de 5 a 24 meses. Nessas pacientes, foram excluídos fatores comumente associados a tal situação, como história familiar, problemas tireoidianos e doença de Addison. Ressalta-se, também, que a cirurgia para endometriose pode ser considerada mais citorredutora do que curativa, tendo-se em vista que a recorrência situa-se em torno de 21,5% em dois anos e de 40 a 50% em cinco anos, de acordo com dados apresentados por Guo⁷. Levando-se em conta o que foi exposto, a conduta pode e deve ser individualizada para cada paciente, de acordo com as suas queixas, antecedentes pessoais e familiares, exames ginecológicos, exames de imagem e marcadores como o CA-125. O rigoroso controle da jovem com suspeita de endometriose, realizado por meio de avaliação clínica frequente, exames de imagem e laboratoriais em associação à terapia supressora da menstruação como alternativa à laparoscopia deve ser considerado nesse grupo de pacientes; o objetivo é tentar evitar procedimentos mais invasivos, que possam comprometer o futuro reprodutivo dessas mulheres.

Mario Cavagna

Referências bibliográficas

1. Rogers PA, D'Hooghe TM, Fazleabas A, Gargett CE, Giudice LC, Montgomery GW, et al. Priorities for endometriosis research: recommendations from an international consensus workshop. *Reprod Sci.* 2009;16(4):335-46.
2. Ozkan S, Murk W, Arici A. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1127:92-100.
3. Venturini PL, Semino A, de Cecco L. *Endometriosis: patofisiologia e clinica.* Genova: The Parthenon Publishing Group; 1994.
4. Wardle PG, Hull MG. Is endometriosis a disease? *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1993;7(4):673-85.
5. Propst AM, Laufer MR. Endometriosis in adolescents. Incidence, diagnosis and treatment. *J Reprod Med.* 1999;44(9):751-8.
6. Di Prospero F, Micucci G. Is operative laparoscopy safe in ovarian endometriosis? *Reprod Biomed Online.* 2009;18(2):167.
7. Guo, SW. Recurrence of endometriosis and its control. *Hum Reprod Update.* 2009. [Epub ahead of print]

Uso dos marcadores endócrinos da reserva ovariana em reprodução assistida

Use of ovarian reserve endocrine markers in assisted reproduction

Bruno Ramalho de Carvalho¹, Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva², Júlio César Rosa e Silva³, Rodrigo Alves Ferreira³, Rui Alberto Ferriani⁴, Marcos Felipe Silva de Sá⁴



Bruno Ramalho de Carvalho é médico formado pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Minas Gerais. Fez Residência Médica em Ginecologia, Obstetrícia e Reprodução Humana pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). É pós-graduando pelo Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, onde trabalha com avaliação de reserva ovariana, endometriose e preservação de fertilidade após o câncer.

Resumo

A avaliação da reserva folicular ovariana em reprodução assistida surge como uma tentativa de avaliar o potencial reprodutivo da mulher e nortear protocolos individualizados de estimulação, garantindo melhor aconselhamento aos casais e amenizando encargos emocionais e financeiros de um processo cujos resultados ainda se encontram aquém do desejado. Neste artigo, são abordados aspectos atuais do uso de marcadores endócrinos na propedêutica de casais subfêrteis.

Unitermos: Reserva ovariana; FIV; ICSI; Infertilidade; Reprodução assistida

Abstract

Evaluation of ovarian follicular reserve in assisted reproduction programs appears as a strategy to assess woman's reproductive potential and permit to establish directions to delineate individualized stimulation protocols, providing adequate counseling to subfertile couples and diminishing emotional and financial duties in a process which is still far from desired results. In this article, recent aspects of ovarian reserve endocrine markers during subfertile couples' evaluation are discussed.

Uniterms: Ovarian reserve; IVF; ICSI; Infertility; Assisted reproduction.

¹ Médico pós-graduando do Setor de Reprodução Humana 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 Professor Doutor do Setor de Reprodução Humana 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 Médico Assistente do Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

⁴ Professor Titular do Setor de Reprodução Humana 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: Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva – Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Avenida Bandeirantes, 3.900, 1º andar – Monte Alegre – CEP 14048-900 – Ribeirão Preto/SP – Fone: (16) 3602-2926 – E-mail: anasars@fmrp.usp.br

Introdução

Na segunda metade do século 20, marcada por movimentos de emancipação da mulher e pela modificação do seu papel social e econômico, observaram-se a disseminação dos métodos contraceptivos hormonais e a conseqüente dissociação dos conceitos de reprodução e sexualidade, antes tradicionalmente unificados. Em razão da postergação da maternidade e do aumento marcante na incidência da primeira gestação próximo aos 30 anos de idade¹, resultantes naturais do processo, tem-se dado uma atenção especial às possíveis mudanças na dinâmica folicular ovariana com potencial redução funcional e caracterização de quadros de subfertilidade.

A perda progressiva da população folicular ovariana após os 30 anos de idade é conhecida há mais de meio século e sua estimativa é de 75% ao longo da quarta década de vida². Entretanto, apesar da exaustão folicular, as alterações ocorrem conspicuamente em ambiente gonadal e a grande maioria das mulheres subférteis permanece assintomática, com ciclos menstruais aparentemente normais por vários anos^{1,3}.

Nesse contexto, nota-se um aumento da procura por serviços de assistência em reprodução humana e incita-se a busca de instrumentos propedêuticos capazes de permitir adequado aconselhamento ao casal, bem como a identificação de menores chances de gestação por técnicas de reprodução assistida (RA). Sendo assim, a aferição da reserva funcional ovariana carrega a intenção de apontar a quantidade e a qualidade do pool de folículos restantes nos ovários após cada ciclo menstrual, o que tem sido um grande desafio à medicina reprodutiva.

Inúmeros marcadores da reserva ovariana têm sido testados sem, entretanto, terem-se obtido conclusões consensuais sobre a relevância do uso rotineiro e o potencial na predição de bons resultados, sejam baseados na resposta folicular, no número de oócitos recuperados ou na obtenção de gestação após estímulo gonadotrófico exógeno. Suspeita-se, na verdade, que eles pouco reflitam a complexidade da dinâmica folicular ou a população de folículos primordiais remanescentes nas gônadas, não garantindo a subsequência dos ciclos ou contemplando o real potencial reprodutivo da mulher em longo prazo⁴⁻⁶. Dentre esses marcadores, são comuns as dosagens na fase folicular precoce (basais) de hormônios como o estradiol (E2) e a inibina-B, o hormônio folículo-estimulante (FSH) e, mais recentemente, o hormônio antimülleriano (AMH), bem como os testes dinâmicos de estimulação com citrato de clomifeno (TECC), análogos do GnRH (GAST) e FSH exógeno (EFORT).

Em vista dos dados controversos encontrados na literatura especializada, procuraremos discutir aqui aspectos atuais da avaliação endócrina da reserva ovariana, com foco na predição de má resposta em ciclos de RA.

Marcadores basais

Estradiol

Os dados controversos sobre o uso do E2 basal como teste de reserva ovariana não lhe garantem acurácia preditiva e revelam não existir um *cut off* com sensibilidade e especificidade suficientemente elevadas para uso como critério de inclusão ou exclusão em programas de RA⁷. Apesar de terem sido demonstrados maiores taxas de cancelamentos de ciclos e números reduzidos de oócitos aspirados quando os níveis séricos basais do E2 foram <20 pg/mL ou >60 a 80 pg/mL^{8,9}, estudos recentes não foram capazes de reproduzir diferenças significativas entre pacientes más e boas respondedoras¹⁰. Mesmo estudos favoráveis ao uso do E2 como marcador de reserva ovariana foram incapazes de demonstrar correlação significativa com o desenvolvimento folicular observado⁹ ou predizer a ocorrência de gestação¹¹⁻¹³. Assim, ao E2 basal atribui-se um potencial apenas modesto de prognosticar a resposta ao estímulo gonadotrófico exógeno, devendo estar em segundo plano no aconselhamento inicial do casal subfértil.

Hormônio folículo-estimulante

O FSH basal é o mais estudado marcador da reserva ovariana¹⁴, mas as controvérsias geradas pelas discrepâncias entre os resultados e a falta de um *cut off* bem estabelecido mantêm incógnito seu verdadeiro papel como preditor da resposta gonadal ao estímulo exógeno. É possível que seu maior problema para tal finalidade seja a grande variabilidade entre ciclos menstruais e até entre diferentes dosagens realizadas em uma mesma amostra, além das alterações provocadas por fatores externos, como o tabagismo¹⁵.

Ashrafi et al. associaram níveis séricos basais de FSH ≥ 15 UI/mL a menor número de oócitos aspirados e maior número de ciclos de RA cancelados¹⁶, enquanto Watt et al. determinaram que níveis >11,1 mUI/mL corresponderiam a uma reduzida chance de gestação¹⁷. Estudos prévios, entretanto, não corroboram esses resultados e há documentação de gestação em aproximadamente metade das mulheres com elevados valores séricos basais do FSH¹⁸. Klinkert et al. demonstraram que as taxas de gestação podem ser semelhantes entre mulheres com níveis basais normais e elevados do FSH¹⁹ e, apesar de outros estudos terem observado chances reduzidas de gestação com níveis superiores a 8 mUI/mL, não se pôde chegar a uma conclusão quanto aos resultados de RA com níveis inferiores²⁰.

Por fim, Luna et al. publicaram recentemente taxas superiores de gravidez em mulheres com menos de 35 anos e FSH basal elevado quando comparadas às de mulheres mais velhas com níveis normais²¹, levantando a questão acerca da prevalência do

fator idade sobre o perfil gonadotrófico quando se trata do potencial reprodutivo. Assim, é provável que a acurácia do FSH basal na predição de má resposta somente seja adequada quando considerados limiares séricos muito elevados, o que pela baixa frequência reduz seu valor no cotidiano clínico⁷.

Inibina B basal

O comportamento da inibina B ao longo do ciclo menstrual denuncia seu papel na moderação do desenvolvimento folicular normal e, assim, embasa a suspeição de sua eficácia como marcador da função e da reserva folicular ovariana, mas a taxa elevada de falsos positivos da dosagem rotineira poderia levar a exclusões desnecessárias de mulheres de programas de RA. Mesmo utilizando níveis basais muito baixos, a acurácia na predição de má resposta seria apenas modesta, estando o marcador em patamar semelhante ao E2 na propedêutica de casais subférteis⁷.

O estudo de Seifer et al. demonstrou que níveis séricos de inibina B ≥ 45 pg/mL, além de apresentarem maior número de oócitos, foram bons preditores de cancelamento²². Reforça-se favoravelmente o uso do marcador como preditor de sucesso em ciclos de RA, dados que demonstram correlação negativa significativa entre os níveis séricos de inibina B e FSH, além da também significativa correlação positiva entre inibina B e a contagem ultrassonográfica de folículos antrais iniciais em mulheres com até 40 anos de idade²³.

Outros estudos, entretanto, não foram capazes de reiterar os resultados favoráveis ao uso da inibina B basal como marcador da reserva ovariana²⁴⁻²⁶. Faltam na literatura estudos que confirmem uma possível associação das concentrações de inibina B à qualidade oocitária em ciclos de RA, postulada há mais de uma década^{27,28}.

Hormônio antimülleriano

Dados recentes nos levam a crer que o AMH atue como um modulador do recrutamento folicular²⁹⁻³⁰ e do crescimento folicular FSH-dependente^{29,31}, possivelmente pela regulação da expressão da aromatase e dos receptores de gonadotrofinas na superfície das células da granulosa até a etapa de folículo antral inicial (diâmetro de 6 mm)³². O uso do AMH como marcador da reserva folicular ovariana baseia-se, assim, na premissa de que representaria o estoque de folículos primordiais restantes nas gônadas após cada ciclo menstrual^{1,4,26,30,33-36}.

Além de representar a população folicular responsável pela perpetuação dos ciclos menstruais consecutivos, a reduzida variabilidade das concentrações séricas ao longo do ciclo menstrual^{3,37-39} e mesmo entre os ciclos⁶ tem garantido maior credibilidade e maleabilidade quanto ao momento de dosagem,

com valores médios de $1,4 \pm 1,1$ ng/mL³ a $2,4 \pm 1,1$ ng/mL³⁹ em mulheres normo-ovulatórias.

Em ciclos de RA, a literatura apresenta como resultado a forte correlação entre níveis do AMH e a contagem de folículos antrais³³, e sua associação significativa com cancelamento ou aspiração de número reduzido de oócitos^{5,33,36,40}. No estudo de Fiçicioglu et al., os níveis séricos basais do AMH foram significativamente maiores em mulheres com boa resposta em ciclos de RA e na predição do número de oócitos aspirados, com sensibilidade e especificidade, e valores significativos¹⁰.

A padronização dos níveis normais com boa sensibilidade e especificidade tem sido a grande lacuna para o fortalecimento do AMH como marcador de reserva ovariana. Enquanto Muttukrishna et al. apontaram sensibilidade e especificidade de 87 e 64%, respectivamente, para um *cut off* de 0,2 ng/mL na predição de má resposta em RA³⁶, La Marca et al. demonstraram sensibilidade de 80% e especificidade de 93% quando considerado limiar de 0,75 ng/mL⁴¹ e conclusões semelhantes têm sido apresentadas com limiares ainda mais elevados⁴².

Sendo o AMH um marcador relativamente recente, a escassez de estudos e a falta de padronização de um *cut off* com altas sensibilidade e especificidade ainda são problemas para seu uso rotineiro. Mesmo a sua invariabilidade ao longo do ciclo menstrual, em princípio um atrativo, foi questionada em estudo recente de Wunder et al., que encontraram flutuações significativas do AMH no final de ciclos ovulatórios de mulheres com até 32 anos de idade⁴³.

Com base nos resultados favoráveis apresentados e na demonstrada correlação significativa com variáveis importantes como a contagem de folículos antrais, a quantidade e a maturidade dos oócitos aspirados^{10,41}, enxerga-se um futuro promissor para o marcador, mas ainda é cedo para conclusões definitivas.

Marcadores dinâmicos

Teste de estímulo com citrato de clomifeno

O teste de estímulo com citrato de clomifeno (TECC) tem sido aceito como indicador prognóstico da performance reprodutiva em ciclos assistidos. No trabalho original, a predição de má resposta a RA (ocorrência de gestação) foi estipulada para a soma dos níveis do FSH ≥ 26 mUI/mL (basal e após o décimo dia do ciclo estimulado⁴⁴. Alguns anos mais tarde, sugeriu-se que a má resposta ocorreria quando a soma dos valores basal e pós-estímulo fosse superior a 22,5 UI/mL⁴⁵.

Apesar de vastamente utilizado, como ocorre com os outros marcadores, sua real aplicabilidade divide opiniões. Em estudo recente, Kwee et al. avaliaram a predição de má resposta ovariana (< 6 oócitos aspirados) pelo TECC e encontraram área sob

a curva (ROC-AUC) de 0,88 numa população com idade entre 18 e 39 anos⁴⁶. Entretanto, considerando-se o desenvolvimento de pelo menos quatro folículos como boa resposta em ciclos de RA, dados do nosso serviço demonstraram que a sensibilidade do FSH basal isoladamente foi mais expressiva que a do TECC tanto para os valores estipulados por Navot et al., quanto para os sugeridos por Loumaye et al.⁴⁷. Outros estudos concordam em demonstrar não haver qualquer vantagem do TECC sobre a dosagem basal do FSH^{7,17,48-50}, principalmente para mulheres mais jovens. Sendo assim, seu valor torna-se reduzido quando considerados aspectos como custos e efeitos adversos potenciais da hiperestimulação ovariana, devendo-se individualizar sua indicação frente à existência de testes basais menos invasivos.

Teste de estímulo com A-GNRH

Pelo teste de estimulação com a-GnRH (GAST) a elevação dos níveis sanguíneos de estradiol e inibina B 24 horas após administração da droga seria o reflexo da integridade folicular ovariana⁵¹, mas também seu valor como marcador da reserva ovariana não é consensual.

Scheffer et al. demonstraram que a produção de estradiol e inibina B foi significativamente elevada após estímulo⁵², reforçando o que já havia sido defendido por outros estudos na última década^{51,53} e a impressão de que superam os níveis hormonais basais quando se objetiva inferir a reserva folicular ovariana. Ravhon et al. Encontraram, ainda, correlação positiva significativa entre a resposta ovariana e as variáveis soma dos níveis de inibina B basal e após estímulo, e aumento do E2 após estímulo⁵³.

Hendriks et al., entretanto, avaliaram mulheres candidatas a FIV e, apesar de reconhecerem alguma habilidade do teste como marcador de reserva gonadal e preditor de gestação, defenderam não haver vantagens sobre a dosagem basal da inibina B ou mesmo à CFA⁴⁹. Mantém-se, assim, o questionamento acerca do emprego do GAST frente aos custos financeiros elevados e aos riscos de hiperestimulação exógena.

Teste de estímulo com FSH exógeno

Pelo teste de estimulação com FSH exógeno (EFORT), infere-se o aparato funcional ovariano pelo incremento nos níveis de E2 e inibina B após 24 horas da administração subcutânea de 300 UI de FSH recombinante (FSH-r) no terceiro dia do ciclo menstrual⁴⁶.

Kwee et al. afirmaram ser o EFORT o melhor preditor do número de oócitos aspirados após estimulação em RA, enquanto o TECC em nada se mostrou superior aos valores hormonais basais⁵⁴. Num estudo posterior, o mesmo grupo encontrou área sob a curva de 0,86 para predição de má resposta⁴⁶. Dessa forma, é provável que o EFORT melhore a predição da resposta ovariana quando comparado aos marcadores basais⁷. Entretanto, seu emprego rotineiro também vai de encontro aos elevados custos e aos efeitos adversos potenciais de uma estimulação exógena sem relação direta com tentativa real de se obter uma gestação, o que coloca o teste como opção para casos individualizados, em que se pesem os riscos estimados de hiperestimulação.

Considerações finais

A busca por prever a reserva funcional da gônada feminina e, assim, sua resposta à estimulação gonadotrófica exógena em ciclos de RA permitiria planejamento de protocolos individualizados, redução de encargos psicológicos e financeiros, e de efeitos colaterais potenciais do estímulo ovariano assistido. Infelizmente, as controvérsias encontradas na literatura não permitem ainda determinar um marcador isolado ou uma combinação de marcadores contundentemente capaz de identificar mulheres potencialmente más respondedoras, até o porque não se encontra disponível critério exclusivo para tal caracterização.

O AMH tem ganhado espaço na literatura especializada e assumido a perspectiva de apontar a reserva funcional ovariana, não apenas em sua quantidade, mas também em qualidade. Ainda que os indícios estejam se tornando progressivamente maiores, principalmente a sua correlação com a resposta folicular e o número de oócitos obtidos em ciclos de reprodução assistida, é cedo para conclusões em definitivo e ainda há lacunas do conhecimento a serem preenchidas.

Sendo assim, por não termos indicadores para mulheres cujas chances de gestação sejam tão próximas de zero que não se justifique submetê-las a tratamento, até mesmo a inclusão direta em programa de alta complexidade pode ser estratégia adequada para averiguação do aparelho funcional ovariano. Devemos, entretanto, ressaltar que embora os resultados na literatura sejam ainda incipientes, a contribuição tácita relega aos marcadores de reserva ovariana atualmente disponíveis a função de subsidiar o aconselhamento inicial, fundamental na abordagem do casal subfértil candidato à reprodução assistida.

Referências bibliográficas

1. te Velde E, Pearson P. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update*. 2002;8(2):141-54.
2. Block E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations at different ages. *Acta Anat (Basel)*. 1952;14(1-2):108-23.
3. Elgindy EA, El-Haieg DO, El-Sebaey A. Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril*. 2008;89(6):1670-6.
4. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*. 1996;17(2):121-55.
5. Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2005;45(1):20-4.
6. Fanchin R, Taieb J, Lozano DHM, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod*. 2005;20(4):923-7.
7. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*. 2006;12(6): 685-718.
8. Evers JL, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA. Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1998;69(6):1010-4.
9. Frattarelli JL, Bergh PA, Drews MR, Sharara FI, Scott RT. Evaluation of basal estradiol levels in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril*. 2000;74(3):518-24.
10. Fiçioğlu C, Kutlu T, Bağlam E, Bakacak Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2006;85(3):592-6.
11. Scott RT, Toner JP, Muasher SJ, Oehninger S, Robinson S, Rosenwaks Z. Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 1989;51(4):651-4.
12. Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1995;64(5):991-4.
13. Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, Levy MJ, Hall JL, Stillman RJ. Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 1995;64(6):1136-40.
14. Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I, Trimarchi JR, Lambert-Messerlian G, Seifer DB, et al. Müllerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo quality. *Hum Reprod*. 2006;21(1):159-63.
15. Lambalk CB, de Koning CH. Interpretation of elevated FSH in the regular menstrual cycle. *Maturitas*. 1998;30(2):215-20.
16. Ashrafi M, Madani T, Tehranian AS, Malekzadeh F. Follicle stimulating hormone as a predictor of ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Int J Gynaecol Obstet*. 2005;91(1):53-7.
17. Watt AH, Legedza ATR, Ginsburg ES, Barbieri RL, Clarke RN, Hornstein MD. The prognostic value of age and follicle-stimulating hormone levels in women over forty years of age undergoing in vitro fertilization. *J Assist Reprod Gen*. 2000;17(5):264-8.
18. van Montfrans JM, Hoek A, van Hooff MH, de Koning CH, Tonch N, Lambalk CB. Predictive value of basal follicle-stimulating hormone concentrations in a general subfertility population. *Fertil Steril*. 2000;74(1):97-103.
19. Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. The antral follicle count is a better marker than basal follicle-stimulating hormone for the selection of older patients with acceptable pregnancy prospects after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2005;83(3):811-14.
20. van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJC, Habbema JDF, Hompes PGA, Broekmans FJ, et al. Predictive Value and Clinical Impact of Basal Follicle-Stimulating Hormone in Subfertile, Ovulatory Women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(6):2163-8.
21. Luna M, Grunfeld L, Mukherjee T, Sandler B, Copperman AB. Moderately elevated levels of basal follicle-stimulating hormone in young patients predict low ovarian response, but should not be used to disqualify patients from attempting in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2007;87(4):782-7.
22. Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Berk CA. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril*. 1997;67(1):110-4.
23. Tinkanen H, Bläuer M, Laippala P, Tuohimaa P, Kujansuu E. Correlation between serum inhibin B and other indicators of the ovarian function. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001;94(1):109-13.
24. Hall JE, Welt CK, Cramer DW. Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome. *Hum Reprod*. 1999;14(2):409-15.
25. Corson SL, Gutmann J, Batzer FR, Wallace H, Klein N, Soules MR. Inhibin-B as a test of ovarian reserve for infertile women. *Hum Reprod*. 1999;14(11):2818-21.
26. Scheffer JB, Lozano DM, Frydman R, Fanchin R. Relationship of serum anti-Müllerian hormone, inhibin B, estradiol and FSH on day 3 with ovarian follicular status. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007;29(4):186-91.
27. Franchimont P, Hazeé-Hagelstein MT, Charlet-Renard C, Jaspar JM, Hazout A, Salat-Baroux J, et al. Correlation between follicular fluid content and the results of in vitro fertilization and embryo transfer. II. Inhibin and aromatase inhibitor activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;71(3):748-54.
28. Fowler PA, Fahy U, Culler MD, Knight PG, Wardle PG, McLaughlin EA, et al. Gonadotrophin surge-attenuating factor bioactivity is present in follicular fluid from naturally cycling women. *Hum Reprod*. 1995;10(1):68-74.

29. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong EH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1999;140(12):5789-96.
30. Fanchin R, Schönäuer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod*. 2003;18(2):323-7.
31. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2001;142(11):4891-9.
32. di Clemente N, Goxe B, R'emy JJ, Cate RL, Josso N, Vigier B, et al. Inhibitory effect of AMH upon aromatase activity and LH receptors of granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine* 1994;2(15):553-8.
33. van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, et al. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2002;17(2):3065-71.
34. Gruijters M, Visser J, Durlinger A, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;211(1-2):85-90.
35. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril*. 1999;72(5):845-51.
36. Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count, anti-müllerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG*. 2005;112(10):1384-90.
37. La Marca A, Stabile G, Arsenio AC, Volpe A. Serum anti-Müllerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod*. 2006;21(12):3103-7.
38. Hehenkamp WJK, Looman CWN, Themmen APN, de Jong FH, te Velde ER, Broekmans JM. Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(10):4057-63.
39. Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy Ch, Englert Y. Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. *Hum Reprod*. 2007;22(7):1837-40.
40. Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan N. Inhibin B and anti-Müllerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG*. 2004;111(11):1248-53.
41. La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, et al. Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod*. 2007;22(3):766-71.
42. Gnath C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod*. 2008; 23(6):1359-65.
43. Wunder DM, Bersinger NA, Yared M, Kretschmer R, Birkhäuser MH. Statistically significant changes of antimüllerian hormone and inhibin levels during the physiologic menstrual cycle in reproductive age women. *Fertil Steril*. 2008;89(4):927-33.
44. Navot D, Rosenwaks Z, Margalioth EJ. Prognostic assessment of female fecundity. *Lancet*. 1987;2(8560):645-7.
45. Loumaye E, Billion JM, Mine JM, Psalti I, Pensis M, Thomas K. Prediction of individual response to controlled ovarian hyperstimulation by means of a clomiphene citrate challenge test. *Fertil Steril*. 1990;53(2):295-301.
46. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Schoemaker J, Lambalk CB. The clomiphene citrate challenge test versus the exogenous follicle-stimulating hormone ovarian reserve test as a single test for identification of low responders and hyperresponders to in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2006;85(6):1714-22.
47. Franco RC, Ferriani RA, Moura MD, Reis RM, Ferreira RA, de Sala MM. Evaluation of ovarian reserve: comparison between basal FSH level and clomiphene test. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2002; 24(5):323-7
48. Jain T, Soules MR, Collins JA. Comparison of basal follicle-stimulating hormone versus the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. *Fertil Steril*. 2004;82(1):180-5.
49. Hendriks DJ, Broekmans FJ, Bancsi LF, de Jong FH, Looman CW, te Velde ER. Repeated clomiphene citrate challenge testing in the prediction of outcome in IVF: a comparison with basal markers for ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2005;20(1):163-9.
50. Haadsma ML, Bukman A, Groen H, Roeloffzen EMA, Groenewoud ER, Heineman MJ, et al. The number of small antral follicles (2-6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Hum Reprod*. 2007;22(7):1925-31.
51. Ranieri DM, Quinn F, Makhlof A, Khadum I, Ghutmi W, McGarrigle H, et al. Simultaneous evaluation of basal follicle-stimulating hormone and 17 beta-estradiol response to gonadotropin-releasing hormone analogue stimulation: an improved predictor of ovarian reserve. *Fertil Steril*. 1998;70(2):227-33.
52. Scheffer GJ, Broekmans FJM, Looman CWN, Blankenstein M, Fauser BCJM, de Jong FH, et al. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod*. 2003;18(4):700-6
53. Ravhon A, Lavery S, Michael S, Donaldson M, Margara R, Trew G, et al. Dynamic assays of inhibin B and oestradiol following buserelin acetate administration as predictors of ovarian response in IVF. *Hum Reprod*. 2000;15(11):2297-301.
54. Kwee J, Elting MW, Schats R, Bezemer PD, Lambalk CB, Schoemaker J. Comparison of endocrine tests with respect to their predictive value on the outcome of ovarian hyperstimulation in IVF treatment: results of a prospective randomized study. *Hum Reprod*. 2003;18(7):1422-7.

Recebido em: 01/08/2008

Aprovado para publicação: 18/02/2009

A terapia hormonal como causa de sangramento uterino após a menopausa: avaliação histeroscópica de 469 casos

Hormonal replacement therapy as cause of abnormal uterine bleeding in postmenopausal women: hysteroscopy evaluation of 469 cases

Caio Parente Barbosa¹, Ângela Mara Bentes de Souza², Marcelo Etruri Santos², Karina Zulli³, Denise Maria Christofolini⁴, Bianca Bianco⁴, Lourdes Conceição Martins⁵



Caio Parente Barbosa é médico formado pela Fundação do ABC em 1983. É Mestre em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental e Doutor em Ginecologia pela UNIFESP, e Professor Livre Docente pela Faculdade de Medicina do ABC. Atualmente, é Professor Regente de Genética e Reprodução Humana da Faculdade de Medicina do ABC.

Resumo

Objetivo: avaliar por meio de histeroscopia e biópsia dirigida a influência do uso da terapia de reposição hormonal (TRH) sobre o endométrio de mulheres menopausadas com sangramento uterino. **Material e métodos:** Foram estudadas 469 pacientes com sangramento uterino na pós-menopausa e submetidas à histeroscopia no Setor de Histeroscopia da Faculdade de Medicina do ABC (FMABC). As pacientes foram divididas em grupos: Grupo I, mulheres que faziam uso de TRH após a menopausa há mais de seis meses (n=174) e Grupo II, mulheres que nunca fizeram TRH (n=295). Para análise estatística utilizou-se o teste χ^2 . **Resultados:** os achados histeroscópicos mais frequentemente encontrados foram pólipos endometrial e endométrio atrófico tanto no Grupo I como no Grupo II. Não houve diferença significativa nos achados malignos, benignos e negativos nos dois grupos estudados. **Conclusões:** A TRH não influenciou os achados histeroscópicos e de biópsia de endométrio em mulheres após a menopausa.

Unitermos: Histeroscopia; Terapia de reposição hormonal; Endométrio.

Abstract

Purpose: to evaluate by hysteroscopy the role of hormonal replacement therapy (HRT) on the endometrial findings in women with postmenopausal bleeding. **Material and methods:** a sample of 469 patients with postmenopausal bleeding who underwent hysteroscopy procedure at Hysteroscopy Section of Faculdade de Medicina do ABC (FMABC). The patients were divided in groups: Group I, the ones with hormonal replacement therapy (HRT) (n=174) and Group II, the ones without it (n=295). For statistical analysis, the test of χ^2 was used. **Results:** hysteroscopy revealed in both groups the same diagnosis: endometrial polyps and endometrial atrophy. No differences were observed in the comparison of results found on the Groups I and II for incidence of malignant, benign pathology and even for the endometrium without abnormality. **Conclusions:** The HRT did not influence the endometrium hysteroscopic and biopsies findings in postmenopausal women.

Uniterms: Hysteroscopy; Hormonal replacement therapy; Endometrium.

¹ Professor Regente da Disciplina de Genética e Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina do ABC – Santo André (SP), Brasil.

² Assistente da Disciplina de Genética e Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina do ABC – Santo André (SP), Brasil.

³ Ginecologista e obstetra, pós-graduanda da Disciplina de Genética e Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina do ABC – Santo André (SP), Brasil.

⁴ Professora da Disciplina de Genética e Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina do ABC – Santo André (SP), Brasil.

⁵ Assistente da Disciplina de Saúde Coletiva do Departamento de Saúde Coletiva da Faculdade de Medicina do ABC (FMABC) – Santo André (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Caio Parente Barbosa – Disciplina de Genética e Reprodução Humana da Faculdade de Medicina do ABC – Avenida Príncipe de Gales, 821 – CEP: 09060-650 – Santo André/SP – Tel/Fax: (11) 4438-7299 – E-mail: caiopb@uol.com.br

Introdução

No Brasil a expectativa de vida em 2003 atingiu 66,7 anos para homens e 74,2 anos para mulheres¹. Alguns dos principais problemas que surgem com o envelhecimento são as alterações morfofuncionais do endométrio e sua principal consequência, o sangramento uterino anormal (SUA). Aproximadamente 70% das consultas ginecológicas de mulheres no período peri- e pós-menopausa ocorrem por SUA², o que demonstra a importância da boa anamnese, exame físico cuidadoso e prudência em solicitar a propedêutica armada a fim de evitar exames desnecessários. A terapia hormonal no climatério aumenta, teoricamente, a possibilidade de sangramento, principalmente pela capacidade proliferativa do estrogênio³.

A atrofia endometrial que ocorre na menopausa tem como consequência um eco endometrial menor que 4 mm de espessura e um endométrio composto por vasos sanguíneos escleróticos e glândulas⁴ e é a causa mais comum de sangramento na pós-menopausa. Dados de ultrassonografias alteradas são as mais frequentes indicações de histeroscopia, especialmente quando os achados envolvem espessamentos endometriais. Admite-se que a espessura do eco endometrial deve estar entre 4 e 7 mm, mas pode ser considerado dentro da normalidade uma espessura de 8 a 10 mm se a paciente estiver em uso de terapia hormonal⁵⁻¹².

A curetagem, que por muito tempo representou o método de escolha para diagnóstico de afecções endometriais, foi substituída com vantagem pela histeroscopia com biópsia, visto que enquanto a curetagem permite apenas coleta às cegas de material, a histeroscopia o faz sob visualização direta da cavidade endometrial, método considerado padrão-ouro para essa avaliação¹³⁻¹⁶. A efetividade diagnóstica da histeroscopia tem sido comprovada uniformemente por diversos autores, atingindo especificidade de 95,5 a 100% e sensibilidade acima de 78%¹⁷⁻¹⁹.

O teste de rastreamento para alterações do endométrio mais utilizado na prática diária é a ultrassonografia transvaginal (USGTV), que permite a investigação da espessura endometrial. Admite-se que alterações endometriais diagnosticadas por ultrassonografia devam ser sempre confirmadas e a histeroscopia é o exame de escolha para avaliar essa alteração¹⁵. A terapia hormonal no climatério propicia a proliferação do endométrio e o sangramento uterino é um sinal de alerta para investigação, pois pode estar agregado a alterações anatômicas, miomas uterinos, pólipos endometriais, espessamentos endometriais e mesmo câncer de endométrio.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio da histeroscopia e da biópsia dirigida, a influência do uso da TRH sobre o endométrio de mulheres menopausadas com sangramento uterino.

Material e método

Foram estudadas 469 mulheres na pós-menopausa atendidas no Setor de Histeroscopia da Faculdade de Medicina do ABC, cuja indicação para a realização de histeroscopia foi o sangramento uterino.

As pacientes foram divididas em dois grupos:

- Grupo I (GI): pacientes usuárias de terapia hormonal estroprogestativa há mais de seis meses (n=174);
- Grupo II (GII): pacientes que jamais receberam terapia hormonal estroprogestativa (n=295).

A histeroscopia foi feita com a paciente em posição de litotomia, introduzindo-se um histeroscópio rígido de 2,9 mm de diâmetro na cavidade uterina, sem o auxílio da pinça de Pozzi e sem dilatação do canal cervical. A cavidade foi distendida insuflando-se dióxido de carbono com um fluxo de 30 a 45 mL/minuto, mantendo uma pressão de no máximo 75 mm de Hg; iluminou-se a cavidade por meio de um cabo de fibra ótica, uma fonte de luz de xenônio de 300 W e uma câmara acoplada à ótica que transmitia, dessa maneira, a imagem obtida para um monitor de vídeo.

A avaliação uterina seguia rotina com observação do canal cervical e da cavidade uterina, seguindo-se a visualização o endométrio e das alterações glândulo-vasculares, da espessura e de possíveis irregularidades do endométrio nas paredes anterior, laterais e posterior, além de eventuais alterações anatômicas. As áreas sugestivas de alteração foram submetidas à biópsia com cureta de Novak, com instrumental de Betocchi ou com ressectoscópio, dependendo do tipo da alteração. Quando o diagnóstico histeroscópico era de endométrio atrófico, não se realizava biópsia, uma vez que esse achado é normal em mulheres pós-menopausa.

Os grupos foram comparados através do teste χ^2 e o nível de significância considerado foi 0,05 ($\alpha < 0,05$). Foram excluídas do estudo as pacientes com menos de seis meses de TRH e aquelas nas quais o exame não foi realizado por dificuldades técnicas, tais como a estenose cervical, sinéquias, perfuração uterina e dor.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina do ABC.

Resultados

Das 469 pacientes submetidas à histeroscopia diagnóstica, 174 estavam sob a TRH há mais de seis meses (GI) e 295 nunca a haviam utilizado (GII).

Os achados histeroscópicos mais frequentes foram os mesmos nos dois grupos: pólipos endometriais e endométrio atrófico. O pólipo endometrial foi encontrado em 29,3% (51/174) das pacientes do Grupo I e em 34,9% (103/295) das pacientes do Grupo II ($p=0,2118$). O endométrio atrófico foi encontrado em

26,4% (46/174) das pacientes do Grupo I e em 29,2% (86/295) das pacientes do Grupo II.

Em 60 pacientes do Grupo I e em 20 do Grupo II, a biópsia de endométrio não foi realizada ou por conta do achado de atrofia endometrial ou por material insuficiente para confirmação diagnóstica, totalizando 389 biópsias: 114 do Grupo I e 275 do Grupo II.

Os achados benignos foram encontrados em 56,2% (64/114) pacientes do Grupo I e em 49,5% (136/275) do Grupo II ($p=0,2298$). Os achados pré-malignos e malignos estavam pre-

sentes em 7% (8/114) do Grupo I e em 5,1% (14/275) do Grupo II ($p=0,4540$) (Tabelas 1 e 2).

Discussão

O sangramento uterino após a menopausa é um sinal de alerta e indica a necessidade de investigação das doenças do trato genital^{20,21}, como neoplasias. O exame ginecológico não permite o diagnóstico adequado, exceto nos casos de sangramentos de origem cérvico-vaginal. O ultrassom transvaginal é o exame que

Tabela 1 – Achados histeroscópicos e resultados anátomo-patológicos no GI

Diagnóstico histeroscópico	n	Anátomo-patológico concordante	n	Anátomo-patológico discordante	n
Pólipo de endométrio	51	Pólipo de endométrio	45	Endométrio sem atipia	4
				Hiperplasia simples de endométrio	2
Endométrio atrófico	46	Não realizado	46	—	
Mioma submucoso	13	Leiomioma	11	Pólipo de endométrio	1
				Hiperplasia simples de endométrio	1
Espessamento focal do endométrio	17	Hiperplasia simples de endométrio	1	Endométrio sem atipia	3
		Pólipo de endométrio	1	Endométrio atrófico	4
		Endometrite aguda	1		
Indefinida (suspeita)	4	Adenocarcinoma endometrióide	3	—	
		Hiperplasia atípica do endométrio	1		
Neoplasia do endométrio (formação vegetante)	7	Adenocarcinoma endometrióide	4	Endométrio sem atipia	2
Endométrio normal	36	Endométrio sem atipia	29	Hiperplasia simples de endométrio	1
Total	174		140		34

Tabela 2 – Achados histeroscópicos e resultados anátomo-patológicos no GII

Diagnóstico histeroscópico	n	Anátomo-patológico concordante	n	Anátomo-patológico discordante	n
Pólipo de endométrio	103	Pólipo de endométrio	93	Hiperplasia simples	3
				Leiomioma	4
				Neoplasia moderadamente diferenciada	2
				Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	1
Endométrio atrófico	86	Não Realizado	86	—	
Mioma submucoso	17	Leiomioma	14	Pólipo de endométrio	3
Espessamento focal do endométrio	32	Hiperplasia simples	12	Endométrio sem atipia	2
		Pólipo de endométrio	2	Endométrio atrófico	2
		Adenocarcinoma endometrióide	2		
Indefinida (suspeita)	11	Adenocarcinoma endometrióide	3	Endométrio sem atipias	5
		Carcinoma espinocelular	2		
		Hiperplasia atípica de endométrio	1		
Neoplasia de endométrio (formação vegetante)	7	Carcinoma espinocelular	2	—	
		Pólipo de endométrio	2		
		Adenocarcinoma endometrióide	1		
Endométrio normal	39	Endométrio sem atipia	31	Hiperplasia simples	2
				Pólipo de endométrio	1
Total	295		251		44

define a necessidade ou não de complementação terapêutica. Porém, apesar de sua alta sensibilidade, possui baixa especificidade, além de depender da qualidade do aparelho e da experiência do examinador. Atualmente, a histeroscopia é a técnica mais precisa para a investigação da cavidade endometrial¹⁵, pois, embora seja uma técnica invasiva, graças à redução do calibre dos histeroscópios, provoca pouco ou nenhum desconforto à paciente, tendo a vantagem de ser um exame ambulatorial e que não requer anestesia. Além disso, as complicações durante o exame, como estimulação vagal ou perfuração uterina, são raras desde que realizado por um profissional habilitado.

A terapia hormonal no climatério tem sido responsabilizada pela proliferação endometrial e, conseqüentemente, por neoplasias do endométrio. Nagele et al.²² observaram que as pacientes em TRH apresentaram maior índice de alterações endometriais devido ao estímulo hormonal no endométrio. No entanto, Perrone et al.² observaram que as alterações endometriais foram mais frequentes nas pacientes que não utilizavam TRH, colocando em dúvida se a utilização de hormônios na pós-menopausa é, por si só, capaz de causar doenças benignas intrauterinas, como os pólipos e os miomas, ou se a TRH produz sangramento uterino anormal.

No presente estudo, os achados histeroscópicos e anátomo-patológicos não apresentaram diferença significativa nos Grupos I e II tanto para os achados malignos quanto para os benignos. O endométrio atrófico foi encontrado em 28,7% das pacientes do Grupo I e em 29,5% do Grupo II; como possíveis causas do sangramento anormal, é possível citar congestão vascular passiva, causada por algum grau de prolapso uterino, endometrite crônica ou degeneração esclerótica dos vasos do endométrio²².

Após a menopausa, o surgimento de pólipos endometriais não está associado a altos níveis de estrógenos, pois o endométrio adjacente é atrófico. Os receptores de estrógenos e progesterona estão presentes em quantidade maior no epitélio glandular dos pólipos do que no endométrio adjacente, o que não ocorre da mesma maneira em seu estroma, no qual existe menor quantidade de receptores da progesterona, sugerindo que esses receptores representam um importante papel na fisiopatologia dos pólipos endometriais na pós-menopausa²³.

Além da hiperplasia simples, que é em essência parte do epitélio glandular de muitos pólipos endometriais, eles raramente

sofrem transformação maligna. Em vários estudos com a participação de mulheres com sangramento uterino anormal, a frequência de malignidade associada a pólipos variou de 0,59 a 3,2%²⁴⁻²⁶. Em trabalho recente, com avaliação histológica de 358 pólipos retirados por meio de histeroscopia cirúrgica, a incidência de lesões malignas foi de 0,8% e a de pré-malignas (hiperplasia com atipias) 3,1%²⁷. Pacientes com pólipos endometriais cujo principal sintoma é o sangramento uterino anormal (menorragia, sangramento prolongado ou intermenstrual), quando submetidas à polipectomia histeroscópica, têm melhora dos sintomas em torno de 70% dos casos, com taxa de malignidade praticamente nula²⁸.

A histeroscopia é considerada padrão-ouro para investigação da cavidade endometrial em mulheres com SUA, pois permite investigar adequadamente a cavidade endometrial, bem como realizar tantas biópsias quanto necessário para elucidar o diagnóstico sem que isso altere o risco de complicações. Segundo Saccucci et al.²⁹, a possibilidade de efetuar diagnóstico de lesões pré-malignas e malignas em fases iniciais dá a histeroscopia associada à biópsia importância fundamental para melhorar o prognóstico da doença, mesmo naquelas pacientes cujos resultados anátomo-patológicos foram insuficientes para o diagnóstico. A histeroscopia associada à biópsia pode, ainda, ser considerada o melhor método de investigação da cavidade endometrial principalmente se comparada à dilatação e curetagem do útero²².

O sangramento uterino após a menopausa, apesar de ser um fato comum ocasionado por alterações benignas do trato genital (vaginite atrófica, endométrio atrófico, pólipos endometriais e hiperplasia endometrial), exige a avaliação do endométrio, pois a preocupação primária nessa faixa etária é afastar a possibilidade de câncer do endométrio. A estrogênio terapia no climatério tem indicações de acordo com a sintomatologia. Todavia, há controvérsias quanto à indicação, uma vez que estudos demonstraram risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de mama e endométrio.

No presente estudo não existiram diferenças entre os diagnósticos histeroscópico e anátomo-patológicos nos grupos com e sem TRH, sugerindo que a terapia de reposição hormonal parece não estar associada a alterações endometriais ou ao sangramento uterino na menopausa.

Referências bibliográficas

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2003. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2. Acesso em 10 set. 2008.
2. Wolff LPG, Martins MR, Bedone AJ, Monteiro IMU. Endometrial evaluation in menopausal women after six months of isoflavones. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2006;52(6):419-23.
3. Perrone G, DeAngelis C, Critelli C, Capri O, Galoppi P, Santoro G, et al. Hysteroscopic findings in postmenopausal abnormal uterine bleeding: a comparison between HRT users and non-users. *Maturitas*. 2002;43(4):251-5.
4. Bradley LD, Falcone T, Magen AB. Radiographic techniques for the diagnosis of abnormal uterine bleeding. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2000;27(2):245-76.

5. Laifer-Narin SL, Ragavendra N, Lu DS, Sayre J, Perrella R, Grant EG. Transvaginal saline hysterosonography: characteristics distinguishing malignant and various benign conditions. *AJR Am J Roentgenol.* 1999;172(6):1513-20.
6. Goldstein SR, Nachtigall M, Snyder JR, Nachtigall L. Endometrial assessment by vaginal ultrasonography before endometrial sampling in patients with postmenopausal bleeding. *Am J Obstet Gynecol.* 1990;163(1 Pt 1):119-23.
7. Granberg S, Wikland M, Karlsson B, Norstrom A, Friberg LG. Endometrial thickness as measured by endovaginal ultrasonography for identifying endometrial abnormality. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;164(1 Pt 1):47-52.
8. Karlsson B, Granberg S, Wikland M, Ylöstalo P, Torvid K, Marsal K, et al. Transvaginal ultrasonography of the endometrium in women with postmenopausal bleeding: a Nordic multi-center study. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;172(5):1488-94.
9. Levine D, Gosink BB, Johnson LA. Change in endometrial thickness in postmenopausal women undergoing hormone replacement therapy. *Radiology.* 1995;197(3):603-8.
10. Lin MC, Gosink BB, Wolf SI, Feldesman MR, Stuenkel CA, Braly PS, et al. Endometrial thickness after menopause: effect of hormone replacement. *Radiology.* 1991;180(2):427-32.
11. Nasri MN, Shepard JH, Setchell ME, Lowe DG, Chard T. The role of vaginal scan in measurement of endometrial thickness in postmenopausal women. *Br J Obstet Gynaecol.* 1991;98(5):470-5.
12. Lewis BV. Hysteroscopy for the investigation of abnormal uterine bleeding. *Br J Obstet Gynaecol.* 1990;97(4):283-4.
13. Loffer FD. Hysteroscopy with selective endometrial sampling compared with D&C for abnormal bleeding: the value of negative hysteroscopic view. *Obstet Gynecol.* 1989;73(1):16-20.
14. Bedner R, Rzepka-Górska I. Hysteroscopy with directed biopsy versus dilatation and curettage for the diagnosis of endometrial hyperplasia and cancer in perimenopausal women. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2007;28(5):400-2.
15. Ribeiro CT, Rosa e Silva JC, Silva de Sá MF, Rosa e Silva ACJS, Poli OBN, Reis FJC, et al. Hysteroscopy as a standard procedure for assessing endometrial lesions among postmenopausal women. *Sao Paulo Med J.* 2007;125(6):338-42.
16. Fambrini M, Buccoliero AM, Bargelli G, Cioni R, Piciocchi L, Pieralli A, et al. Clinical utility of liquid-based cytology for the characterization and management of endometrial polyps in postmenopausal age. *Int J Gynecol Câncer.* 2008;18(2):306-11.
17. Tahir MM, Bigrigg MA, Browning JJ, Brookes ST, Smith PA. A randomized controlled trial comparing transvaginal ultrasound, outpatient hysteroscopy and endometrial biopsy with inpatient hysteroscopy and curettage. *Br J Obstet Gynaecol.* 1999;106(12):1259-64.
18. Gimpelson RJ. Panoramic hysteroscopy with directed biopsies v/s dilatation and curettage for accurate diagnosis. *J Reprod Med.* 1984;29(8):575-8.
19. Gimpelson RJ, Rappold HO. A comparative study between panoramic hysteroscopy with directed biopsies and dilation and curettage. *Am J Obstet Gynaecol.* 1988;158(3 Pt 1):489-92.
20. Timmermans A, van Doorn LC, Opmeer BC, Kroeks MV, Duk MJ, Bouwmeester AM, et al. Dutch Study in Postmenopausal Bleeding (DUPOMEB). Follow-up of women after a first episode of postmenopausal bleeding and endometrial thickness greater than 4 millimeters. *Obstet Gynaecol.* 2008;111(1):137-43.
21. Fuentes AJ, Martínez MG, Mata MP. Hysteroscopy findings in patients with postmenopausal genital bleeding. *Ginecol Obstet Mex.* 2007;75(5):253-8.
22. Nagele F, O'Connor H, Baskett TF, Davies A, Mohammed H, Magos AL. Hysteroscopy in women with abnormal uterine bleeding on hormone replacement therapy: a comparison with postmenopausal bleeding. *Fertility and Sterility.* 1996;65(6):1145-50.
23. Sant'Ana de Almeida EC, Nogueira AA, Candido dos Reis FJ, Zambelli Ramalho LN, Zucoloto S. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors in endometrial polyps and adjacent endometrium in postmenopausal women. *Maturitas.* 2004;49(3):229-33.
24. Bakour SH, Khan KS, Gupta JK. The risk of premalignant pathology in endometrial polyps. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2000;79(4):317-20.
25. Reis PDS, Nogueira AA, Reis FJC, Campolungo A, Carrara HHA, Andrade JM. Is hysteroscopic appearance a safe means of differentiating malignant from benign endometrial polyps in postmenopausal women? *Gynaecol Endosc.* 2001;10(1):49-51.
26. Martin-Ondarza C, Gil-Moreno A, Torres-Cuesta L, Garcia A, Eyzaguirre F, Diaz-Feijoo B, et al. Endometrial cancer in polyps: a clinical study of 27 cases. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2005;26(1):55-8.
27. 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.
28. Nagele F, Mane S, Chandrasekaran P, Rubinger T, Magos A. How successful is hysteroscopic polypectomy? *Gynaecol Endosc.* 1996;5(2):137-40.
29. Saccucci P, Rigon G, Provenza C, Mastrone M, Are P, Pisani G, Bartolelli C. Hysteroscopic features in postmenopausal uterine bleeding. *Minerva Ginecol.* 1996;48(10):401-4.

