

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

**Relação entre hormônios dosados no plasma
seminal e a sobrevivência dos espermatozoides
ao congelamento-descongelamento**

Belo Horizonte

2011

Simone França Nery

Relação entre hormônios dosados no plasma seminal e a sobrevivência dos espermatozoides ao congelamento-descongelamento

Dissertação de mestrado em Medicina Molecular

Orientador: Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

Belo Horizonte

2011

DEDICATÓRIA

Ao Prof. Aroldo Fernando Camargos, grande mestre, que, por acreditar em mim (mais do que eu mesma), acabou por me conduzir ao caminho que me trouxe até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