Recebido em: 04/11/2008

Aprovado para publicação: 18/02/2009

Inseminação intrauterina: uma alternativa realista em reprodução assistida

Intrauterine insemination: a realistic alternative in assisted reproduction

Alessandro Schuffner¹, Rodrigo Sell Poletto², Thiago Placido²



Alessandro Schuffner é médico especializado em Ginecologia e Obstetrícia. Fez pós-graduação no Jones Institute for Reproductive Medicine, Norfolk, entre 1999 e 2003, e no Reproductive Medicine Associates, Morristown, em 2005. É Mestre em Medicina Interna pela Universidade Federal do Paraná. É revisor das revistas "Fertility and Sterility" e New England Journal of Medicine". É Diretor Clínico da Conceber- Centro de Medicina Reprodutiva, em Curitiba.

Resumo

Objetivo: o propósito deste estudo é determinar se a probabilidade de gravidez aumenta com a utilização da inseminação intrauterina associada à hiperestimulação ovariana controlada. **Material e Métodos:** este estudo prospectivo incluiu 51 mulheres submetidas a 64 ciclos de inseminação intraovariana. Três protocolos de estimulação ovariana foram utilizados: citrato de clomifeno mais gonadotrofina menopausal humana, gonadotrofina menopausal humana ou hormônio recombinante folículo estimulante isolados. As pacientes foram monitoradas por meio de ultrassonografia transvaginal e determinações séricas dos níveis de hormônio luteinizante e hormônio folículo estimulante. Foram, ainda, separadas por idade em dois grupos: Grupo 1 (≤ 35 anos) e Grupo 2 (> 35 anos). **Resultados:** observou-se uma taxa de 18,7% de gravidez por ciclo e de 23,5% de gravidez por paciente. As taxas de gravidez foram três vezes maiores no Grupo 1 em comparação ao Grupo 2 (24,3 e 8,7%, respectivamente). Não foram observadas diferenças em relação aos parâmetros de hormônio folículo estimulante, espessura do endométrio, número de folículos > 16 mm, concentração espermática, total de espermatozoides móveis e taxa de gravidez nos diferentes protocolos de estimulação ovariana. **Conclusões:** os achados do presente estudo dão suporte à utilização da inseminação intrauterina no tratamento para casais inférteis.

Unitermos: Infertilidade; Inseminação; Estimulação ovariana.

Abstract

Objective: the purpose of this study was to determine whether pregnancy outcomes are improved by intrauterine insemination combined with controlled ovarian hyperstimulation. **Material and methods:** this prospective study included 51 women who underwent 64 cycles of intrauterine insemination. Three ovarian stimulation protocols were applied: clomiphene citrate plus human menopausal gonadotropin, human menopausal gonadotropin or recombinant follicle stimulating hormone. Patients were monitored by transvaginal ultrasonography and serum luteinising hormone and follicle stimulating hormone levels. The patients were divided by age into two groups: Group 1 (≤ 35 years) and Group 2 (> 35 years). **Results:** we observed 18.7% of pregnancy per cycle and 23.5% of pregnancy per woman. Pregnancy rates were three times higher in Group 1 in comparison to Grupo 2 (24.3 and 8.7%, respectively). No differences were observed among the protocols in terms of follicle stimulating hormone parameters, endometrial size, number of ovarian follicles > 16 mm, sperm concentration, number of motile spermatozoa and pregnancy rates. **Conclusions:** The findings of this study support the use of intrauterine insemination as treatment for infertile couples.

Uniterms: Infertility; Insemination; Ovarian induction.

¹ Ginecologista e infertilista do Centro de Medicina Reprodutiva Conceber – Curitiba (PA), Brasil.

² Embriologista do Centro de Medicina Reprodutiva Conceber – Curitiba (PA), Brasil.

Endereço para correspondência: Alessandro Schuffner – Avenida República Argentina, 210, 17º andar – CEP 80240-210 – Curitiba/PR – E-mail: alessandro@clinicaconceber.com.br

Introdução

A infertilidade sem causa aparente é um diagnóstico comum em 30% dos casais inférteis e é estabelecido quando as investigações clínicas (análise seminal, análise tubária e verificação da ovulação) não detectam anormalidades¹. O prognóstico é pior quando a duração da infertilidade excede três anos ou quando a idade da mulher é superior a 35 anos². Quando não se obtém sucesso com o tratamento convencional desses casais, a escolha seguinte recai em tecnologias mais sofisticadas em reprodução assistida, como a inseminação intrauterina³.

A inseminação intrauterina (IUI) é frequentemente usada na abordagem de casais inférteis não só para o tratamento da infertilidade sem causa aparente, mas também para várias outras causas de infertilidade, incluindo fator cervical, disfunção ovulatória, endometriose, causas imunológicas e fator masculino⁴. Além disso, é também usada como tratamento para problemas ejaculatórios e coitais⁵.

Isoladamente, a IUI pode elevar potencialmente a taxa de gravidez por auxiliar o espermatozoide a ultrapassar a barreira cervical. Os dados da literatura mostram, entretanto, que a taxa de gravidez é maior quando a IUI está associada a protocolos de estimulação ovariana^{1,6,7}. Tais protocolos incluem antiestrogênicos (como o citrato de clomifeno) e gonadotrofinas com e sem GnRH agonistas/antagonistas, o que resulta em um número maior de óvulos que podem ser fecundados e consequente elevação nas taxas de gravidez^{1,6}.

Embora o citrato de clomifeno seja barato e requeira pouco monitoramento clínico, há relatos de que a droga aumenta em 10% o risco de gravidez múltipla⁸ além de ter sido descrito um risco potencial para o câncer ovariano^{3,9}. As gonadotrofinas podem causar hiperestimulação ovariana e gravidez múltipla. Assim, a utilização de estimulação ovariana deve levar em conta os riscos e benefícios pretendidos^{10,11}.

Pelo fato de ser uma técnica mais simples, de menor custo e menos invasiva que outras técnicas de reprodução assistida, a IUI é considerada uma etapa intermediária, de baixa para moderada, complexidade antes da aplicação de tecnologias mais sofisticadas em reprodução assistida, como a fertilização *in vitro* (FIV) com ou sem a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)^{3,12}.

A taxa de sucesso da IUI permanece controversa e depende de vários fatores; no entanto, de 10 a 20% de gravidez clínica por ciclo é uma margem aceitável para todas as etiologias¹³. Combinada à estimulação ovariana no tratamento da infertilidade sem causa aparente, a IUI pode ter taxa cumulativa de gravidez aproximada à obtida pela FIV^{14,15}, que varia entre 13 e 28% por ciclo¹⁶ com um custo quatro vezes menor³.

A proposta deste artigo é avaliar a eficácia da inseminação intrauterina com estimulação ovariana na produção de gravidez em casais inférteis.

Material e métodos

Estudo retrospectivo, comparativo, realizado entre julho de 2007 e abril de 2008, no qual foram analisados sessenta e quatro ciclos de inseminação intrauterina na Conceber – Clínica de Medicina Reprodutiva, em Curitiba, Paraná. Antes do tratamento, cada casal foi submetido a uma investigação de infertilidade que incluía análise seminal básica, avaliação da ovulação, histerossalpingografia e ultrassonografia transvaginal.

As pacientes foram divididas em dois grupos: Grupo 1 (≤ 35 anos) e Grupo 2 (> 35 anos).

Três protocolos de estimulação foram utilizados: citrato de clomifeno (Clomid, Medley) + hMG (Merional, Meizler), hMG ou rFSH (Gonal, Serono) isolado. A monitoração ovariana foi conduzida por meio de ultrassonografia transvaginal e determinações séricas de estradiol e LH. Em todas as pacientes, uma resposta aceitável seria pelo menos um folículo ≥ 16 mm (diâmetro médio).

As pacientes eram inseminadas entre 34 e 40 horas após a administração do hCG (Choriomon 5000UI, Meizler) com 0,5 mL de sêmen preparado, depositado no fundo uterino por meio de um cateter de CCD (12040 AM) acoplado a uma seringa de 1 mL.

O suporte da fase lútea foi realizado com progesterona vaginal 300 mg/dia (Utrogestan, Farmoquímica), com administração iniciada três dias após a inseminação. A gravidez foi diagnosticada com β -hCG e confirmada pela presença de saco gestacional tópico com embrião apresentado batimento cardíaco em ultrassonografia, realizada 28 dias após a inseminação.

Preparo seminal

A coleta seminal foi realizada por masturbação em frasco estéril. Depois foi liquefeita em até uma hora após a coleta e, então, avaliada e preparada para a inseminação. A qualidade seminal foi avaliada a fresco e pós-preparo.

O preparo do sêmen foi feito realizando lavado ou gradiente descontínuo de densidade (Isolate, Irvine). Para as amostras com presença superior a 1×10^6 /mL de células redondas, realizava-se gradiente de densidade.

Para as amostras com valores inferiores a 1×10^6 /mL de células redondas, a técnica de *sperm wash* foi aplicada em quantidades iguais de meio de cultura tamponado e sêmen em um tubo cônico para centrifugação de 15 mL (Corning). Esse material foi centrifugado a 1600 rpm durante dez minutos.

Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante com uma pipeta *pasteur* e o sedimento, ressuspensionado com 0,5 mL de meio tamponado (G-Mops Plus, Vitrolife).

Já as amostras com presença superior a 1×10^6 /mL de células redondas foram submetidas ao gradiente de densidade (Isolate, Irvine), feito em tubo cônico para centrifuga de 15 mL (Corning). As camadas de Isolate eram relativas ao volume de amostra e sua concentração, feitas lentamente para que não se misturassem e, preservando uma interface estável entre as duas camadas, iniciava-se pelo *Lower Layer*, depois o *Upper Layer* e, por último, o sêmen.

A primeira centrifugação foi realizada com 20 minutos a 1600 rpm, retirando-se o sobrenadante, ressuspensionando o sedimento com 1 mL de meio de cultura tamponado e aplicando-se a técnica de *sperm wash* descrita anteriormente.

Análise estatística

Foram utilizados os testes não-paramétrico, não-pareado, bicaudal (Teste de Mann-Whitney) ou χ^2 quando apropriado, com o auxílio do software GraphPad InStat, versão 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA) para que se comparassem as variáveis estudadas. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Foi estabelecido como nível de significância estatística $p < 0,05$.

Resultados

Cinquenta e uma pacientes foram submetidas a 64 ciclos de IUI. A taxa global de gravidez por ciclo foi 18,7 e 23,5% por paciente. A distribuição dos protocolos de estimulação ovariana foram os seguintes: citrato de clomifeno (CC) + gonadotrofina menopausal humana (hMG), utilizado em 17 ciclos; hMG isolada em 22 ciclos; e hormônio recombinante foliculo estimulante (rFSH), utilizado isoladamente em 25 ciclos.

As pacientes do estudo foram divididas por faixa etária em dois grupos: Grupo 1 (≤ 35 anos) e Grupo 2 (> 35 anos). Verificou-se que a taxa de gravidez foi quase três vezes maior no Grupo 1 em comparação ao Grupo 2 (24,3 e 8,7%, respectivamente), como pode ser observado na Tabela 1.

A Tabela 2 compara os achados em relação aos ciclos com ou sem obtenção de gravidez, onde não foram observadas diferenças em relação aos parâmetros de FSH, espessura do endométrio, número de folículos > 16 mm, concentração espermática, total de espermatozoides móveis e taxa de gravidez nos diferentes protocolos de estimulação ovariana utilizados.

Discussão

A inseminação intrauterina cria atalhos em algumas barreiras do trato genital feminino para o transporte espermático, com o

intuito de colocar maior quantidade de espermatozoides próximos ao local da fertilização, o que poderia aumentar a chance de gravidez.

Na IUI, o sêmen é preparado para inseminação com a retirada de alguns componentes seminais indesejados, o que, embora seja desconfortável e cause dor à paciente, pode recuperar o máximo possível de espermatozoides com boa qualidade existente. Outro benefício adicional seria que a preparação dos espermatozoides para a IUI inicia a capacitação espermática, como indicado pela hiperativação observada após essa preparação¹⁷.

Embora a IUI seja um tratamento menos invasivo e de menor custo, sua eficácia permanece controversa. Alguns autores a consideram uma modalidade de tratamento muito útil e com boa relação custo-efetividade para algumas etiologias de infertilidade^{3,5}, enquanto outros consideram que os resultados obtidos não diferem daqueles alcançados sem tratamento^{14,18,10}.

Alguns estudos associam uma maior eficácia da IUI quando associada a protocolos de hiperestimulação ovariana^{1,6,19}, embora em casais com etiologia de infertilidade ligada ao fator masculino, a taxa de gravidez por ciclo permaneça baixa e aparentemente não afetada pela utilização da estimulação ovariana²⁰. Entretanto, uma revisão recente atestou que grande parte dos estudos não encontrou diferenças em relação à obtenção de gravidez com a utilização da IUI ou IUI associada a protocolos de estimulação⁴.

Tabela 1 – Distribuição por faixa etária dos resultados obtidos em pacientes submetidas à inseminação intrauterina com a utilização de diferentes protocolos de estimulação ovariana

Resultados	≤ 35 anos (n=41)	> 35 anos (n=23)	P
Idade	31,5 \pm 0,3	40,2 \pm 0,7	<0,05
FSH (mUI/mL)	6,7 \pm 0,8	9,5 \pm 1,7	NS
Endométrio (mm)	8,5 \pm 0,3	8,1 \pm 0,3	NS
Folículos > 16 mm	1,8 \pm 0,1	2,0 \pm 0,2	NS
Concentração espermática ($\times 10^6$ /mL)	41,4 \pm 4,4	34,5 \pm 5,6	NS
Total de espermatozoides móveis ($\times 10^6$)	15,8 \pm 1,6	12,2 \pm 2,0	NS
Taxa de gravidez (%)	24,3	8,7	NS

NS: não significativo

Tabela 2 – Resultados quanto à obtenção da gravidez nas pacientes submetidas à inseminação intrauterina com diferentes protocolos em relação aos diversos parâmetros estudados

Resultados	Grávida (n=12)	Não grávida (n=52)	P
Idade	34,1 \pm 1,0	34,8 \pm 0,7	NS
FSH (mUI/mL)	5,7 \pm 0,9	9,0 \pm 1,2	NS
Endométrio (mm)	8,6 \pm 0,3	8,3 \pm 0,2	NS
Folículos > 16 mm	1,9 \pm 0,3	1,9 \pm 0,1	NS
Concentração espermática ($\times 10^6$ /mL)	40,0 \pm 10,0	38,7 \pm 3,7	NS
Total de espermatozoides móveis ($\times 10^6$)	15,1 \pm 3,5	14,4 \pm 1,4	NS

NS: não significativo

Alguns autores apontam, ainda, que a utilização da IUI associada a protocolos de estimulação ovariana pode aumentar o risco de gravidez múltipla, aborto, gravidez ectópica e câncer ovariano^{4,8,10}. Entretanto, nenhuma dessas intercorrências foi observada neste estudo, além de não terem sido encontradas diferenças na taxa de gravidez em relação aos diferentes protocolos utilizados.

A literatura aponta uma grande diversidade na taxa de obtenção de gravidez com a utilização do método que varia de 5 a 70%^{4,10}. No entanto, uma taxa entre 10 e 20% é considerada aceitável¹³. No presente estudo, essa taxa variou entre 15,8 e 28%, o que está de acordo com a literatura citada.

Na IUI com ou sem hiperestimulação ovariana, o prognóstico de obtenção de gravidez é mais reservado quando a mulher tem idade superior a 35 anos³. Essa informação coincide com os resultados deste estudo que mostrou taxas de gravidez três vezes maiores nas mulheres com menos de 35 anos.

Conclusões

A utilização da IUI com ou sem hiperestimulação ovariana para a obtenção da gravidez, embora de menor custo em relação a outros métodos utilizados na reprodução assistida, permanece controverso. A revisão da literatura mostra que a maioria dos estudos possui amostras pequenas e falham na abordagem dos fatores intervenientes na infertilidade, como a idade da mulher, a duração da infertilidade ou a existência de gravidez prévia.

De modo geral, os resultados obtidos neste estudo indicam que a inseminação intrauterina combinada à hiperestimulação ovariana não deve ser excluída como tratamento para infertilidade. Entretanto, são necessários estudos multicêntricos e com amostras maiores para que se dê suporte definitivo ao método.

Referências bibliográficas

- Bhattacharya S, Harrild K, Mollison J, Wordsworth S, Tay C, Harrold A, et al. Clomifene citrate or unstimulated intrauterine insemination compared with expectant management for unexplained infertility: pragmatic randomised controlled trial. *Br Med J*. 2008;337:a716.
- Collins JA, Burrows EA, Wilan AR. The prognosis for live birth among untreated infertile couples. *Fertil Steril*. 1995;64(1):22-8.
- Collins J. Stimulated intra-uterine insemination is not a natural choice for the treatment of unexplained subfertility. Current best evidence for the advanced treatment of unexplained subfertility. *Hum Reprod*. 2003;18(5):907-12.
- Bensdorp AJ, Cohlen BJ, Heineman MJ, Vandekerckhove P. Intra-uterine insemination for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;(3):CD000360.
- Duran HE, Morshedi, M, Kruger T, Oehninger S. Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. *Hum Reprod Update*. 2002;8(4):373-84.
- Cantineau AEP, Cohlen BJ, Heineman MJ. Ovarian stimulation protocols (anti-oestrogens, gonadotrophins with and without GnRH agonists/antagonists) for intrauterine insemination (IUI) in women with subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;(2):CD005356
- Cantineau AEP, Heineman MJ, Cohlen BJ. Single versus double intrauterine insemination (IUI) in stimulated cycles for subfertile couples. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(1):CD003854.
- Hughes E, Brown J, Collins J, Vandekerckhove P. Clomiphene citrate for unexplained subfertility in women. *Cochrane Database Syst Rev*. 1995;(2): CD000057.
- RCOG – Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. The management of infertility in secondary care: evidence-based guidelines, n. 3. London: RCOG; 1998.
- Steures P, van der Steeg JW, Hompes PG, Bossuyt PM, van der Veen F, Habbema JD, et al. Intra-uterine insemination with controlled ovarian hyperstimulation compared to an expectant management in couples with unexplained subfertility and an intermediate prognosis: a randomised study. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2008;152:1525-31.
- NICE – National Institute for Clinical Excellence. Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems. London: NICE; 2004.
- Oehninger S. Place of intracytoplasmic sperm injection in management of male infertility. *Lancet*. 2001;357(9274):2068-9.
- Ombelet W, Puttemans P, Bosmans E. Intrauterine insemination: a first-step procedure in the algorithm of male subfertility treatment. *Hum Reprod*. 1995;10(Suppl 1):90-102.
- Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JP, Schats R, Rutten FF, Schoemaker J. Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet* 2000;355(9197):13-8.
- Hughes EG. The effectiveness of ovulation induction and intrauterine insemination in the treatment of persistent infertility: a meta-analysis. *Hum Reprod*. 1997;12(9):1865-72.
- Pandian Z, Bhattacharya S, Nikolaou D, Vale L, Templeton A. In vitro fertilisation for unexplained subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002;(2):CD003357.
- Moohan JM, Lindsay KS. Spermatozoa selected by a discontinuous Percoll density gradient exhibit better motion characteristics, more hyperactivation, and longer survival than direct swim-up. *Fertil Steril*. 1995;64(1):160-5.
- Steures P, van der Steeg JW, Hompes PG. Collaborative effort on the clinical evaluation in reproductive medicine. Intrauterine insemination with controlled ovarian hyperstimulation versus

- expectant management for couples with unexplained infertility. *Lancet*. 2006;368(9531):216-21.
19. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Effectiveness and treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril*. 2006;86(5 Suppl):S111-4.
20. Arici A, Byrd W, Bradshaw K, Kutteh WH, Marshburn P, Carr BR. Evaluation of clomiphene citrate and human chorionic gonadotropin treatment: a prospective, randomized, crossover study during intrauterine insemination cycles. *Fertil Steril*. 1994;61(2):314-8.

Recebido em: 08/10/2008
Aprovado para publicação: 18/02/2009

Ação do estrogênio na resistência vascular da artéria central da retina em mulheres na pós-menopausa

Effect of estrogen on vascular resistance of the central retinal artery in postmenopausal women

Alice Fátima Melgaço Faria¹, Marco Aurélio Martins de Souza², Gisele Rotschild³, Selmo Geber⁴



Alice Fátima Melgaço Faria é Professora Adjunta do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Mestre em Ginecologia e Obstetrícia e Doutora em Medicina pela UFMG.

Resumo

Objetivo: este trabalho objetivou analisar a resistência vascular das artérias centrais da retina por meio do índice de pulsatilidade, medido pela dopplerfluxometria, em mulheres saudáveis na pós-menopausa, antes e após estrogenerioterapia. **Material e métodos:** Foi realizado um estudo prospectivo, randomizado, triplo-cego, placebo controlado, que analisou 55 mulheres saudáveis na pós-menopausa. Participaram 51 mulheres menopausadas (FSH>40 UI/L) com idade média de 53,6±4,8 anos. As participantes foram aleatoriamente divididas em dois grupos: Placebo, n=23, e Estrogênio (estrógeno conjugado equino 0,625 mg), n=28. Realizou-se ultrassonografia ocular com Doppler colorido pela técnica usual antes e 30 dias após o início do uso dos medicamentos. Ambos os olhos foram insonados em posição assentada e deitada, com três ondas analisadas para cada parâmetro. Foi utilizado o teste *t* de Student para amostras não-pareadas e pareadas. **Resultados:** Não foi identificada diferença significativa entre os índices obtidos em ambos os olhos, sendo utilizada a média dos valores para os cálculos estatísticos. O índice de pulsatilidade da artéria central da retina diminuiu significativamente no grupo que recebeu estrogênio, sendo detectável ao exame em posição assentada. Em posição deitada, os valores pré- e pós-tratamento foram basicamente os mesmos em ambos os grupos. **Conclusões:** o estrogênio diminui a resistência vascular na artéria central da retina em mulheres na pós-menopausa, provavelmente por ação vasodilatadora.

Unitermos: Estrogênio; Resistência vascular; Artéria retiniana.

Abstract

Objective: the purpose of this study was to analyse the effects of estrogen replacement therapy on the vascular resistance of the central retinal artery by means of Doppler color flow analysis. **Material and methods:** we performed a prospective, randomized, triple-blinded placebo controlled study. A total of 55 healthy post-menopausal women were analysed. Fifty-one post-menopausal women (FSH >40 UI/L), with a mean (±SD) age of 53.6±4.8 years were studied. The participants were randomly divided into two groups: Placebo (n=23) and Estrogen (0,625 mg conjugated estrogen, n=28). Orbital color flow Doppler ultrasonography was performed before and 30 days after the participants had started using the medicines. Both eyes were examined in two different positions: supine and seated. Three waveforms were analyzed and the mean value was considered for each parameter. The pulsatility index of the central retinal arteries were similar in both eyes and, therefore, the mean value was used. The unpaired and paired *t*-Student tests were used for statistical analysis. All the results were significant when *p*<0,05. **Results:** the pulsatility index of the central retinal arteries showed a significant decrease in the Estrogen Group, associated with the seated position. In the supine position the values pre- and post-treatment were basically the same in both groups. **Conclusion:** estrogen therapy reduces vascular resistance of the central retinal artery in post-menopausal women, probably because of a vasodilatory action.

Uniterms: Estrogen; Vascular resistance; Retinal artery.

¹ Professor adjunto do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Belo Horizonte (MG), Brasil.

² Professor adjunto da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes) – Montes Claros (MG), Brasil.

³ Acadêmica de Medicina da Faculdade da Saúde e Ecologia Humana (FASEH) – Vespasiano (MG), Brasil.

⁴ Professor-associado do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Belo Horizonte (MG), Brasil.

Endereço para correspondência: Selmo Geber – Avenida Contorno, 7.747 – CEP 30110120 – Lourdes – Belo Horizonte/MG – E-mail: selmogeber@origem.com.br

Introdução

Dentre os efeitos estrogênicos sistêmicos conhecidos, os vasculares são, provavelmente, os mais continuamente estudados, podendo ser destacada a sua ação no tônus vasomotor e a produção de substâncias vasoativas pelas células vasculares. A presença de receptores para estrogênios nas culturas de células endoteliais demonstra que eles desempenham papel primordial no controle da circulação regional¹. O efeito vasodilatador, uma das consequências do estímulo à atividade da ciclooxigenase e da prostaciclina, estimula o endotélio à produção de fatores de relaxamento, principalmente o óxido nítrico². O óxido nítrico inibe o crescimento das células do músculo liso e a agregação plaquetária, sendo também um importante fator de relaxamento do músculo liso. Além disso, reverte a ação da endotelina I, que representa o principal fator de contração vascular, com ação hipertensiva de longa duração^{3,4}.

Muito já se sabe sobre os efeitos vasculares do estrogênio nos vasos de grande calibre, principalmente pela facilidade de acesso aos mesmos. As artérias uterinas e ovarianas foram as primeiras a ser avaliadas com o objetivo de se estudarem os efeitos hormonais sobre a resistência vascular⁵. O uso de estrogênios exógenos em mulheres climatéricas saudáveis determinara uma redução de 50% no índice de pulsatilidade (IP) nas artérias uterinas segundo estudo realizado por Bourne et al.⁶. A investigação da influência do estrogênio no tônus vascular da artéria carótida interna mostrou um aumento significativo da resistência vascular medida pelo cálculo do IP na presença dos níveis mais baixos de estradiol, sugerindo que o hormônio tem efeito sistêmico no compartimento arterial⁷. A análise do fluxo sanguíneo aórtico após terapia de reposição hormonal (TRH) demonstrou que os estrogênios levaram a um aumento do volume de ejeção e da velocidade do fluxo, sendo que esta última provavelmente refletiu um efeito inotrópico positivo do estrógeno e vasodilatação⁸. Um aumento significativo da resistência vascular, medida pelo cálculo do IP na presença dos níveis mais baixos de estradiol quando comparados ao momento de valores de estradiol máximo, foram observados na análise da artéria cerebral média por Shamma et al.⁹. Perregaux et al.¹⁰ desenvolveram um estudo ultrassonográfico no qual compararam mulheres jovens a mulheres na pós-menopausa após compressão da artéria braquial. A resposta vasodilatadora endotélio-dependente da artéria braquial foi muito mais evidente no grupo que provavelmente apresentava níveis mais elevados de estrogênio (mulheres jovens e pós-menopausadas em TRH).

O foco dos estudos tem sido, nos últimos tempos, a microvascularização, objetivando-se a busca de maior conhecimento específico. A resistência vascular cerebral é alvo importante para a prevenção de eventos inesperados, como o acidente vascular encefálico (AVE) e déficit da função cognitiva. Segundo Krejza et

al.¹¹, após avaliação que correlacionou IP da carótida interna e concentração de estradiol, foi possível verificar que a resistência vascular cerebral em mulheres jovens é modulada pelas concentrações de 17β estradiol durante o ciclo menstrual. Ao investigar os efeitos das variações fisiológicas induzidas pelo estradiol sérico na hemodinâmica cerebral, Diomedi et al.¹² avaliaram a reatividade cérebro-vascular em estado de hipercapnia induzida por meio da ultrassonografia com Doppler da artéria cerebral média direita de mulheres jovens durante o período menstrual e ovulatório. A vasoatividade arterial foi significativamente mais elevada em mulheres no período ovulatório do que no período menstrual, o que sugere uma interferência do estrogênio na capacidade de adaptação do sistema cérebro-vascular.

O desenvolvimento da dopplerfluxometria colorida transcraniana e, mais recentemente, da orbital, tem permitido estudos *in vivo* da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral. Exames da artéria oftálmica, artéria e veia central da retina podem trazer informações valiosas sobre o comportamento dos vasos cerebrais, por serem anatômico-funcionalmente semelhantes aos últimos. Belfort et al.¹³ compararam a resistência vascular na artéria retiniana central e nas artérias oftálmicas de mulheres saudáveis grávidas, não-grávidas e climatéricas, mostrando, no grupo das climatéricas, uma significativa redução do índice de resistência da artéria central da retina após estrogênio-terapia.

Exames dopplerfluxométricos em pequenas e grandes artérias retrobulbares de mulheres climatéricas com e sem estrogênio-terapia e de mulheres jovens mostraram uma diminuição nos índices de resistência vascular da artéria oftálmica no grupo das mulheres em terapia estrogênica e nas jovens. Com isso, contou-se que o estrogênio na pós-menopausa parece reduzir a resistência vascular em áreas distais à artéria oftálmica, equiparando-a àquela encontrada no menacme¹⁴. Viana et al.¹⁵ avaliaram o efeito das diferentes fases do ciclo menstrual sobre a resistência vascular da artéria central da retina, medida por meio da dopplerfluxometria. Os autores concluíram que a resistência vascular da artéria central da retina varia de acordo com as diferentes fases do ciclo menstrual, sendo inferior nas fases de elevados índices estrogênicos. Isso sugere que o estradiol teria efeitos benéficos sobre a hemodinâmica ocular, refletindo automaticamente na hemodinâmica cerebral.

Este estudo teve o objetivo de avaliar o efeito dos estrogênios conjugados equinos na resistência vascular da artéria central da retina em mulheres na pós-menopausa por meio de ultrassom transorbital com dopplerfluxometria.

Material e métodos

Foi realizado um estudo longitudinal, prospectivo, triplocego, randomizado e placebo controlado, que contou com a

participação de 55 mulheres no climatério após lerem e assinarem o consentimento pós-informado de pesquisa em seres humanos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Foram incluídas no estudo mulheres saudáveis com idade inferior a 65 anos, em menopausa há 12 meses e FSH > 40 UI/L, não-usuárias de TRH nos últimos seis meses, sem uso prévio de medicamento com potencial efeito vascular e com índice de massa corpórea (IMC) menor ou igual a 28. Foram excluídas do estudo as mulheres com histórico de hipertensão arterial sistêmica (HAS), em tratamento de *diabetes mellitus*, histórico de neoplasia maligna, histórico de coronariopatia, insuficiência hepática ou renal, doenças oftalmológicas graves, histórico de tromboflebite ou distúrbio tromboembólico e de doenças vasculares.

Todas as participantes selecionadas foram submetidas a exame clínico e ginecológico e a avaliação propedêutica complementar de acordo com a rotina do serviço de climatério do Hospital das Clínicas da UFMG. As mulheres foram divididas em dois grupos de forma aleatória e a randomização foi feita com envelope lacrado. As integrantes do Grupo de Estudo utilizaram o estrogênio equino conjugado (Premarin®, Fontoura Wyeth) na dose de 0,625 mg/dia durante 30 dias; as integrantes do Grupo Controle usaram placebo durante o mesmo período.

Após a avaliação clínica, as participantes eram encaminhadas para o primeiro exame de determinação do índice de pulsatilidade (IP) das artérias centrais da retina por meio do estudo dopplerfluxométrico (exame pré-tratamento). Nesse dia, iniciava-se o uso da medicação por um período de 30 dias; de um a três dias antes do uso do último comprimido, as participantes eram submetidas a uma nova avaliação dopplerfluxométrica para determinação do IP das artérias centrais da retina (exame pós-tratamento).

Estudo dopplerfluxométrico

Todos os exames foram realizados no mesmo horário, isto é, 8 e 10 horas da manhã, para evitar que os efeitos do ritmo circadiano pudessem interferir como viés no resultado. Os exames foram realizados com a participante na posição assentada e na posição deitada, nessa ordem, de forma a evitar que os possíveis efeitos posturais pudessem interferir nos resultados. Foram insuados os dois globos oculares para avaliação de ambas as artérias centrais da retina. O ambiente era mantido na penumbra, com temperatura constante em torno de 20 °C.

Para a realização do exame de dopplerfluxometria ocular, inicialmente, as pacientes ficavam assentadas confortavelmente, com os olhos fechados. Aplicava-se uma fina camada de gel hidrossolúvel sobre a pálpebra superior, onde a sonda era posicionada. Após a identificação da artéria central da retina, calcularam-se os valores do IP, das velocidades mínimas, máximas

e médias de cada onda, sendo cada medida obtida três vezes em cada artéria. Em seguida, as pacientes foram colocadas em decúbito dorsal e, após cinco minutos de repouso, todos esses passos foram repetidos.

Análise estatística

A comparação entre os IP obtidos nos dois grupos foi feita por meio do teste *t* de Student para amostras independentes. As comparações entre os IP obtidos nos períodos pré- e pós-tratamento e lado direito e esquerdo de um mesmo grupo foram feitas pelo teste *t* de Student para amostras pareadas.

Todos os resultados foram considerados significativos num nível de significância de 5% ($p < 0,05$), apresentando, portanto, pelo menos 95% de confiabilidade.

Resultados

O estudo foi composto por uma amostra de 55 mulheres que participaram voluntariamente, sendo que quatro foram retiradas. Duas apresentaram sintomas adversos durante o uso do medicamento (ambas do Grupo Placebo): uma queixou-se de cefaleia e a outra de mal-estar inespecífico. As outras duas foram retiradas por não terem comparecido ao segundo exame no tempo recomendado. Assim, foram avaliados os resultados de 51 participantes alocadas aleatoriamente em ambos os grupos, sendo 28 (54,9%) no Grupo de Estudo (estrogênio) e 23 (45,1%) no Grupo Controle (placebo). A idade média das componentes do Grupo de Estudo foi de $52,9 \pm 2,5$ (variação de 48 a 59 anos) e do Grupo Controle de $53,6 \pm 4,8$ (variação de 46 a 64 anos), sem diferença significativa ($p = 0,563$).

Quando se compararam os resultados dos IP das artérias direita e esquerda de todas as participantes, em ambas as posições do estudo e antes do uso do medicamento, não foram identificadas diferenças entre os resultados obtidos. Assim, as análises foram feitas considerando-se a média obtida dos IP de ambos os olhos (Tabela 1).

A análise dos índices obtidos nas distintas posições (assentada e deitada) em todas as participantes, no período pré-tratamento

Tabela 1 – Comparação entre as medidas do IP da artéria central da retina de ambos os olhos no período pré-tratamento dos Grupos Estrogênio e Placebo, nas posições assentada e deitada

Grupo	Olho direito	Olho esquerdo	p*
Estrogênio – assentada	1,74±0,32	1,72±0,41	0,866
Estrogênio – deitada	1,47±0,35	1,49±0,28	0,743
Placebo – assentada	1,70±0,54	1,77±0,52	0,557
Placebo – deitada	1,46±0,32	1,69±0,69	0,104

*o valor de p refere-se ao teste *t* de Student para amostras pareadas; valores são média±desvio padrão

apresentou IP médio de $1,723 \pm 0,34$ (variação de 0,96 a 2,77) na posição assentada e $1,169 \pm 0,73$ (variação de 1,01 a 2,96) na posição deitada. A comparação dos resultados demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Dessa maneira, as análises foram feitas de maneira separada, levando-se em consideração a posição relativa.

Com o objetivo de avaliar se os grupos iniciaram o estudo de forma homogênea, compararam-se os IP obtidos em ambos os grupos, em ambas as posições examinadas, no período pré-tratamento. Os resultados verificados após o estudo realizado com as participantes em ambas as posições demonstraram índices semelhantes para ambos os grupos (Tabela 2).

A comparação feita entre os IP obtidos no pré- e pós-tratamento, com as participantes na posição assentada no grupo que usou estrogênio (Grupo de Estudo), demonstrou redução significativa ($p < 0,001$) nos resultados. No grupo que usou placebo (Grupo Controle), não foram observadas diferenças entre os IP obtidos no pré- e pós-tratamento, isto é, não houve redução do IP após uso do placebo (Tabela 3).

A mesma comparação realizada com os dados obtidos a partir do exame feito com as participantes na posição deitada não demonstrou alteração significativa em nenhum dos grupos, ou seja, as mulheres que usaram estrogênio ou placebo apresentaram o mesmo IP antes e depois do uso da medicação quando medidos na posição deitada (Tabela 4).

Tabela 2 – Comparação entre as medidas do IP da artéria central da retina, de acordo com o grupo de estudo, no período pré-tratamento nas posições assentada ou deitada

Posição	Estrogênio	Placebo	p*
Assentada	$1,73 \pm 0,29$	$1,74 \pm 0,43$	0,975
Deitada	$1,48 \pm 0,29$	$1,58 \pm 0,44$	0,587

*o valor de p refere-se ao teste t de Student para amostras pareadas; valores são média±desvio padrão

Tabela 3 – Comparação entre as medidas do IP da artéria central da retina dos Grupos Estrogênio e Placebo, no período pré- e pós-tratamento, na posição assentada

Grupo	Pré-tratamento	Pós-tratamento	p*
Estrogênio	$1,73 \pm 0,29$	$1,50 \pm 0,23$	<0,001
Placebo	$1,74 \pm 0,43$	$1,67 \pm 0,25$	0,467

*o valor p refere-se ao teste t de Student para amostras pareadas; valores são média±desvio padrão

Tabela 4 – Comparação entre as medidas do IP da artéria central da retina dos Grupos Estrogênio e Placebo, no período pré- e pós-tratamento, na posição deitada

Grupo	Pré-tratamento	Pós-tratamento	p*
Estrogênio	$1,48 \pm 0,29$	$1,42 \pm 0,20$	0,281
Placebo	$1,58 \pm 0,44$	$1,58 \pm 0,30$	0,927

*o valor p refere-se ao teste t de Student para amostras pareadas; valores são média±desvio padrão

Discussão

Este estudo demonstrou que o uso de estrogênios equinos conjugados determina a diminuição na resistência vascular da artéria central da retina. Ao que parece, esse é o primeiro estudo triplo-cego, randomizado, placebo controlado que utilizou estrogênios equinos conjugados na avaliação da resistência vascular das artérias retinianas centrais de mulheres saudáveis na menopausa por meio do Doppler ocular.

O estudo foi realizado com mulheres climatéricas para afastar o efeito dos esteroides endógenos ovarianos sobre os vasos sanguíneos estudados, limitando os efeitos observados apenas às ações dos hormônios analisados. Utilizaram-se os estrogênios equinos conjugados por serem os compostos estrogênicos mais usados para avaliação dos seus efeitos em mulheres no climatério, conferindo proteção cardíaca e cerebral, porém há poucos dados sobre os efeitos vasculares diretos induzidos por eles^{2,4}. O estrogênio foi utilizado por um período de 30 dias devido à sua rápida ação, apresentando concentrações séricas máximas após cinco horas da ingestão¹⁶.

A exclusão de mulheres com IMC $\geq 28,0$ visou a eliminar fontes endógenas de estrogênio que pudessem interferir nos resultados, uma vez que existe uma nítida e significativa relação entre peso corporal e conversão de androstenediona em estrona¹⁷. Excluíram-se também as mulheres com níveis pressóricos elevados para evitar que as possíveis interferências sobre a vascularização ocular pudessem influir nos resultados obtidos, provavelmente por acréscimo na perfusão do olho durante a sístole naquelas pacientes com pressão sistólica elevada e consequente elevação no pico da velocidade sistólica nas artérias¹⁸. Também foi critério de exclusão o uso prévio de hormônios e medicamentos com efeito vascular, a fim de se evitar interferência dos mesmos sobre a resistência vascular e a presença de doenças oftalmológicas graves, pelo possível comprometimento do exame.

A artéria oftálmica é ramo direto da artéria carótida interna, enquanto a artéria central da retina é um dos ramos da artéria oftálmica. Sabe-se que as artérias oftálmica e central da retina têm similaridades embriológicas, anatômicas e funcionais com as artérias cerebrais intracranianas de pequeno calibre inacessíveis até o momento, aos exames de imagem não invasivos¹⁹. A escolha da artéria central da retina para modelo do estudo baseia-se no fato de ser vaso anatômica e funcionalmente comparável a outras artérias cerebrais de diâmetro similar, sendo, portanto, adequada para a avaliação da resistência vascular cerebral^{20,21}. Ademais, sua acessibilidade ao uso do ultrassom transorbital permite uma análise da microcirculação cerebral de forma não invasiva e, portanto, mais fácil.

O fato de os exames terem sido feitos por dois profissionais diferentes não interferiu nos resultados do estudo, uma vez que

não houve diferença entre os índices obtidos pelos exames realizados por ambos os examinadores em todos os grupos e posições antes do início do tratamento. Esse achado está de acordo com o demonstrado por outros autores, que verificaram que o efeito interobservador tinha influência desprezível quanto à reprodutibilidade do método²². Todos os exames foram realizados no mesmo período do dia com o objetivo de evitar um possível viés causado pela variação do ritmo cardíaco, conforme demonstrado previamente²³.

Os índices mais empregados para proporcionar uma descrição numérica dos sinais do fluxo Doppler são o IP e o IR. Ambos refletem a resistência da parede vascular jusante ao vaso estudado. O IP foi escolhido por representar o reflexo mais acurado das variações da persistência periférica, particularmente quando a variação Doppler, no final da diástole, cai além do filtro de frequência.

Foram identificados IP mais elevados quando as mulheres foram examinadas na posição assentada. Tal achado coincide com o de Viana et al.¹⁵, que observou IP significativamente superior naquela posição em todos os períodos analisados do ciclo menstrual. Essa diferença entre os resultados obtidos em ambas as posições pode ser decorrente do efeito dos vários barorreceptores. Considerando-se a possível variação na pressão arterial sistólica sistêmica em posição deitada e assentada, supõe-se que um possível fator de correção dos níveis pressóricos agindo sobre os vasos do sistema nervoso central para reduzir a resistência vascular e melhorar o fluxo sanguíneo nesse sistema possa ser o causador das diferenças observadas.

Quando comparados os resultados obtidos no pós- e pré-tratamento, observou-se que a resistência vascular da artéria retiniana central apresentou redução significativa somente no grupo das participantes que receberam estrogênio e quando o exame foi realizado na posição assentada. Esse decréscimo ocorreu provavelmente pela ação vasodilatadora do esteroide, uma vez que foi o único agente que interferiu nesse grupo. No grupo que usou placebo não houve mudança.

Efeitos do estrogênio sobre a microvascularização cerebral foram descritos com resultados semelhantes aos observados no presente trabalho. Belfort et al.¹³ identificaram uma significativa redução no índice de resistência da artéria retiniana central após estrogênio. Neste estudo, porém, apenas dez mulheres foram avaliadas, em posição deitada, sem Grupo Controle e utilizando 17 β estradiol. Posteriormente, Battaglia et al.²⁰ analisaram os efeitos da TRH na resistência da artéria oftálmica de mulheres na pós-menopausa e observaram uma redução no IP. O

estudo não apresentou Grupo Controle e as 57 mulheres na pós-menopausa receberam esquema de TRH com estradiol transdérmico contínuo associado ao acetato de medroxiprogesterona. Van Baal et al.²¹ identificaram redução no IP da artéria central da retina de mulheres na menopausa em uso de terapia de reposição hormonal, comparado ao Grupo Controle. O estudo foi realizado de forma randomizada, mas com TRH combinada sequencial em 30 mulheres.

Altintas et al.²⁴ analisaram os efeitos da menopausa e da TRH em 44 mulheres com e sem hormonioterapia. Após dois meses, os autores observaram decréscimo da resistência vascular da artéria central da retina, apesar de terem utilizado progestágenos associados. Viana et al.¹⁵, avaliando a resistência vascular da artéria central da retina durante o ciclo menstrual ovulatório, demonstrou que a resistência vascular nessa artéria varia de acordo com as diferentes fases do ciclo menstrual, sendo inferior nas fases com elevados índices estrogênicos. Esses resultados são semelhantes aos observados no presente estudo, porém sem a utilização de estrogênio exógeno.

Resultados contrários aos observados na presente pesquisa foram descritos por Harris-Yitzhak et al.¹⁴, que não identificaram alterações na resistência vascular da artéria central da retina quando avaliaram 32 mulheres na menopausa, divididas em Grupo Estudo e Grupo Placebo. Os autores, porém, avaliaram o IR, o que pode ter sido o fator de viés do estudo, e constataram, ainda, que na artéria oftálmica ocorreu diminuição da resistência vascular nas mulheres em terapia estrogênica. Atila et al.²⁵, da mesma forma, não verificaram diferenças na resistência vascular das artérias central da retina e oftálmica quando compararam 40 mulheres menopausadas em TRH e sem TRH. Essa diferença pode ser explicada pela associação dos progestágenos aos estrogênios, que poderiam, contrariamente, elevar a resistência vascular.

É interessante notar que os resultados aqui observados para vasos intracranianos de pequeno calibre são semelhantes aos encontrados em artérias de grande calibre: artérias uterinas e ovarianas^{5,6,21,26}; artérias aorta, cerebral média, carótidas, oftálmica, braquial, poplítea^{7-12,20,21,27}. Tal achado demonstra homogeneidade da resposta vascular independentemente do calibre do vaso sanguíneo.

Assim, podemos concluir que a resistência vascular da artéria retiniana central diminui após o uso de estrogênios conjugados equinos e tal efeito é detectável ao exame de Doppler ocular em posição assentada.

Referências bibliográficas

1. Colburn P, Buonassisi V. Estrogen-Binding sites in endothelial cell cultures. *Science*. 1978;201(4358):817-9.
2. Gilligan DM, Badar DM, Panza JA, Quyyumi AA, Cannon RO. Acute vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation*. 1994;90(2):786-91.
3. Vane JR, Ånggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *The New England J Med*. 1990;323(1):27-34.
4. Collins P. Vascular aspects of oestrogen. *Maturitas*. 1996;23(2):217-26.
5. Goswamy RK, Steptoe PC. Doppler ultrasound studies of the uterine artery in spontaneous ovarian cycles. *Hum Reprod*. 1988;3(6):721-6.
6. Bourne T, Hillard TC, Whitehead MI, Crook D, Campbell S. Oestrogens arterial status and postmenopausal women. *Lancet*. 1990;335(8703):1470-1.
7. Gangar KF, Vyas S, Crook D, Meire H, Campbell S. Pulsatility index in internal carotid artery in relation to transdermal oestradiol and time since menopause. *Lancet*. 1991;338(8771):839-42.
8. Pines A, Fisman EZ, Levo Y, Averbuch M, Lidor A, Drory Y. The effects of hormone replacement therapy in normal postmenopausal women: Measurements of doppler-derived parameters of aortic flow. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;164(3):806-12.
9. Shamma FN, Fayad P, Brass L, Sarrel P. Middle cerebral artery blood velocity during controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril*. 1992;57(5):1022-5.
10. Perregaux D, Chaudhuri A, Mohanty P, Bukhari L, Wilson MF, Sung BH, et al. Effect of gender differences and estrogen replacement therapy on vascular reactivity. *Metabolism*. 1999;48(2):227-32.
11. Krejza J, Mariak Z, Nowacka A, Melhem ER, Babikian VL. Influence of 17 beta-estradiol on cerebrovascular impedance during menstrual cycle in women. *J Neurol Sci*. 2004;221(1-2):61-7.
12. Diomedei M, Cupini LM, Rizzato B, Ferrante F, Giacomini P, Silvestrini M. Influence of physiologic oscillation of estrogens on cerebral hemodynamics. *J Neurol Sci*. 2001;185(1):49-53.
13. Belfort MA, Saade GR, Snabes M, Dunn R, Moise Junior KJ, Cruz A. et al. Hormonal status affects the reactivity of the cerebral vasculature. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;172(4 Pt 1):1273-78.
14. Harris-Yitzhak M, Harris A, Ben-Rafael Z, Zarfati D, Garzozzi HJ, Martin BJ. Estrogen-replacement therapy: effects on retrobulbar hemodynamics. *Am J Ophthalmol*. 2000;129(5):623-8.
15. Viana LC, Burman MAC, Sampaio M, Geber S. Variação do fluxo sanguíneo da artéria central da retina durante as diferentes fases do ciclo menstrual ovulatório. *Rev Bras Ginec Obstet*. 2007;29(3):147-52.
16. Luotola H. Blood pressure and hemodynamics in postmenopausal women during estradiol- 17 β substitution. *Ann Clin Res*. 1983;15 Suppl 38:1-121.
17. Judd HL. Hormonal dynamics associated with the menopause. *Clin Obstet Gynecol*. 1976;19(4):75-88.
18. Williamson TH, Lowe GDO, Baxter GM. Influence of age systemic blood pressure smoking and blood viscosity on orbital blood velocities. *Br J Ophthalmol*. 1995;79(1):17-22.
19. Diniz ALD, Moron AF, Santos MC, Sass N. Dopplervelocimetria das artérias oftálmica e central da retina em gestantes normais. *Rev Bras Ginec Obstet*. 2005;27(4):168-73.
20. Battaglia C, Regnani G, Artini PG, Genazzani AR, Primavera MR, Salvatori M. Uterine and cerebral vascularization in postmenopausal women treated with hormone-replacement therapy. *Gynecol Endocrinol*. 1999;13(4):223-9.
21. Van Baal WM, Kenemans P, Stehouwer CD, Peters-Muller ER, Van Vugt JM, Van Der Mooren MJ. Sequentially combined hormone replacement therapy reduces impedance to flow within the uterine and central retinal arteries in healthy postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;181(6):1365-73.
22. Tekay A, Jouppila P. Intraobserver reproducibility of transvaginal doppler measurements in uterine and intraovarian arteries in regularly menstruating women. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1996;7(2):129-34.
23. Zaidi J, Jurkovic D, Campbell S, Okokon E, Tan SL. Circadian variation in uterine artery blood flow indices during the follicular phase of the menstrual cycle. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1995;5:406-10.
24. Altintas A, Caglar Y, Yüksel N, Demirci A, Karabas L. The effects of menopause and hormone replacement therapy on quality and quantity of tear intraocular pressure and ocular blood flow. *Ophthalmologica*. 2004;218:120-9.
25. Atilla A, Arslanpence A, Batioglu F, Eryilmaz T, Aytac S, Ozcan H. Effect of hormone replacement therapy on ocular hemodynamics in postmenopausal women. *Eur J Ophthalmol*. 1980;11:277-80.
26. Pirhonen JP, Vuento MH, Mäkinen JI, Salmi TA. Long-term effects of hormone replacement therapy on the uterus and on uterine circulation. *Am J Obstet Gynecol*. 1993;168:620-3.
27. Jackson S, Vyas S. A double-blind placebo controlled study of postmenopausal oestrogen replacement therapy and carotid artery pulsatility index. *Br J Obstet Gynaecology*. 1998;105:408-12.

Recebido em: 17/11/2008

Aprovado para publicação: 25/02/2009

In vitro embryo development after pre- and/or postnatal exposure of five-month-old Swiss Albino female mice to particulate air pollution

Desenvolvimento embrionário *in vitro* após a exposição pré e/ou pós-natal de fêmeas de camundongo da linhagem Swiss Albino com cinco meses de idade à poluição ambiental particulada

Mariangela Maluf¹, Paulo Marcelo Perin¹, Daniela Aparecida Nicolosi Foltran Januário², Paulo Hilário Nascimento Saldiva³

Trabalho vencedor do Prêmio Campos da Paz no XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Humana, São Paulo, 26 a 29 de Novembro de 2008.



Mariangela Maluf formou-se na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) em 1984 e completou sua residência médica no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da FMUSP três anos depois, em São Paulo. Desde 1988, é diretora clínica do Centro Especializado em Reprodução Humana (CEERH). Seu interesse em pesquisa é focado nos possíveis efeitos de poluentes ambientes sobre a saúde reprodutiva feminina. Com sua pesquisa experimental "Efeitos da exposição crônica à poluição ambiental particulada sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional", obteve o título de doutora em ciências pelo Departamento de Patologia da FMUSP em julho de 2008.

Abstract

Objective: to evaluate the effects of pre- and/or postnatal exposure to particulate air pollution on fertilization, embryo development, and cell lineage segregation in preimplantation blastocysts during late-life reproductive period, using the *in vitro* fertilization (IVF) mouse model. **Materials and methods:** five-month-old mice underwent superovulation and were pre- and/or postnatally exposed to filtered air (FA-FA), filtered-air ambient air (FA-AA), or ambient air (AA-AA) in exposure chambers, 24 hours per day, during six months. **Results:** ovarian response was not affected by the exposure protocol. A multivariate effect for pre- and/or postnatal exposure to ambient air on blastocyst differential staining, but not on IVF and embryo development, was found. Cell counts in inner cell mass (ICM) and ICM/trophectoderm ratios in blastocysts produced in FA-FA protocol were significantly higher than in blastocysts produced in FA-AA and AA-AA protocols. **Conclusions:** our study suggests that the exposure to particulate air pollution of a large urban center does not affect ovarian function but may negatively affect the female reproductive health in the late-life period by disrupting the lineage specification at the blastocyst stage.

Uniterms: Air pollution; Particulate matter; Fertilization *in vitro*; Embryonic development; Blastocyst; Blastocyst inner cell mass; Staining and labeling; Reproduction; Mice.

Resumo

Objetivo: avaliar os efeitos da exposição pré e/ou pós-natal ao ar ambiente no final da vida reprodutiva sobre a fertilização, desenvolvimento embrionário e segregação das linhagens celulares em blastocistos pré-implantacionais, utilizando o modelo de fertilização *in vitro* (FIV) de camundongo. **Material e métodos:** fêmeas de camundongo com idade de cinco meses tiveram a ovulação estimulada e, no período pré e/ou pós-natal, foram expostas ao ar filtrado (AF-AF), ar filtrado-ar ambiente (AF-AA) ou ar ambiente-ar ambiente (AA-AA) em câmaras de exposição, 24 horas por dia durante seis meses. **Resultados:** a resposta ovariana não foi afetada pelo protocolo de exposição. Um efeito multivariável para a exposição pré e/ou pós-natal ao material particulado fino ambiente sobre coloração diferencial dos blastocistos, mas não sobre a FIV e o desenvolvimento embrionário, foi observado. A contagem celular na massa celular interna (MCI) e a razão MCI/trofoectoderma dos blastocistos produzidos no protocolo AF-AF foram significativamente maiores do que aquelas em blastocistos produzidos nos protocolos FA-AA e AA-AA. **Conclusões:** nosso estudo sugere que a exposição à poluição ambiental particulada de um grande centro urbano não altera a função ovariana, mas pode afetar negativamente a saúde reprodutiva feminina no período final do menacme, em razão da alteração da especificação das linhagens celulares do embrião no estágio de blastocisto.

Unitermos: Poluição do ar; Material particulado; Fertilização *in vitro*; Desenvolvimento embrionário; Blastocisto; Massa celular interna do blastocisto; Coloração e rotulagem; Reprodução; Camundongos.

Estudo realizado no Laboratório de Poluição Atmosférica Ambiental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) – São Paulo (SP), Brasil.

¹ MD, Departamento de Patologia da FMUSP; Divisão de Medicina Reprodutiva do Centro Especializado em Reprodução Humana (CEERH) – São Paulo (SP), Brasil.

² BSc, Departamento de Fisiopatologia Experimental da FMUSP – São Paulo (SP), Brasil; Divisão de Medicina Reprodutiva do CEERH – São Paulo (SP), Brasil.

³ MD, Departamento de Patologia da FMUSP – São Paulo (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Mariangela Maluf – Divisão de Medicina Reprodutiva do Centro Especializado em Reprodução Humana (CEERH) – Rua Mato Grosso, 306, 19º andar – CEP 01239-040 – São Paulo/SP – Fone: (11) 3257-2758 – Fax: (11) 3258-0008 – E-mail: mariangela@ceerh.com.br

Introduction

Exposure to environmental contaminants present in the ambient air of many urban areas, such as carbon monoxide (CO), sulfur dioxide (SO₂), nitrogen dioxide (NO₂), benzene, formaldehyde, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), and suspended particulate matter (PM), cannot be easily avoided. These contaminants are known to cause harmful effects on human health, including cardiovascular diseases, immunosuppression, cancer, or loss of fertility¹⁻⁴. However, the influence of air contamination, specifically on female reproduction, is not yet well established, and very few studies on this area have been conducted^{3,5,6}. The difficulty to substantiate a clear correlation between air pollution and fertility impairment could be related to the multitude of factors involved not only on the reproductive competence, including age, hormonal and nutritional status, patency of the reproductive tract, gamete reserve and production, heredity, genetic polymorphism, and behavior, but also on the methodological challenges found in the laboratory to measure and determine this correlation.

The potential effects of chronic exposure to daily variations in air pollution on female fertility during the reproductive lifespan may go unacknowledged for years due to the possible cumulative or synergistic nature of these effects. This may represent a major cause of concern to the female reproductive health, mainly when the ovarian tissue, composed of non-renewing cells like oocytes, is the target, and the early onset of menopause, the only clinical expression of these effects. Although the mechanisms involved in the detrimental reproductive effect of smoking were not the same as those from exposure to air pollution, they may share similar pathways. A large body of research exists suggesting that female smokers undergo premature ovarian failure about three to five years earlier than the general population⁷⁻⁹. This negative effect is more evident in older women approaching the end of their reproductive life, suggesting an accelerated decrease in the size of the oocyte pool in this specific population¹⁰. Furthermore, toxic chemicals found in cigarette smoke may disrupt normal ovarian function, impairing the production of steroid hormones, the process of oocyte-cumulus complex expansion, and oocyte nuclear maturation^{11,12}. The outcome of *in vitro* fertilization (IVF) was compared between smokers and nonsmokers in various studies, revealing either clinical (poorer ovarian response, increased gonadotrophin consumption, lower peak estradiol levels, higher cancellation rate, increased spontaneous miscarriage rate) or laboratory (fewer oocytes retrieved, reduced oocyte maturation, higher risk of fertilization failure, lower implantation rate) poorer results in the former group¹³⁻¹⁸. However, recent studies were unable to show any effect of exposure to cigarette smoking either on *in vitro* embryo development or on IVF outcome^{16,19}.

Previous experiments conducted in our laboratory have provided evidence that chronic exposure to ambient air of a large urban center has a significant impact on female reproductive function affecting pre- and post-implantation embryonic development. Exposure to fine PM (diameter $\leq 2.5 \mu\text{m}$, PM_{2.5}) present in ambient air was implicated in disruption of the first two cell lineages allocation pattern at the blastocyst stage without interfering in the fertilization or early development of mouse embryos²⁰. Defective post-implantation embryonic development resulted in an increase in the number of implantation failures, decreased number of viable fetuses, higher rates of miscarriage, and intrauterine mortality^{3,21}.

Therefore, this study was designed to evaluate the effect of pre- and/or postnatal exposure of female mice to particulate air pollution at the end of their reproductive lifespan on breeding, ovarian response to superovulation, fertilization, embryo development, and cell lineage segregation in preimplantation blastocysts using the IVF mouse model, based on the hypothesis that chronic exposure to air pollution would worsen the detrimental effect that naturally occurs with the aging process on the ovarian reserve and on the gamete and/or embryo quality.

Materials and methods

Animals

Random-bred Swiss Albino mice (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, FMUSP, São Paulo, Brazil) were used for the study. Mice were housed in polycarbonate cages with wood shavings on the floor in a room under controlled environmental conditions of 12-hour light/dark cycles, relative humidity of 50±10% and temperature of 24±1°C for the breeding protocol, and under ambient conditions (temperature, humidity and photoperiod), 24 hours per day, seven days per week, during the entire experiment for pre- and postnatal exposure to filtered air (FA) and/or ambient air (AA) protocols. Cage cleaning and bedding changes were done inside the experimental environment every other day. Animals received a supply of balanced commercial food (Nuvital Nutrients Ltda.; Colombo, Paraná, Brazil) and fresh water *ad libitum*. Protocols used in the present study were approved by the ethics committee of the FMUSP, and followed the Principles of Laboratory Animal Care published by the U.S. National Institutes of Health²².

Exposure setting and inhalation chambers

A detailed description of the exposure system used in this study was published in previous studies from our laboratory^{3,4}. The exposure chambers were set up in the gardens of the

FMUSP, in São Paulo downtown, near heavily trafficked streets. The system's concept is based on the principle of creating PM level gradient by filtering ambient air sampled from the surroundings. The exposure chambers, assembled side-by-side, are cylindrical aluminum structures measuring 2.0 m in diameter and 2.15 m high, covered by plastic ultraviolet (UV) film. The air intake and distribution occur in the base of the cylinder for uniform dispersion throughout the chamber. Ambient air is forced into the chamber by large fans and exits at the top through a wide opening. Both chambers received ambient air at 20 m³/min. making this essentially a normobaric system: pressure inside did not exceed that of the outside by more than 3 cm H₂O. In the FA chamber, three stages of filters in hermetically sealed boxes are lined up immediately after the fans. The first stage filter (model TB; Purafil Inc., São Paulo, São Paulo, Brazil) eliminates large particles and the second (model JFL-90; Purafil Inc., São Paulo, São Paulo, Brazil) and third (HEPA filter; Purafil Inc., São Paulo, São Paulo, Brazil) trap fine particles. Gaseous pollutants were not retained by the filtering system, thus concentrations of NO₂, SO₂ and carbon monoxide (CO) were assumed to be similar in both chambers.

Air pollution monitoring

Inside the exposure chambers the 24-hour concentration of PM_{2.5} was determined gravimetrically²³, by collecting particles from polycarbonate filters using Harvard impactors (Air Diagnostics, Harrison, ME, USA) at a flow rate of 10 LPM every other day and results were expressed as µg/m³. The mean

(±SD) concentrations of PM_{2.5} for FA and AA exposure chambers were 11.32±7.93 µg/m³ and 29.71±13.55 µg/m³ during the prenatal period and 7.58±4.92 µg/m³ and 20.16±9.87 µg/m³ during the postnatal period. Prenatal PM_{2.5} mean concentrations were significantly higher than postnatal concentrations for each exposure chamber.

Experimental design

Figure 1 depicts the study's experimental design. Natural cycling 6- to 8-week-old virgin females (n=30) were placed with proven 10-week-old breeder males (n=10) to mate naturally in the proportion of three females to each male. Mating was confirmed the following morning, by the presence of a vaginal plug (gestation day 0=day of postcoital plug) and the females were separated from the males. For prenatal exposure, the pregnant mice (n=18) were randomly placed into either FA (n=11) or AA (n=7) chambers, housed four per cage. As soon as females displayed visual evidence of pregnancy, they were checked daily until parturition. Within the first 24 hours after parturition, gestation length, litter size, litter birth weight, live birth index (number of live offspring/number of offspring delivered), and sex of the offspring (determined by anogenital distance) were recorded. At this time, five females and offspring from the FA chamber were randomly selected and transferred to the AA exposure chamber (postnatal exposure). The remaining 13 females and offspring were kept in their original location. After weaning, the animals were separated, and only female born under the experiment conditions continued in the chambers, housed

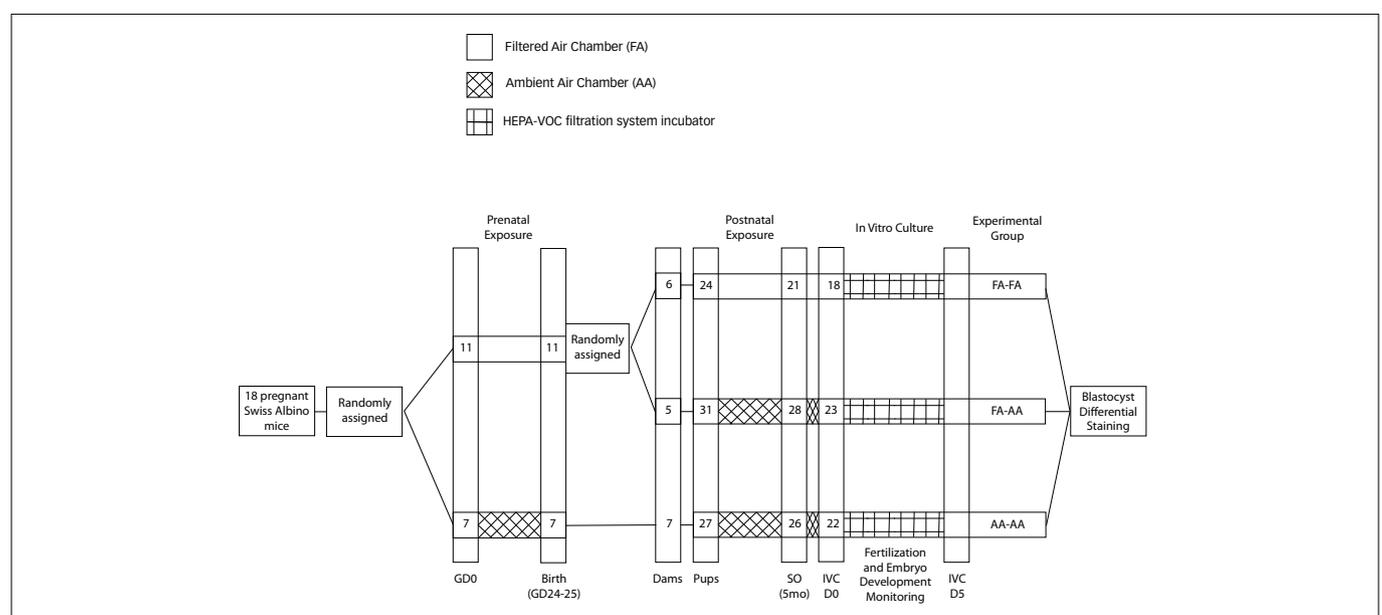


Figure 1 - Experimental design (boxed values represent the number of female mice). GD: gestation day; SO: superovulation; IVF: *in vitro* fertilization; D: day; IVC: *in vitro* culture.

four per cage. The study comprises three different experimental groups: 1. pre- and postnatal exposure to filtered air (FA-FA Group, n=24); 2. prenatal exposure to filtered air and postnatal exposure to ambient air (FA-AA Group, n=31); 3. pre- and postnatal exposure to ambient air (AA-AA Group, n=27). After five months of postnatal exposure, all females were superovulated, as described below, and killed by cervical dislocation immediately before oocyte collection.

Preparation of culture media

Different culture media were used for each IVF step:

1. collection medium: used for the collection of oocytes from oviducts and for the isolation of the cauda epididymis and vas deferens, modified human tubal fluid (mHTF no. 90126; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) prewarmed to 37 °C. The mean pH value of this medium was 7.34 ± 0.04 in ambient air;
2. insemination medium : used for sperm capacitation and IVF, human tubal fluid (HTF no. 90125; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA), containing 10% serum substitute supplement (SSS no. 99193; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). The mean pH value of this medium was 7.29 ± 0.05 in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37 °C;
3. embryo culture medium: used for embryo culture up to the blastocyst stage, potassium-enriched simplex optimized medium (KSOM) with glucose and amino acids (KSOM with amino acids no. MR-107; Specialty Media, Chemicon, Phillipsburg, NJ, USA) supplemented with 5 mg/mL of human serum albumin (HSA-solution no. 10064; Vitrolife AB, Gothenburg, Sweden). The mean pH value of KSOM^{AA} medium was 7.28 ± 0.03 in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37 °C. Insemination and embryo culture media were overlaid with embryo-tested mineral oil (Oil for Embryo Culture no. 9305; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) and equilibrated overnight in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37 °C. The same batch of each culture medium was used in all experiments.

Gonadotrophin stimulation and oocyte collection

Females from each postnatal exposure group were superovulated at five months of age by intraperitoneal injection of 10 IU of equine chorionic gonadotrophin (eCG, Folligon 1,000 IU; Intervet International, São Paulo, São Paulo, Brazil) followed 48 hours later by an intraperitoneal injection of 10 IU of human chorionic gonadotrophin (hCG, Choragon 5,000 IU; Ferring, São Paulo, São Paulo, Brazil). The oviducts were removed between 14 and 16 hours after hCG administration and were placed in prewarmed collection medium. Cumulus-oocyte complexes

were released from the ampullar oviduct at the site of the cumulus bulge by tearing it with a 30-gauge needle. All intact cumulus masses of each female were washed through two drops of insemination medium to remove debris and blood, after which they were transferred to a 100- μ L drop of the same medium overlaid with embryo-tested mineral oil in 35-mm culture dishes (Falcon no. 3001; Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, USA) before fertilization *in vitro*.

Sperm retrieval and capacitation

Ten proven 10-week-old breeder males of the same strain were killed 12-13 hours after the females were injected with hCG. After exposure of the peritoneal cavity, the cauda epididymis and vas deferens were removed from each testis, washed immediately in prewarmed collection medium, and transferred to a 400- μ L drop of insemination medium in a 35-mm culture dish equilibrated overnight under embryo-tested mineral oil in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37 °C. Spermatozoa were gently squeezed out of the epididymis using a watchmaker's forceps, and the residual caudal tissue was discarded. The spermatozoa retrieved from the mice were mixed together, and capacitation was allowed to proceed for 60 to 90 minutes, at 37 °C, in 5% CO₂. Sperm concentration was assessed using a Makler chamber.

IVF and embryo culture

IVF and embryo culture were performed according to procedures described by Perin et al.²⁴. Briefly, the IVF and embryo culture procedures were performed in HEPA-VOC filtration system incubators (Series II Water Jacketed Incubator, Model 3110; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The IVF procedure was carried out in 100- μ L drops of insemination medium under mineral oil. The capacitated sperm suspension was gently added to the drops containing cumulus-oocyte complexes to yield a final motile sperm concentration of 3 to 4 $\times 10^6$ /mL. After incubation with sperm suspension at 37 °C under 5% CO₂ in air for four hours, the cumulus cells and attached sperm were mechanically removed from the oocytes, by aspirating them several times through a fine-drawn glass pipette. Following rinsing, fertilized oocytes from each female were allotted to groups of ten and cultured in 20- μ L drops of KSOM medium for 120 hours. Embryo culture dishes were prepared the day before cumulus-oocyte complex collection with drops of the culture medium overlaid with embryo-tested mineral oil in 35-mm dishes and equilibrated overnight on open incubator shelves in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37 °C.

Embryo evaluation

Embryo examination was done on the heated stage (~37°C) of an inverted microscope at X200 magnification (Eclipse TE2000-U with Hoffman modulation contrast; Nikon, Melville, NY, USA) 6, 96 and 120 hours after insemination (days 1, 4 and 5, respectively). Fertilization assessment was carried out six to eight hours after insemination. Oocytes presenting two pronuclei (2PN) and two polar bodies were considered normally fertilized. On days 4 and 5, embryo morphology, developmental progress, number of embryos reaching blastocyst stage (the blastocoele occupying at least 80% of total embryo volume) and the numbers of blastocysts that at least started hatching were recorded. Blastocyst morphology classification was based on criteria described by Gardner and Lane²⁵. The hatching status of blastocysts identified on days 4 and 5 was graded on a 4-point scale from 0 to 3, in which 0=zona enclosed, 1=initially (herniation of zona pellucida by less than 50% of the embryo), 2=partially (herniation of zona pellucida by at least 50% of the embryo), and 3=completely hatched blastocysts. A weighted hatching score representing the sum of the hatching status grade of every blastocyst divided by the total number of blastocysts was calculated for the evaluations occurring at 96 and 120 hours after insemination ("Score96" and "Score120", respectively) for each female. The present system awards a total possible score of 3 for each evaluation day. A discriminatory scoring system ("D Score") was then developed to identify the developmental potential between evaluations of the cohort of blastocysts from each female. The "D Score" was weighted by the equation:

$$D\text{ Score} = ((\text{Score}_{120}/3) + (\text{Score}_{96}/3)) - ((\text{Score}_{120} - \text{Score}_{96})/6)$$

The rationale behind this system was to balance the hatching status and the developmental potential of blastocysts, in order to facilitate the separation of females with cohorts of blastocysts presenting similar hatching status but different developmental potential. This scoring system produces a maximum score of $((3/3) + (3/3)) - ((3-3)/6) = 2$.

Differential inner cell mass and trophectoderm cell counts

By day 5 of culture (120 hours after insemination), differential cell counts of the inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) of three blastocysts produced *in vitro*, randomly selected from each female mice, were determined by a modification in a method described by Thouas et al.²⁶ Briefly, intact blastocysts (in groups of three to five) were incubated for ten seconds in 500 µL of HTF medium containing 50 µg/mL

of propidium iodide (PI; Chemicon, Temecula, CA, USA) and 1% Triton X-100 (TX-100; Sigma, St. Louis, MO, USA). The blastocysts were then transferred to fixative solution containing 25 µg/mL of bisbenzimidazole (H33258; Hoechst AG, Frankfurt, Germany) and 100% ethanol (no. 1.00983.1000; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), and stored overnight at 4 °C. Fixed and stained blastocysts were then transferred into glycerol, individually placed on glass microscope slides under coverslips and visualized for cell counting. Counting was performed from digital photographs of images obtained on an epifluorescence microscope (Eclipse 90i; Nikon, Melville, NY, USA) fitted with a mercury lamp and excitation filters (460 nm for blue and red fluorescence, and 560 nm for red only). An observer blind to experimental protocols performed all cell counts.

Statistical analysis

The experimental unit was an individual female mouse for the assessment of either the reproductive success and the morphological development of zygotes produced by IVF, according to the pre- and postnatal exposure to FA and/or AA. Gestation length, litter size, litter birth weight, litter birth index, and sex ratio (male/female+male) variables were analyzed using two-sample Hotelling's T₂ test assuming homogeneity of variance by Bartlett-Box F test. The genetic variability of the mice used in this study determined different patterns of ovarian response to superovulation which were identified and grouped through the K-means cluster analysis method performed on the number of oocytes retrieved and inseminated as poor (centroids: 20.3±7.0 and 17.7±5.5, respectively), moderate (centroids: 42.3±6.5 and 38.4±6.5, respectively), or high (centroids: 68.5±9.3 and 62.6±7.8, respectively) responders. Thus, ovarian response was analyzed as a categorical independent variable, in order to evaluate its effect on each experimental group. Categorical data regarding ovarian response to superovulation in each experimental group were evaluated using a χ^2 test. For the assessment of the morphological development of zygotes *in vitro*, the experimental unit was the mean number of zygotes per female mouse. However, only the drops of culture medium containing all the ten zygotes were included in the analysis. The dependent variables for this assessment included: number of zygotes, fertilization rate, number of blastocysts and of blastocysts that at least started hatching at 96 and 120 hours after insemination, blastocyst formation and hatching rates at 96 and 120 hours after insemination, D Score, total cell number and the numbers of ICM and TE cells from blastocysts that had developed 120 hours after insemination. All percentage data were subjected to arcsine transformation. The effects of pre and/or postnatal

Table 1 - Assessment of reproductive variables at the time of birth in five-month-old Swiss Albino pregnant mice according to prenatal exposure to filtered (FA) or ambient (AA) air

Reproductive variable	Exposure protocol	
	FA	AA
Gestation length (days)	24.73±1.90	25.14±3.08
Litter size	9.18±2.89	9.00±2.77
Litter birth weight (g)	1.72±0.02	1.71±0.06
Live birth index	0.93±0.08	0.98±0.05
Sex ratio (M/M+F)	0.46±0.07	0.58±0.15

T²: 12.178, p = 0.182

ambient air exposure and ovarian response on each dependent variable were evaluated performing a multivariate analysis of variance (MANOVA). The Tukey HSD *post hoc* test was used for all comparisons of individual dependent variables between groups. Distribution of the cell populations was displayed using notched boxplots. A computer-generated list of random numbers was used whenever randomization was necessary. Data are presented as mean±SD. The data were analyzed using the Statistics Package for Social Sciences version 13.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA).

Results

Animal exposure to filtered or ambient air and breeding

Table 1 shows the reproductive performance of pregnant mice exposed to either AA or FA. Gestation length, litter size, litter birth weight, live birth index, and sex ratio did not differ significantly between exposure groups.

Ovarian response to superovulation after pre- and/or postnatal exposure to ambient air

Ovarian response to superovulation was absent in 14.3%, 17.9% and 15.4% of the mice in groups FA-FA, FA-AA, and AA-AA, respectively. The number of females presenting low, moderate or high response to superovulation was 5, 5, and 8 in FA-FA Group, 8, 9, and 6 in FA-AA Group, and 4, 8, and 10 in AA-AA Group, showing that the distribution of the different patterns of ovarian response to superovulation was not affected by the pre- and/or postnatal exposure of the female mice to ambient air ($\chi^2=3.029$; $p=0.805$).

IVF, embryo development, and differential nuclear staining

Means (±SD) for all *in vitro* embryonic development variables according to ovarian response pattern for each exposure group are reported in Table 2.

Effects of the ovarian response

A multivariate effect for ovarian response on IVF and embryo development and on blastocyst cell segregation was found (Pillai's trace=0.62; $F=1.66$; $p=0.05$; power=0.952). The univariate analysis of the effect of the ovarian response on each parameter of IVF and embryo development to blastocyst stage is shown in Table 3. No significant differences related to IVF and embryo development or in blastocyst cell segregation were found for any ovarian response pattern in the univariate analysis. *Post hoc* comparison of embryonic developmental parameters or blastocyst cell segregation by ovarian response pattern showed no difference between the patterns.

Table 2 - Effects of the pre- and postnatal exposure of five-month-old Swiss Albino female mice to filtered (FA) and/or ambient (AA) air on *in vitro* embryo development and lineage specification (inner cell mass, ICM; trophoctoderm, TE) in the blastocyst according to ovarian response. For explanation of the discriminatory score (D Score), see text.

Dependent variable	Exposure protocol								
	FA-FA			FA-AA			AA-AA		
	Poor responder	Moderate responder	High responder	Poor responder	Moderate responder	High responder	Poor responder	Moderate responder	High responder
Zygote	9.57.43	9.15±1.17	8.98±0.77	9.30±0.59	9.05±0.70	9.18±0.62	9.50±0.43	9.08±1.43	9.14±0.57
Fertilization rate	0.95±0.05	0.91±0.11	0.89±0.08	0.92±0.06	0.90±0.07	0.91±0.07	0.95±0.04	0.90±0.15	0.92±0.06
Blastocyst (96h)	8.02±1.53	7.47±1.71	7.56±1.17	7.22±1.95	6.69±1.60	6.65±1.09	5.84±2.95	7.44±1.69	6.76±2.42
Blastocyst rate (96h)	0.85±0.14	0.82±0.12	0.84±0.12	0.81±0.19	0.73±0.20	0.73±0.12	0.60±0.25	0.80±0.09	0.73±0.23
Hatching (96h)	4.68±2.39	3.47±2.37	4.77±1.50	3.22±1.94	3.73±1.69	3.19±1.26	2.09±2.49	4.44±2.46	3.28±1.80
Blastocyst (120h)	9.13±0.62	8.60±1.21	8.30±0.60	8.55±0.88	8.38±0.59	8.26±1.15	8.33±1.05	8.44±1.50	8.10±1.38
Blastocyst rate (120h)	0.96±0.04	0.94±0.05	0.92±0.03	0.94±0.07	0.92±0.06	0.90±0.07	0.87±0.10	0.92±0.07	0.88±0.12
Hatching (120h)	8.45±0.99	7.37±1.07	7.85±0.61	8.14±0.83	7.99±0.81	7.52±1.23	7.17±1.97	8.17±1.48	7.47±1.81
D Score	0.66±0.20	0.53±0.19	0.66±0.11	0.57±0.13	0.60±0.10	0.58±0.13	0.49±0.15	0.66±0.19	0.53±0.14
Total cell count	126.8±10.2	127.0±14.0	132.4±11.9	130.7±12.6	123.7±11.5	134.1±11.4	126.2±13.6	127.7±10.0	125.5±6.4
ICM cells	40.7±4.7	39.7±5.0	40.4±5.8	22.5±3.4	25.0±4.0	24.3±3.1	24.0±1.4	24.5±5.4	24.8±3.5
TE cells	86.2±12.1	87.3±11.0	92.0±7.8	108.2±12.1	98.6±8.7	109.8±8.5	102.2±12.6	103.2±8.0	100.8±6.5
ICM/TE ratio	0.48±0.11	0.46±0.06	0.44±0.05	0.21±0.04	0.25±0.03	0.22±0.01	0.24±0.02	0.24±0.05	0.25±0.04

Values are means±standard deviation.

Table 3 - Multivariate general linear model analysis: individual independent variables effects and full-factorial interaction between variables

Dependent variable	Group		Response		Group x Response	
	F	p-value	F	p-value	F	p-value
Zygote	0.037	0.964	1.090	0.344	0.144	0.965
Fertilization rate	0.401	0.672	1.448	0.244	0.263	0.901
Blastocyst (96h)	1.529	0.226	0.075	0.928	0.652	0.628
Blastocyst rate (96h)	0.789	0.460	0.099	0.906	0.495	0.740
Hatching (96h)	1.522	0.227	0.370	0.693	1.258	0.298
Blastocyst (120h)	0.638	0.532	0.873	0.424	0.182	0.947
Blastocyst rate (120h)	0.205	0.816	1.367	0.263	0.139	0.967
Hatching (120h)	0.329	0.721	0.319	0.729	0.981	0.426
D Score	0.765	0.470	0.127	0.881	1.787	0.145
Total cell count	0.400	0.673	0.931	0.400	0.788	0.538
ICM cells	85.580	0.000	0.179	0.837	0.281	0.889
TE cells	17.015	0.000	1.223	0.302	1.451	0.230
ICM/TE ratio	122.377	0.000	0.430	0.653	1.111	0.361

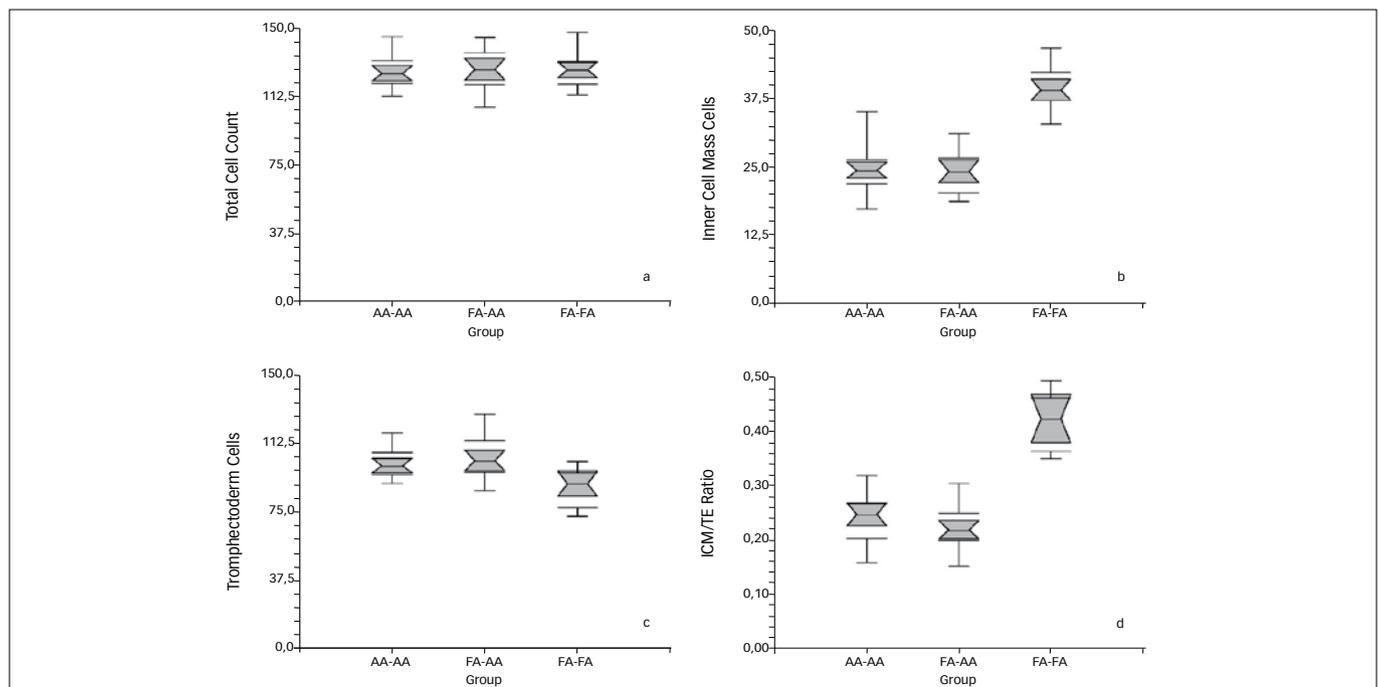


Figure 2 - (A) Notched box plots depicting the distribution of the total number of cells; (B) the number of inner cell mass (ICM) cells; (C) the number of trophectoderm (TE) cells; (D) and the ratio of ICM to TE cells in blastocysts produced by *in vitro* fertilization from five-month-old Swiss albino female mice exposed pre- and postnatally to filtered (FA) and/or ambient (AA) air. The top and bottom of the box are the 25th and 75th percentiles and the line drawn through its middle represents the median (the 50th percentile). The length of the box is thus the interquartile range (IQR). The upper adjacent value is the largest observation that is less than or equal to the 75th percentile plus 1.5 times IQR. The lower adjacent value is the smallest observation that is greater than or equal to the 25th percentile minus 1.5 times IQR.

Effects of the exposure to ambient air

A multivariate effect for pre- and/or postnatal exposure to ambient air on IVF and embryo development and on blastocyst cell segregation was found (Pillai's trace=1.04; F=3.98; p=0.000; power=1.000). The univariate analysis of the effect of the exposure protocol on each parameter of IVF and embryo development to blastocyst stage is shown in Table 3. No significant differences were found for any exposure protocol in the univariate analysis. Figure 2 shows distribution of the total

number of cells, cells in the ICM and TE, and the ratio of ICM to TE cells of blastocysts originated from oocytes fertilized *in vitro*, obtained from females exposed pre- and/or postnatally to filtered and/or ambient air. The univariate analysis of the effect of the exposure protocol on each parameter of blastocyst cell segregation is shown in Table 3. Allocation of ICM and TE cells for each exposure protocol is shown in Figure 3. The exposure protocol revealed a significant effect on ICM cell count, TE cell count, and on the ICM/TE ratio, but no significant difference

Table 4 - Effects of pre- and postnatal exposure of five-month-old Swiss Albino mice to filtered (FA) and/or ambient (AA) air on the pattern of cell allocation (inner cell mass, ICM; trophectoderm, TE) in blastocysts at day 5 of *in vitro* development. Exposure protocols with mean values of dependent variables showing no difference between them were grouped in homogeneous subsets.

Dependent variable	Subset 1		Subset 2	
	Exposure	Mean±SD	Exposure	Mean±SD
ICM	FA-AA	23.94±3.58	FA-FA	40.29±5.00
	AA-AA	24.53±3.91		
TE	FA-AA	104.89±10.84	FA-FA	89.04±9.78
	AA-AA	101.90±7.98		
ICM/TE ratio	FA-AA	0.23±0.04	FA-FA	0.46±0.07
	AA-AA	0.24±0.04		

$p < 0.05$, subset 1 versus subset 2 (post hoc Tukey's HSD test, after MANOVA).

among the exposure protocols in total cell count. *Post hoc* comparison of the blastocyst cell segregation parameters by the exposure protocol showed significant differences between groups. The cell counts in the ICM and the ICM/TE ratios in blastocysts produced in the FA-FA protocol were significantly higher ($p < 0.05$) than in blastocysts produced in the FA-AA and AA-AA protocols. However, cell counts in the TE in blastocysts produced in FA-FA protocol were significantly lower ($p < 0.05$) than in blastocysts produced in the FA-AA and AA-AA protocols (Table 4).

Table 2 shows that no significant ovarian response versus exposure protocol interaction on IVF and embryo development or on blastocyst cell segregation was observed (Pillai's trace=0.93; $F=1.16$; $p=0.248$; power=0.973).

Discussion

Our data show that chronic preconceptional exposure of female mice to ambient $PM_{2.5}$ mainly derived from vehicular emissions throughout the reproductive lifespan reduces the allocation of cells to the embryonic lineage without changing the total cell

count in blastocysts, compromising implantation potential and viability of the embryo and suggesting a deviation of cell segregation to the placental lineage. Furthermore, embryos from mice exposed pre- and/or postnatally to ambient $PM_{2.5}$ present a similar pattern of lineage specification disruption, reflecting that this effect was not enhanced by prenatal exposure and could be specifically linked to postnatal exposure. On the other hand, reproductive outcome at birth, ovarian response to superovulation, or fertilization and preimplantation embryo development potential *in vitro* were not affected in female mice chronically exposed to ambient $PM_{2.5}$ reaching the end of their reproductive lives. The large interindividual variability in the ovarian response to gonadotrophins due to the genetic background of the mouse strain selected did not affect cell lineage segregation in blastocysts or alter susceptibility of mice to the effects of ambient $PM_{2.5}$ exposure on lineage specification at the blastocyst stage.

In recent years, air pollution was included as an important risk factor for reproductive health and linked to infertility incidence increase among younger women²⁷. In fact, various studies have shown that exposure to environmental particulate air pollution could be implicated in decreased fertility both in males and females^{3,28} and adverse obstetric outcomes, including intrauterine growth retardation, intrauterine mortality, preterm birth, low birth weight, and birth defects²⁹⁻³³. However, most of them focused on the detrimental effects of prenatal rather than preconceptional exposure. Few experimental studies evaluated the effects of chronic exposure to air pollution on female reproductive potential and to our knowledge none of them specifically addressed these effects on female gametes or preimplantation embryo development^{3,21,34}. The analysis of the reproductive endpoints in these studies showed a significant decrease in the number of viable fetuses, an increase in the number of implantation failures and miscarriages. Nevertheless, despite the correlation observed between the exposure to ambient air pollution and early pregnancy loss, the biological mechanism through which it might influence pregnancy viability is still unclear. In

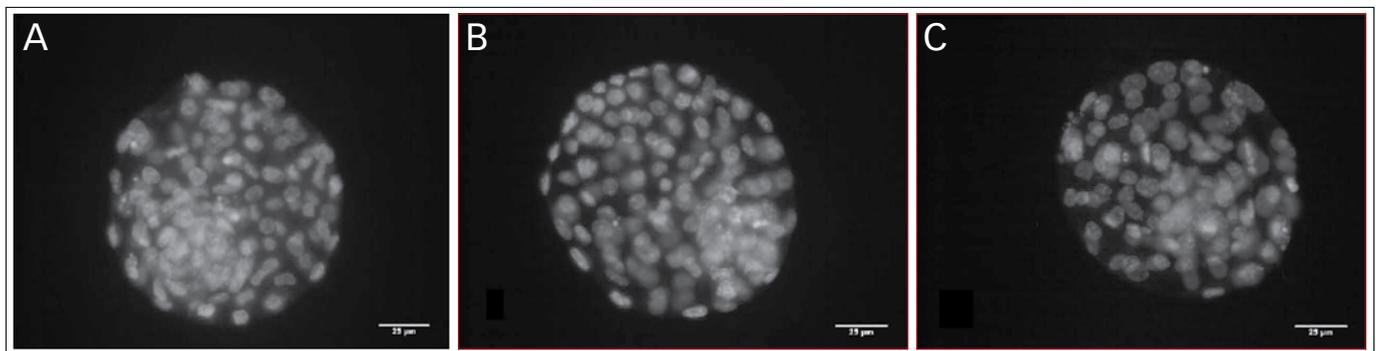


Figure 3 - Differential staining of blastocysts obtained from five-month-old Swiss Albino female mice exposed pre- and postnatally to filtered (FA) and/or ambient (AA) air: (A) FA-FA group, (B) FA-AA group, and (C) AA-AA group. Blue and pink colors indicate inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) cells, respectively.

a recent study, we were able to demonstrate that the exposure of young mice to $PM_{2.5}$ present in ambient air was implicated in disruption of the first two cell lineages allocation pattern at the blastocyst stage, without interfering in the fertilization or early development of the embryos²⁰. Based on these observations and on the contemporary tendency in our society of women to delay childbearing until relatively late in their reproductive lives, our study was designed to test the hypothesis that chronic exposure to particulate air pollution may, in fact, have a more profound impact on cell lineage segregation in blastocysts in the latter part of reproductive life, using the IVF mouse model.

In the current experiment, we found no difference in the reproductive outcome of mice exposed to ambient or filtered air, in terms of gestation length, litter size, litter birth weight, live birth index, and sex ratio. The same results were found in a previous study from our laboratory, in which pregnant mice were exposed to ambient $PM_{2.5}$ during the same time frame²⁰. These findings partially disagree with a previous study in which a poorer reproductive outcome, reflected by the loss of 33% of live-born pups per mouse in the group exposed to environmental air pollution was observed³. The discrepancy observed among these studies could be attributed to methodological differences of the latter study, mainly the mouse strain used, different exposure period, and differential exposure to NO_2 .

The detrimental effect of smoking on ovarian reserve increasing the rate of follicular depletion and accelerating the loss of reproductive function³⁵, more evident in older women¹³, prompted us to investigate the effects of pre- and/or postnatal exposure of female mice at the end of their reproductive life to ambient $PM_{2.5}$ on the ovarian response to gonadotrophins. Even though the mechanisms involved in the detrimental reproductive effect of smoking were not the same as those from the air pollution exposure, they may share similar pathways, since $PM_{2.5}$ contains high concentrations of toxic substances such as organic compounds (PAH) and soluble metals, the primary toxicants found in cigarette smoke. Our results showed that the distribution pattern of the different levels of ovarian response to gonadotrophins among female mice pre- and/or postnatally exposed to ambient $PM_{2.5}$ undergoing IVF was similar to that from the control group, suggesting that chronic exposure to daily variations in ambient $PM_{2.5}$ may not affect ovarian reserve or, if it affects, it may have no clinical importance throughout the reproductive lifespan. This finding confirm previous observation in young mice that exposure to particulate air pollution does not affect ovarian response to gonadotrophins²⁰.

No effect on IVF, embryo development up to the blastocyst stage, or hatching process was observed in mice exposed to ambient air when compared to those exposed to filtered air, independently of prenatal exposure or ovarian response pattern. The

same results were found in previous studies from our laboratory, in which mice, at the beginning of their reproductive lives, were either exposed to diesel exhaust particles during a short period of time or chronically exposed to ambient $PM_{2.5}$ ²⁰ – although in the latter study, the ovarian response pattern had a negative impact on preimplantation embryo development as evidenced by the significant impairment of IVF and embryo development observed in the high response group when compared to moderate and poor response subgroups. The lack of effect of ovarian response pattern on the embryo development observed in this study may be attributed to the natural decline in ovarian function since the mice selected for this study were at the end of their reproductive lives.

The functional differentiation of embryonic cells into two distinct lineages, the ICM cells that bring about all embryonic tissues and part of the extraembryonic membranes and the TE cells that contribute mainly to the formation of fetal placenta, results in the formation of the blastocyst and the size of each cell population as well as their ratio influence its growth, viability, and implantation potential as evidenced in experimental and clinical studies³⁶⁻³⁸. Although the molecular regulation of cell segregation at the blastocyst stage is attributed to the function of transcription factors Oct4 and Nanog (ICM cell lineage) and Cdx2 (TE cell lineage), this process is still not fully understood^{38,39}. The proper specification of ICM and TE lineages required for normal blastocyst development results from the control that Oct4 and Cdx2 exert on each other's expression⁴⁰. Due to differences in cell positioning and metabolic requirements, the ICM cells are more sensitive to embryotoxic agents⁴¹. Thus, the disturbance in pathways involved in the gene expression of those transcription factors due to environmental conditions and cell lineage specific sensitivity may negatively affect embryo development and influence the pattern of latter development.

Our results show that pre- and/or postnatal exposure to ambient $PM_{2.5}$ disrupts the normal regulation of cell specification at the blastocyst stage by significantly reducing the proliferation of ICM cell population and decreasing the ICM/TE ratio and, consequently, limits the stem cell pool for fetal and extraembryonic lineages. On the other hand, the total cell number of blastocysts obtained from mice exposed to ambient $PM_{2.5}$ was not affected as a result of an increase in the number of TE cells, suggesting a deviation of the normal segregation process towards TE cell lineage. The magnitude of this effect was not changed neither by the age of the mice, prenatal exposure to ambient $PM_{2.5}$ or by ovarian response pattern to gonadotrophins, and was, in fact, the same as the one we observed in a similar experiment using mice at the beginning of their reproductive lives²⁰. The cell lineage specification disruption at the blastocyst stage identified in this study may indicate the pathway through which poor obstetric

outcome, reflected by implantation failure and early pregnancy loss, was previously observed in mice exposed to air pollution³. Based on these findings, we could hypothesize that ambient PM_{2.5} could either determine the overexpression of the transcription factor Cdx2, directing the allocation of the initially totipotent cells of the embryo to the TE lineage or trigger the oxidative DNA damage and cell apoptosis and reducing significantly ICM cell population, and thus negatively influence pregnancy viability in mice exposed to ambient PM_{2.5}.

Some important strengths of the study's experimental design include the use of an exposure chamber that closely mimics the level of particulate air pollution that is common in many large urban environments, the confirmation of the disruption of cell lineage specification at the blastocyst stage of embryo development at either extreme of reproductive lifespan of mice exposed to ambient PM_{2.5} that shared, at least in part, the same conditions of exposure during pregnancy and the first six weeks of postnatal life, and the observation that long-term, repeated exposure to particulate air pollution does not enhance the disruptive effect on the segregation of the first two cell lineages of the embryo in older mice despite their genetic variability. On the other hand, some limitations of our study should be pointed out. First, we cannot specifically attribute the reproductive toxicity to ambient PM_{2.5} since the filtering system of the chambers did not retain gaseous pollutants and the range of the detrimental effects of physical and chemical interaction among them was not evaluated. Epidemiologic studies evaluating the role of gaseous pollutants as confounders of ambient PM_{2.5} health effects showed that the use of multiple pollutant models in these studies may not be suitable and the health effects attributed to ambient gases may actually be a result of

exposure to ambient PM_{2.5}, a reasonable surrogate of personal PM_{2.5} exposure⁴²⁻⁴⁴. Second, the experiment performed *in vitro* does not allow us to infer the findings to the general population, since the effects of the exposure to ambient PM_{2.5} on the cell lineage specification of blastocysts derived from zygotes produced *in vivo* were not evaluated in this study. Third, although the observed effect can be linked to pregnancy viability loss, the only way to assess this speculation should be the transfer of the blastocysts produced in each exposure protocol to pseudopregnant mice. In order to clarify these limitations new experiments are needed.

In conclusion, this study provides further support for our previous observation that chronic exposure to ambient PM_{2.5} can disrupt the allocation pattern of the first two cell lineages at the blastocyst stage, both in young and old female mice, in a similar way, compromising implantation potential and future viability of the embryos. The specific reduction of ICM cell population may contribute to the elucidation of the mechanism whereby the exposure to particulate air pollution increases the rates of implantation failure and early pregnancy loss. Additional research is required to further investigate the biologic mechanisms that associate the exposure to ambient PM_{2.5} and poor obstetric outcome, including pregnancy viability and normal development. Furthermore, due to the nature of the exposure to ambient PM_{2.5} in large urban areas, these findings have important consequences for female reproductive health.

Acknowledgments

The authors wish to thank Alessandro M. Mazzoni, B.Sc., Ph.D., for assistance in statistical analysis.

Referências bibliográficas

1. Grevenynghe J, Sparfel L, Vee M, Gilot D, Drenou B, Fauchet R, et al. Cytochrome P450-dependent toxicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons towards human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;317(3):708-16.
2. Harrison R, Smith D, Kibble A. What is responsible for the carcinogenicity of PM2.5? *Occup Environ Med*. 2004;61(10):799-805.
3. Mohallem S, Lobo D, Pesquero C, Assunção J, Andre P, Saldiva P, et al. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. *Environ Res*. 2005;98(2):196-202.
4. Lemos M, Mohallem S, Macchione M, Dolhnikoff M, Assunção J, Godleski J, et al. Chronic Exposure to Urban Air Pollution Induces Structural Alterations in Murine Pulmonary and Coronary Arteries. *Inhalation Toxicology*. 2006;18(4):247-53.
5. Carpenter D, Shen Y, Nguyen T, Le L, Lininger L. Incidence of endocrine disease among residents of New York areas of concern. *Environ Health Perspect*. 2001;109(Suppl 6):845-51.
6. Tomei G, Ciarrocca M, Fortunato B, Capozzella A, Rosati M, Cerratti D, et al. Exposure to traffic pollutants and effects on 17-beta-estradiol (E2) in female workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 2006;80(1):70-7
7. Prospero F, Luzi S, Iacopini Z. Cigarette smoking damages women's reproductive life. *Reprod Biomed Online* 2004;8(2):246-7.
8. Kinney A, Kline J, Levin B. Alcohol, caffeine and smoking in relation to age at menopause. *Maturitas*. 2006;54(1):27-38.
9. Reynolds R, Obermeyer C. Age at natural menopause in Spain and the United States: results from the DAMES project. *Am J Hum Biol*. 2005;17(3):331-40.

10. Kinney A, Kline J, Kelly A, Reuss M, Levin B. Smoking, alcohol and caffeine in relation to ovarian age during the reproductive years. *Hum Reprod.* 2007;22(4):1175–85.
11. Valdez K, Petroff B. Potential roles of the aryl hydrocarbon receptor in female reproductive senescence. *Reprod Biol.* 2004;4(3):243–58.
12. Mlynarcikova A, Fickova M, Scsukova S. Ovarian intrafollicular processes as a target for cigarette smoke components and selected environmental reproductive disruptors. *Endocrine Regulations.* 2005;39(1-2):20–31.
13. Zenzes M, Reed T, Casper R. Effects of cigarette smoking and age on the maturation of human oocytes. *Hum Reprod.* 1997;12(8):1736–41.
14. El-Nemr A, Al-Shawaf T, Sabatini L, Wilson C, Lower A, Grudzinskas J. Effect of smoking on ovarian reserve and ovarian stimulation in in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1998;13(8):2192–8.
15. Ness R, Grisso J, Hirschinger N, Markovic N, Shaw L, Day N, et al. Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med.* 1999;340(5):333–9.
16. Neal M, Hughes E, Holloway A, Foster W. Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes. *Hum Reprod.* 2005;20(9):2531–5.
17. Motejlek K, Palluch F, Neulen J, Grümmer R. Smoking impairs angiogenesis during maturation of human oocytes. *Fertil Steril.* 2006;86(1):186–91.
18. Gruber I, Just A, Birner M, Lösch A. Effect of a woman's smoking status on oocyte, zygote, and day 3 pre-embryo quality in in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril.* 2008;90(4):1249–52.
19. Wright K, Trimarchi J, Allsworth J, Keefe D. The effect of female tobacco smoking on IVF outcomes. *Hum Reprod.* 2006;21(11):2930–4.
20. Maluf M, Perin P, Januário D, Saldiva P. In vitro fertilization, embryo development, and cell lineage segregation after pre- and/or postnatal exposure of female mice to ambient fine particulate matter. *Fertil Steril.* 2008;DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.08.081.
21. Silva I, Lichtenfels A, Saldiva P. Increase abortion in mice exposed to environmental air pollution in Sao Paulo. *Fertil Steril.* 2005;84(Suppl 1):S404–5.
22. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: National Academy Press; 1996.
23. Hinds W, editor. *Aerosol Technology: Properties, Behaviour, and Measurement of Airborne Particles.* Second ed. New York: Wiley-Interscience; 1999.
24. Perin P, Maluf M, Januario D, Saldiva P. Comparison of the efficacy of two commercially available media for culturing one-cell embryos in the in vitro fertilization (IVF) mouse model. *Fertil Steril.* 2008;90(4):1503–10.
25. Gardner D, Lane M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod.* 1993;48(2):377–85.
26. Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophoctoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod Biomed Online.* 2001; 3(1):25–9.
27. Barrett J. Fertile grounds of inquiry: environmental effects on human reproduction. *Environ Health Perspect.* 2006;114(11):A644–9.
28. Sokol R, Kraft P, Fowler I, Mamet R, Kim E, Berhane K. Exposure to environmental ozone alters semen quality. *Environ Health Perspect.* 2006;114(3):360–5.
29. Liu S, Krewski D, Shi Y, Chen Y, Burnett R. Association between maternal exposure to ambient air pollutants during pregnancy and fetal growth restriction. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2007;17(5):426–32.
30. Pereira L, Loomis D, Conceição G, Braga A, Areas R, Kishi H, et al. Association between air pollution and intrauterine mortality in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect.* 1998;106(6):325–9.
31. Huynh M, Woodruff T, Parker J, Schoendorf K. Relationships between air pollution and preterm birth in California. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2006;20(6):454–61.
32. Dugandzic R, Dodds L, Stieb D, Smith-Doiron M. The association between low level exposures to ambient air pollution and term low birth weight: a retrospective cohort study. *Environ Health.* 2006;5:3.
33. Gilboa S, Mendola P, Olshan A, Langlois P, Savitz D, Loomis D, et al. Relation between ambient air quality and selected birth defects, seven county study, Texas, 1997–2000. *Am J Epidemiol.* 2005;162(3):238–52.
34. Silva I, Lichtenfels A, Pereira L, Saldiva P. Effects of ambient levels of air pollution generated by traffic on birth and placental weights in mice. *Fertil Steril.* 2008;90(5):1921–4.
35. Jurisicova A, Taniuchi A, Li H, Shang Y, Antenos M, Detmar J, et al. Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons diminishes murine ovarian reserve via induction of Harakiri. *J Clin Invest.* 2007;117(12):3971–8.
36. Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M, Sajko M. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reprod Biomed Online.* 2004;8(6):687–94.
37. Fleming T, Kwong W, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, et al. The embryo and its future. *Biol Reprod.* 2004;71(4):1046–54.
38. Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson R, Rossant J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn.* 2006;235(9):2301–14.
39. Ralston A, Rossant J. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophoctoderm fate in the early mouse embryo. *Dev Biol.* 2008;313(2):614–29.
40. Strumpf D, Mao C, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, et al. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoctoderm in the mouse blastocyst. *Development.* 2005;132(9):2093–102.

41. Pampfer S. Apoptosis in rodent peri-implantation embryos: differential susceptibility of inner cell mass and trophoblast cell lineages - a review. *Placenta*. 2000;21(Suppl A):S3-10.
42. Sarnat J, Koutrakis P, Suh H. Assessing the relationship between personal particulate and gaseous exposures of senior citizens living in Baltimore, MD. *J Air Waste Manag Assoc*. 2000;50(7): 1184-98.
43. Sarnat J, Schwartz J, Catalano P, Suh H. Gaseous pollutants in particulate matter epidemiology: confounders or surrogates? *Environ Health Perspect*. 2001;109(10):1053-61.
44. Liu L, Box M, Kalman D, Kaufman J, Koenig J, Larson T, et al. Exposure assessment of particulate matter for susceptible populations in Seattle. *Environ Health Perspect*. 2003;111(7): 909-18.

Bioética e biojuridicização na reprodução humana assistida

Bioethics and biolaw in assisted human reproduction

Kalyne Lobão¹



Kalyne Lobão Silva é graduada em Biomedicina pelo Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP- ULBRA). Tem experiência na área de análises clínicas, biologia molecular e citogenética humana aplicada ao diagnóstico clínico.

Resumo

A bioética é um ramo da ética que discute as intervenções biológicas na estrutura biológica humana que provocam dúvidas quanto ao respeito ou não aos valores éticos. Está associada à genética e à reprodução humana, bem como às técnicas de fertilização. As técnicas de reprodução humana assistida (RHA) têm como objetivo a geração de novos indivíduos. Trata-se de um tema polêmico e atual que desencadeia debates éticos e questionamentos jurídicos, visto que interfere no processo de procriação natural do homem, desafiando o direito, principalmente no que tange às relações de parentesco, fazendo com que o conceito de filiação seja repensado. As procriações artificiais perturbaram as representações tradicionais dos modos de concepção e das estruturas de parentesco. A fecundação *in vitro* criou uma situação especialíssima na história da maternidade: pela primeira vez, o início da vida humana pode se dissociar do corpo da mulher geradora. Portanto, no caso da RHA, especificamente a fecundação *in vitro*, criou-se uma situação totalmente inédita para a qual não existe nenhuma legislação ou, quando muito, legislações previstas para circunstâncias diferentes, mas que não impedem hoje o uso impróprio dessas técnicas aplicadas à RHA. Sem dúvida, a bioética não pode e nem deve ignorar o processo legislativo, mas manter-se aberta às vozes ativas do campo da reprodução humana. Reconhecer esse dado significa respeitar o ser humano em si mesmo, durante todo o seu desenvolvimento, e para além dele próprio, os seus semelhantes.

Unitermos: Bioética; Reprodução humana assistida; Regulamentações.

Abstract

The bioethics is a branch of ethics that discusses the biological interventions in human biological structure, causing doubts in what concerns the fact of respecting or not the ethical values. It is associated to the genetics and human reproduction, as well as fertilization techniques. The assisted human reproduction (AHR) techniques have the objective of generating new individuals. It is a controversial and current theme that unleashes ethical debates and juridical issues, because it interferes in the natural process of human procreation, challenging the law, mainly the family relationship, and inciting a new point of view over the concept of affiliation. The artificial procreations disturb the traditional representations of conception and kinship structures. The fecundation *in vitro* created an exceptional situation in the history of the maternity: for the first time, the beginning of human life could be dissociated of woman's body. Therefore, in AHR cases, specifically *in vitro* fecundation, a brand new situation has been brought up for which no legislation was regulated; legislations are used for different circumstances, but do not block the inappropriate use of those applied techniques to AHR. There is no doubt that the bioethics can not ignore the legislative process, but it also has to be opened to the active voices of human reproduction field. Recognizing these data means respecting humans during all their development and beyond the individuals, referring to their fellow creatures.

Uniterms: Bioethics; Assisted human reproduction; Regulations.

¹ Bacharel em Biomedicina pelo Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP) – Palmas (TO), Brasil.

Endereço para correspondência: Kalyne Lobão – Quadra 108 Sul, Alameda 13, lote 74 – CEP 77020-116 – Palmas/TO – E-mail: kalynelobao@msn.com

Introdução

A bioética é um ramo da ética aplicada que estuda as implicações de valor das práticas e desenvolvimento das ciências da vida. Está associada à genética e reprodução humana, bem como às técnicas de fertilização. São temas polêmicos e atuais que desencadeiam debates éticos e questionamentos jurídicos, visto que interferem no processo de procriação natural do homem, desafiando o direito, principalmente em relação às relações de parentesco, fazendo com que o conceito de filiação seja repensado.

Os aspectos éticos não vêm sendo tratados com o rigor necessário pelos órgãos de comunicação. Cabe alertar que os instrumentos jurídicos legais não impedem hoje o uso impróprio das técnicas aplicadas à RHA, a não ser por algumas normas, regulamentações e diretrizes estabelecidas.

Isso traz uma reflexão sobre as técnicas de fertilização e os avanços obtidos, contrapondo com os conceitos morais e éticos da sociedade.

Histórico

Aristóteles é considerado o primeiro autor a apresentar a ética de forma sistematizada, buscando os princípios da ação humana por meio de uma reflexão acerca da diferença entre conhecimento teórico e prático. No século 4 a.C., Aristóteles escreveu um tratado de embriologia¹.

A bioética não é apenas um tema legítimo do campo dos direitos humanos, mas suas origens remontam à luta pelo estabelecimento dos direitos humanos e seu marco histórico é, sem dúvida, o Tribunal de Nuremberg (1945-1946). Esse é o momento do início da bioética. A revelação das barbáries cometidas pelos médicos nazistas despertou para o perigo de se fazer da ciência um uso inadequado. Com isso, o Código de Nuremberg (1947) configurou-se como o primeiro indicador de cunho universal da necessidade de aliar a pesquisa científica ao respeito pelo ser humano.

Mesmo após o aparecimento do Código de Nuremberg, as infrações éticas, infelizmente, continuaram e continuam a ocorrer.

O aumento do número de situações abusivas levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a discutir a questão e a rever o Código, considerando que os indivíduos devem ser protegidos por algum comitê de bioética sob regulamentação federal, pois, nesse, não há menção de um comitê de ética que confira ao pesquisador a responsabilidade de zelar pelos direitos e pelo bem-estar dos indivíduos que participarem da pesquisa².

Na composição de uma comissão de bioética, seus membros devem ser capazes de compreender a complexidade e os múltiplos aspectos éticos presentes. Do contrário, suas atividades resultarão

em recomendações injustas, inapropriadas e não-operacionais. A inclusão de profissionais qualificados que integram o segmento social de mais elevado nível educacional introduz o problema da onipotência e do elitismo, o que pode tornar uma comissão ilegítima, composta por membros qualificados, mas não representativos dos valores e interesses dos outros segmentos. E para que um dispositivo legal obtenha êxito, é necessário que seja amplamente reconhecido como legítimo pela sociedade.

Com o termo 'bioética', tenta-se focalizar a reflexão ética no fenômeno da vida. Constata-se que existem formas diversas de vida e modos diferentes de consideração dos aspectos éticos a elas relacionados.

A bioética nasceu e se desenvolveu a partir não apenas dos grandes avanços da biologia molecular e da biotecnologia aplicada à medicina nos últimos anos, como também da denúncia dos abusos realizados pela experimentação biomédica em seres humanos. As intervenções dos poderes legislativo e executivo em questões que envolvem proteção à vida também contribuíram para tal desenvolvimento, assim como as declarações das instituições religiosas sobre o tema³.

É devido a essa bioética que a genética tem apresentado, nos últimos anos, uma série de desafios éticos, o que se pode dizer que produziu uma perplexidade no seio da comunidade com a apresentação da reprodução humana assistida (RHA). A história da humanidade sempre revelou uma intensa preocupação com a questão da fecundidade e, inversamente, temeu o risco da esterilidade, motivo de exclusão em grupos familiares e sociais.

Os mitos a respeito da esterilidade, nascidos entre os povos antigos, e as citações sobre infertilidade constante dos textos bíblicos deixam claro que a esterilidade para a humanidade teve sempre muita importância, sendo, por isso, motivo de investigação e questionamento durante toda a história. Só no final do século 16 (em 1590) essa concepção passou a mudar com os avanços científicos, sendo que as tentativas de realizar procedimentos de reprodução assistida foram iniciadas no final do século 18⁴.

Vive-se numa época em que o progresso acelerado da tecnologia nos coloca, quase diariamente, diante de novas descobertas. No entanto, algumas novidades são tão marcantes que, diante delas, não podemos permanecer indiferentes.

Com isso, o nascimento dos bebês inseminados artificialmente deixou de ser um acontecimento raro e passou a fazer parte, normalmente, da forma terapêutica do tratamento dos problemas como o da esterilidade.

A importância da biojuridicização da bioética

Torna-se patente a importância da aproximação que deve existir entre direito e bioética. São assuntos que reclamam a interferência estatal por intermédio de seus órgãos legislativos,

buscando-se estabelecer limites dentro dos quais se considerará lícita determinada conduta.

Esse mais novo ramo do estudo jurídico é resultado da conexão, maior e mais intensa, entre bioética e biodireito, pois mesmo sendo duas grandezas distintas são ao mesmo tempo inseparáveis.

É a partir da bioética que as noções do biodireito giram em torno daquelas proposições jurídicas que têm a vida como objeto principal. As regras do direito correspondem à finalidade do Direito e não da moral. Bioética e Direito, bem como biodireito e bioética são dois modos diversos de afrontar as questões do respeito à vida humana⁵.

Diante de tais problemas, a bioética e o biodireito defrontam-se com a dificuldade de traduzir em leis positivas e em princípios éticos de ação uma ordem ética e jurídica que tutele e faça obedecidos os direitos fundamentais do homem nesse campo.

Dá a necessidade de articular a bioética com o biodireito e o biodireito com a bioética. Ambas as instâncias se ajudam mutuamente. A bioética provocará o biodireito com suas reflexões a partir de uma perspectiva mais ampliada de tutela da vida e da dignidade humana. Isso englobará todas as situações e todos os direitos do indivíduo, interrogando-o e solicitando-lhe leis positivas mais específicas.

Questionamentos bioéticos das técnicas de reprodução humana assistida

Nesse campo, qualquer transgressão, mesmo não regulada a matéria em lei, afigura-se igualmente ilícita por ofender bens que simultaneamente são jurídicos na medida em que o Direito constitui o mínimo ético fecundado pelos princípios da ética e da moral.

Muitos são os questionamentos éticos que se seguiram à difusão do uso das técnicas de reprodução humana assistida:

- o primeiro questionamento diz respeito às novas técnicas que vêm sendo aplicadas sem que se dê o tempo necessário para sua experimentação. Uma determinada técnica, aplicada sem escrúpulos e sem os testes necessários – muitas vezes, a fama de seu criador ou o lucro do laboratório tem preferência – pode vir a resultar em atentado contra a vida da mãe ou do feto⁶;
- o segundo se refere ao fato de os embriões congelados nem sempre serem destinados a uma gravidez. Eles podem servir como objeto de pesquisa, ser geneticamente manipulados ou simplesmente destruídos, como aconteceu na Inglaterra em 1996⁶.

O comércio de embriões com espécies classificadas de acordo com os genes característicos e determinado tipo de pele, olhos, cabelos, já é uma realidade. No entanto, de acordo com os

padrões jurídicos atuais e dominantes, não se pode validar qualquer prática de comercialização de embriões. Toda intervenção humana deve ter um limite e um critério a serem estabelecidos para o bem-estar do indivíduo humano.

A realidade é que, na fertilização *in vitro*, os abortamentos “espontâneos”, ocorrem em maior número do que na gestação natural. Os argumentos dos meios científicos são de que o número de abortamentos tende a diminuir na mesma proporção do aperfeiçoamento científico das técnicas utilizadas, até que se atinjam os parâmetros dos abortos ocorridos na fecundação natural⁴.

A RHA pode expor o embrião a riscos tanto individualmente (com malformações e ao possível aborto) como socialmente, ou seja, sobre o direito de filiação, da maternidade, quando a “mãe gestante” for diferente da “mãe biológica”, e da paternidade, quando não se sabe quem é o “pai biológico”.

Tal procedimento justificaria, então, a produção de um ser humano no laboratório, cujas possibilidades de sobrevivência são de fato bastante limitadas e implica, em todo caso, a morte de vários embriões?

Mas, independentemente da forma de regras adotadas, atualmente pode-se dizer que em todos os países, a ética da pesquisa biomédica é inspirada em um conjunto de textos internacionais, obtendo-se regras mais ou menos comparáveis.

Em 1988, o Conselho Nacional de Saúde publicou a Resolução 01/88, que definia os aspectos éticos a serem seguidos nas pesquisas em seres humanos no país. Esse documento apresentou dificuldades operacionais que, junto aos avanços científicos e tecnológicos observados em nível mundial, evidenciaram a necessidade de revisá-la. Para isso, foram consultados vários setores da sociedade brasileira, bem como da comunidade científica, para que se identificasse o que deveria ser aprimorado. O resultado foi a Resolução 196/96 Sobre Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, atualmente em vigor. Embora a Resolução 196/96 não seja o único parâmetro quanto às questões éticas envolvidas na pesquisa com seres humanos no Brasil, ela é um dos documentos que normatiza esses aspectos no país, esperando-se que a prática dos pesquisadores seja guiada pelos seus princípios.

As exigências da Resolução 196/96 quanto ao consentimento livre e esclarecido impõem aos pesquisadores o esforço de traduzir a sua linguagem, usualmente técnica, em um discurso adequado ao universo cultural e às necessidades de seus potenciais sujeitos, de maneira a respeitar sua autonomia. Não se sabe, porém, se aquilo que está estabelecido na Resolução tem sido factível, na experiência de pesquisadores brasileiros, com o processo de obtenção do consentimento, uma vez que não se encontram relatos na literatura.

Hoje é possível para o cientista dissociar geração de gestação e nascimento. Se no processo natural de reprodução isso

acontece sem grandes preocupações, é natural que ocorram problemas de ordem psicológica na interrupção artificial da vida de um feto *in vitro*.

Além disso, há a possibilidade de um geneticista, no momento da geração, ter ao seu alcance as células germinativas e manipulá-las arbitrariamente. Nesse caso, passa-se da área da fertilização assistida para o campo da engenharia genética⁷.

Basta dar asas à imaginação para supor quantas coisas podem acontecer nesse caso. É suficiente que o pesquisador não tenha consciência ética ou que interesses econômicos predominem.

Atualmente, no Brasil, diante das manifestações de vários juristas e estudiosos, a tendência predominante é a da aceitação da regulamentação legal da RHA, conforme se vem confirmando mundialmente.

Bioética e reprodução humana assistida

Conforme já foi abordado, a bioética discute as intervenções biológicas na estrutura biológica humana que provoquem dúvidas quanto ao respeito ou não aos valores éticos. No entanto, para além das questões puramente éticas, existem também aspectos políticos e econômicos nelas envolvidos.

O centro da intervenção bioética é fazer com que as pessoas que cuidam da vida humana, em todos os seus aspectos, tenham um comportamento condizente com o que anseia a sociedade⁸.

A polêmica que envolve a inseminação, fertilização ou reprodução humana assistida (RHA), torna-se o tema preferido dos debates bioéticos, das discussões sobre os rumos da ciência e das polêmicas teológicas, ao mesmo tempo em que constitui um verdadeiro desafio para os juristas.

“Para a Organização Mundial da Saúde, a infertilidade se constitui na ausência de concepção depois de, pelo menos, dois anos de relações sexuais sem proteção”⁹.

A infertilidade é a incapacidade de ter filhos vivos, sendo possível a fecundação e o desenvolvimento do embrião ou feto, o que equivale à hipofertilidade. A infertilidade ou esterilidade pode se originar tanto em causas femininas como masculinas e, normalmente, qualifica-se como um problema de ordem física ou psicológica detectado na mulher ou no homem.

“No Brasil, as pesquisas realizadas constatam que metade dos casos de esterilidade deriva de sequelas dos processos infecciosos ou doenças venéreas aliados ao stress”¹⁰.

Em março de 1990, o Comitê Nacional de Bioética na Itália deu início à primeira discussão moral sobre reprodução humana assistida, abordando a forma como as técnicas e as doações devem ser manuseadas junto ao mercado, sendo que um dos principais aspectos éticos considerados na RHA é o caráter não lucrativo ou comercial, sendo vedada qualquer modalidade remunerada.

O Comitê Nacional de Bioética tentou não comprometer-se com esse tema, considerado muito difícil devido à hostilidade da Igreja Católica¹¹. Ela se coloca contra o fenômeno em si porque o considera uma separação arbitrária entre o ato sexual e o ato reprodutivo e, mais ainda, contra a inseminação heteróloga, como é normalmente chamada a fecundação com sêmen não pertencente ao marido, considerado pela igreja proporcional a uma infidelidade conjugal.

A fecundação assistida estaria, agora, propondo uma possibilidade de oferecer ao mercado esperma de todos os tipos humanos e selecionados com bases nas características raciais, estéticas e intelectuais consideradas desejáveis. Mas, na verdade, essas garantias não podem ser absolutas, pois houve casos nos quais casais que haviam pago rejeitaram os neonatos porque nasceram com evidentes deformações (como Síndrome de Down) que às vezes são impossíveis de ser previstas também nos nascimentos normais. Sabe-se que no mercado o cliente só leva o produto se estiver em bom estado. Em outros casos ocorreu o oposto: mães substitutas que, mesmo havendo assinado contrato de cessão, depois se recusaram a entregar a mercadoria¹¹.

O desenvolvimento das técnicas de RHA associado à procura dos “consumidores” de instituições especializadas em disponibilizar tais técnicas ao alcance da sociedade trouxeram à realidade uma verdadeira “indústria” dos úteros de aluguel.

Sabe-se, no entanto, que a finalidade da fertilização *in vitro* pode percorrer outros perigosos caminhos. Pode ter finalidade puramente científica, de conhecer as características da fecundação e o desenvolvimento da vida humana a partir do momento que passa a não ter importância, podendo, então, utilizar o ser humano como coisa ou objeto de mercado. No entanto, a fertilização *in vitro* poderá ter fins eugênicos, conhecendo-se mais exatamente as doenças hereditárias, com a possibilidade de curá-las.

A partir do momento da concepção, o que entra em jogo é a vida de um novo ser humano; mesmo que em forma incipiente de desenvolvimento, trata-se de vida humana. O mais grave inconveniente de ordem moral e ética em relação à fertilização *in vitro* diz respeito ao fato de o embrião ser manuseado e tratado como coisa, congelado e armazenado da mesma forma aplicada ao restante de um produto qualquer. Este ainda pode ser eliminado e, caso não seja mais necessária a sua utilização, poderá ser aproveitado (os embriões restantes) para experiências científicas ou outros tipos de experimento; os embriões com anomalias são descartados e eliminados, como produtos defeituosos que devam ser colocados fora do mercado⁵.

A prática da fertilização *in vitro* implica, pelo menos atualmente, um conjunto de aspectos de valoração ética que se dirigem a: perda deliberada ou prevista de embriões precoces, utilização do embrião nas pesquisas, risco de aborto do embrião tanto antes como depois da sua transferência para o útero⁹.

Torna-se cada vez mais assombroso o poder do homem diante das pesquisas empreendidas na ciência da vida que avançam para descerrar um novo tipo de humanidade e sociedade.

Hoje, existem clínicas que oferecem serviços completos abrangendo desde a assistência médica no momento da inseminação até a cobertura no âmbito jurídico. Do ponto de vista jurídico, o aluguel do útero é, normalmente, acompanhado de um contrato, conhecido como contrato de gestação⁶. Para cada caso um “preço de mercado”.

Acredita-se que isso se deva ao fato de que aspectos éticos e religiosos muitos cadentes entram em cena. Possui alma? A quem cabe decidir seu destino? Essas são apenas algumas questões que vão surgindo nas diversas doutrinas filosóficas ou religiosas. Mas, enquanto a discussão no âmbito da filosofia e das religiões vai amadurecendo, no campo jurídico há urgência em se estabelecer uma legislação adequada aos casos que caminham nos tribunais.

Na perspectiva do Direito Penal, a posição mais comum é a de aguardar os acontecimentos. De fato, raríssimos são os lugares onde o uso do expediente do útero de aluguel criminalize tanto a atividade da ofertante quanto a dos que encomendam seus serviços.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), no Brasil, houve um crescimento expressivo do número de clínicas especializadas nas técnicas de RHA, fato que justifica a necessidade de uma legislação que resguarde os direitos e a saúde de todos os envolvidos, estabelecendo critérios e responsabilidades dos profissionais que a utilizam¹².

Os aspectos éticos mais importantes são aqueles relativos à utilização do consentimento informado, à seleção de sexo, à doação de espermatozoides, óvulos, pré-embriões, à maternidade substitutiva, à redução embrionária e à utilização da técnica em casais sem problema de infertilidade.

Goldim¹³, do Comitê de Bioética em Pesquisa de Porto Alegre (RS), diz que uma demanda já encaminhada ao Poder Legislativo do Rio Grande do Sul é a utilização para fins de proteção ao parceiro portador do vírus HIV. As técnicas de reprodução seriam utilizadas com o objetivo de proteger o parceiro de uma eventual contaminação. Esse mesmo autor ressalta outra área bastante polêmica, que envolve casais homossexuais femininos e reprodução.

Goldim¹⁴ ainda se manifestou de forma mais sucinta e razoável em relação à RHA, esclarecendo as orientações sobre seus próprios objetivos e limites. O documento recomenda que seja banida toda a exploração comercial ou industrial de gametas embrionários e tecidos fetais e que, com esse propósito, seja sancionada a proibição de qualquer forma de recompensa, intermediação e publicidades.

Gametas, embrião, feto, pertencem a que ordem, das pessoas ou das coisas? O que fazer com os embriões excedentes? Poderão ser eliminados ou doados para casais?

O rápido desenvolvimento da RHA e suas inusitadas técnicas fizeram surgir muitas interrogações demonstrando a

grave e profunda dimensão do problema, não podendo, em nenhum momento, deixar de lado as questões da ética e da moralidade.

Os embriões não transferidos, denominados excedentes, constituem séria questão que assume contornos éticos, sociais e jurídicos. Mas, na tentativa de evitar uma eliminação em massa desses embriões, alguns centros médicos os mantêm congelados para futuras transferências ou para possibilitar pesquisas e manipulação com os mais variados fins¹⁵.

Não existe, até o momento, qualquer direito constitucional que proíba ou regule esse tipo de recurso utilizado para a reprodução. É importante lembrar que as leis brasileiras protegem apenas o nascituro como ser em vida intrauterina e não configuram a hipótese de um embrião existir fora do corpo da mãe⁹.

Esses procedimentos, além de apresentarem problemas na utilização das técnicas de RHA até mesmo na obtenção de apenas um embrião a ser fecundado, apresentam problemas éticos e jurídicos da maior gravidade, provocando debates que estão longe de culminarem em uma definição harmônica e consensual.

Mas o fato novo, para a qual a sociedade ainda não tem resposta, é que os progressos científicos criaram diferentes etapas do processo de reprodução e, ao mesmo tempo, obrigaram a considerar separadamente o interesse dos pacientes (no caso, o casal) e aquele decorrente da futura criança.

Realmente, as procriações artificiais perturbam nossas representações tradicionais dos modos de concepção e das estruturas de parentesco. A fecundação “in vitro” criou uma situação especial na história da maternidade e, pela primeira vez na história da humanidade, o começo da vida humana pode estar dissociado do corpo da mulher geradora¹⁶.

A reprodução humana assistida e o código civil brasileiro

O novo Código Civil incluiu entre os filhos presumidos como concebidos na constância do casamento aqueles gerados por fecundação artificial homóloga, mesmo que falecido o marido, e aqueles gerados por inseminação artificial heteróloga desde que tenha prévia autorização do marido (art. 1.597, III, IV e V, respectivamente)¹⁷.

Pessini e Barchifontane¹⁸ e o Novo Código Civil falam que, na verdade, após a possibilidade de verificação do vínculo genético por meio do exame de DNA, a presunção assume um papel secundário, visto que os tribunais brasileiros tendem a atribuir a paternidade ao pai biológico em detrimento do pai socioafetivo.

Constata-se, de qualquer modo, a preocupação dos legisladores com a utilização das técnicas de RHA. Considerados todos os princípios constitucionais que regem o código, conclui-se que o comprometimento do pai em tais hipóteses deve ser absoluto.

As disposições relativas às técnicas de RHA só se referem aos filhos gerados no casamento, únicos beneficiados com a presunção

de paternidade. A utilização das técnicas de reprodução assistida gera uma série de outras importantes questões não cogitadas pela nova lei civil, tais como gestação de substituição, relação com os doadores de gametas, destino dos embriões excedentes.

Resultado e Discussão

O direito ao planejamento familiar encontra-se regulamentado pela lei n. 9.263, de 12 de janeiro de 1996, que o declara direito de todo cidadão (art.1º), incluindo “a assistência à concepção e contracepção”, devendo ser oferecidos para o exercício do planejamento familiar “todos os métodos e técnicas de concepção e contracepção cientificamente aceitos e que não coloquem em risco a vida e a saúde das pessoas, garantida a liberdade e opção” (art. 3º, parágrafo único, I, e 9º). É razoável concluir que as técnicas de reprodução assistida são alcançadas pela citada lei¹⁷.

Atualmente, no Brasil, não há nenhuma lei que ampare e regule a RHA, havendo, entretanto, no âmbito do Congresso Nacional, projetos de lei em análise que estabelecem normas para o uso das técnicas de reprodução.

O projeto de lei mais completo e abrangente é o de n. 90/99, que ainda tramita burocraticamente no Congresso Nacional, junto à comissão de Constituição e Justiça do Senado Federal⁶.

Portanto, a carência de legislação específica, o brocardo jurídico, pelo qual o que não é proibido é permitido, e mais a evolução tecnológica que hoje integra o nosso cotidiano fazem com que a RHA seja livremente praticada, explorada e consentida, sem que nenhum controle governamental se faça valer.

As técnicas de RHA, como qualquer ato médico, deve seguir a vertente ética e ser direcionada pelos princípios bioéticos, que serviram de pilares para a decisão que estabeleceu a resolução 1358/92 do Conselho Federal de Medicina (CFM) como a única norma que estabelece regras gerais para os profissionais médicos que atuam com RHA, uma vez que tal resolução possui caráter meramente ético sem repercussões jurídicas propriamente ditas devido ao fato de não possuir força cogente¹⁹.

Portanto, mesmo que as clínicas especializadas em RHA estejam atuando a todo vapor em face do volume de pessoas inférteis que anseiam por filhos, não existe nenhuma lei que as ampare ou regule os seus procedimentos.

Apenas para não ser omissa, foi publicada no Brasil, em 5 de janeiro de 1995, a lei 8.974 (revogada em 24 de março de 2005), também chamada Lei de Biossegurança, que estabelece normas para o uso das técnicas de engenharia genética e considera crime, em seu artigo 13, quaisquer manipulações de células germinativas humanas, justamente como precaução à clonagem e eugenia, e que levou o Conselho Nacional de Saúde a editar a Resolução 196/96, dispondo sobre normas e diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, a qual foi, posteriormente,

completada pela Resolução 303/00 do mesmo órgão para incluir o tema especial da reprodução humana assistida¹⁶.

O profissional que lida com a RHA deve esclarecer seus pacientes de todos os riscos, procedimentos, custos e probabilidade de sucesso de cada técnica existente. Deve, também, alertá-lo acerca dos direitos e obrigações que surgem com o nascimento da criança e das vinculações jurídicas a que estão sujeitos.

Ao lado do aspecto biológico, pode ocorrer a duplicidade de pais ou mães socialmente aceitos ou legalmente presumidos, de acordo com o *status* dos mesmos em relação à sociedade⁸.

No que tange à questão bioética da RHA, cumpre fazer a seguinte reflexão: pode-se, e deve-se, desenvolver tudo que é científico e tecnicamente possível em matéria de experiências sobre o homem, de utilização do corpo humano e da procriação?

A moral e o direito positivo estão suficientemente aptos a enfrentar essas novas questões? Ou, ainda, estariam as novas técnicas exigindo novas regras capazes não só de contornar os problemas daí decorrentes, como também estabelecer limites de aplicação dos novos conhecimentos?

Realmente, as procriações artificiais perturbaram nossas representações tradicionais dos modos de concepção e das estruturas de parentesco. A fecundação *in vitro* criou uma situação especialíssima na história da maternidade: pela primeira vez, o início da vida humana se encontra dissociado do corpo da mulher geradora.

O desenvolvimento da ciência, porém, é irreversível e necessário, desde que não viole normas éticas que desconsideram a dignidade humana.

Sem dúvida, a bioética não pode nem deve ignorar o processo legislativo, pois um contexto complexo como esse, implicando sexualidade, reprodução, família, casamento, futuras gerações e o próprio conceito de vida, traz desafios permanentes, e que se renovam, para o debate sobre ética, ciência e política, bem como para a reflexão bioética que deve estar aberta às vozes ativas do campo da reprodução humana.

Cabe, portanto, aceitar e enfrentar o desenvolvimento tecnológico ao mesmo tempo, deixando de lado respostas imediatas e simplistas de aprovação ou reprovação e buscando articular uma permanente discussão sobre os desejos e poderes nas relações de gênero focalizando as estruturas jurídicas, antropológicas e psicológicas da maternidade e paternidade que respeitam a dignidade humana.

Considerações Finais

Os avanços da tecnologia têm causado grandes perplexidades na área das Ciências Sociais, notadamente na esfera jurídica que não tem conseguido dar respostas satisfatórias aos problemas surgidos em decorrência dos avanços nas ciências biológicas. É nesse contexto que se situam as novas técnicas de RHA.

O acesso universal às técnicas de RHA, assegurado juridicamente, se justificará apenas como procedimento auxiliar na procriação. Sendo assim, é recomendável que o recurso às técnicas se dê quando houver limitação à reprodução ou risco aumentado da geração de filhos com doenças genéticas. Em qualquer hipótese, a técnica de RHA deve ser uma prática excepcional e não habitual, que gere sempre mais benefícios do que riscos, inclusive para os filhos.

A proibição pura e simples, ou seja, não amparada por qualquer outro princípio superior, acaba por afrontar um direito constitucionalmente garantido.

O consentimento livre e esclarecido, inclusive quanto aos efeitos éticos, jurídicos, biológicos e econômicos de todos os envolvidos nas técnicas (beneficiários, doadores e gestantes substitutas) é requisito obrigatório. A ausência do consentimento ou a falta de menção dos referidos efeitos compromete sua eficácia jurídica, devendo sujeitar os profissionais que promovem e utilizam as técnicas à responsabilização.

Com isso, a legislação que disciplinar a utilização das técnicas de RHA deve dedicar um capítulo às clínicas, centros, serviços e profissionais que participem da aplicação das técnicas, prevendo autorização para funcionamento e fiscalização periódica.

Enfim, o valor da pessoa humana que informa todo o ordenamento estende-se pelo caminho da similitude, a todos os seres humanos, sejam nascidos, ainda em processo de desenvolvimento no útero, ou mantidos em laboratório, e o reconhecimento desse valor dita os limites jurídicos para as atividades biomédicas. A maior ou menor viabilidade em se caracterizarem uns e outros como sujeitos de direitos não implica diversificá-los na vida que representam e na dignidade que lhes é essencial. Reconhecer esse dado significa respeitar o ser humano em si mesmo durante todo o seu desenvolvimento, e para além dele próprio, no que diz respeito a seus semelhantes.

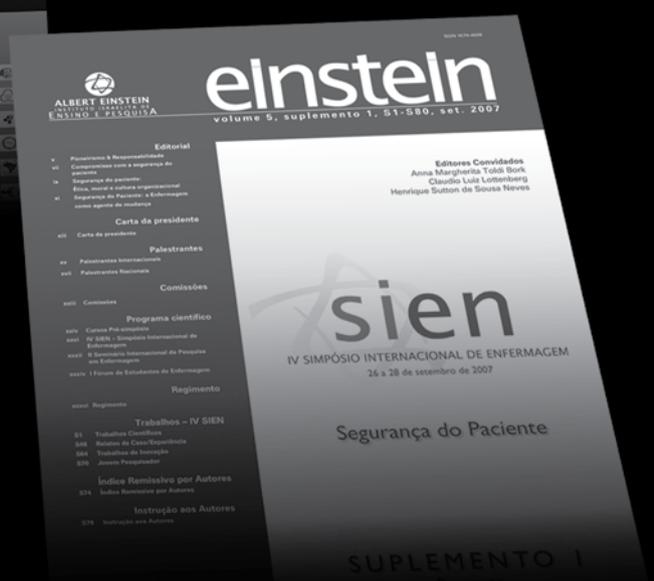
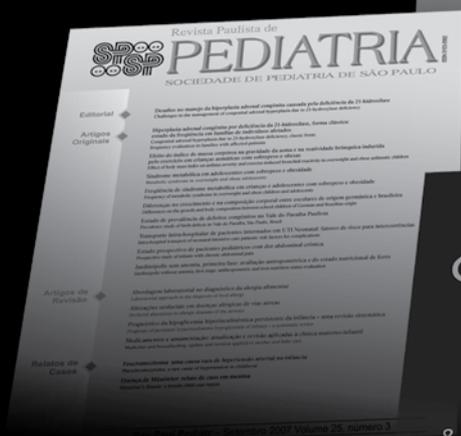
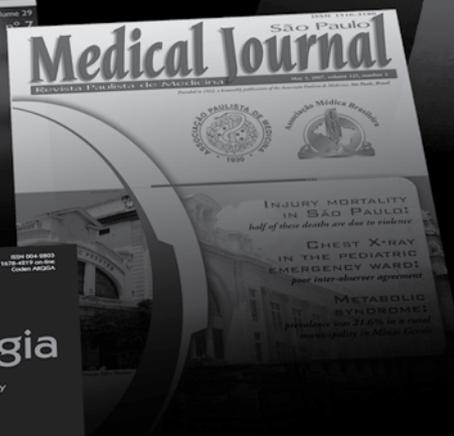
Referências bibliográficas

1. Chauí M. Convite à Filosofia. 12. ed. São Paulo: Ática; 2001.
2. Pagliarussi R. Bioética: legitimidade com participação pública. Observatório da Imprensa. 2001. Disponível em <<http://observatorio.ultimosegundo.ig.com.br/arquivo/inde01082001.htm>>. Acesso em 25/09/07.
3. Garrafa V, Costa SIF. A bioética no século XXI. 1. ed. Brasília: UNB; 2000.
4. Nakamura M. Inseminação artificial humana. São Paulo: Roca; 1994.
5. Diniz MH. Código civil por dano moral. São Paulo: Saraiva; 1998.
6. Sauwen RF, Hryniewicz S. O Direito "in vitro": da bioética ao biodireito. Rio de Janeiro: Lúmen Júris; 1997.
7. Ascensão JO. Problemas jurídicos da procriação assistida. Forense. 1994;328:69-80.
8. Meira AR. Folhas soltas: bioética e meditações. 1. ed. São Paulo: Scortecci; 2007.
9. Machado MH. Reprodução humana assistida: aspectos éticos e Jurídicos. 1. ed. Curitiba: Juruá; 2003.
10. Santos MCCL. Imaculada concepção: Nascendo in vitro e morrendo in machina. São Paulo: Acadêmica; 1993.
11. Berlinguer G, Garrafa V. Mercado humano. 2. ed. Brasília: UNB; 2001.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico para o funcionamento dos bancos de células e tecidos germinativos. Resolução RDC n. 33, de 17 de fevereiro de 2006. [acesso em 17 fev., 2009]. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>.
13. Goldim J. Bioética e reprodução humana. Porto Alegre. 1997-2007A. [acesso em 17 fev., 2009]. Disponível em <<http://www.ufrgs.br/bioetica/biorepr.htm>>.
14. Goldim J. Interinstitucional de bioética: bioética e ética na Ciência. Porto Alegre. 1997-2007B. [acesso em 17 fev., 2009]. Disponível em <<http://www.ufrgs.br/bioetica/>>.
15. Silva RP. Ética e bioética: análise bioética das técnicas de procriação assistida. Florianópolis: Terceiro Milênio; 1998.
16. Leite EO. Procriações artificiais e o direito. São Paulo: Revista dos tribunais; 1995.
17. Sá MFF, Naves BTO. Bioética, biodireito e o novo código civil de 2002. Belo Horizonte: Del Rey; 2004.
18. Pessini L, Barchifontaine CP. Problemas atuais da bioética. São Paulo: Edições Loyola; 1996.
19. Soares AMM, Piñeiro WE. Bioética e biodireito uma introdução. 1 ed. São Paulo: Edições Loyola; 2002.

Recebido em: 05/08/2008

Aprovado para publicação: 04/03/2009

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.zepelini.com.br
zepelini@zepelini.com.br
(11) 2978-6686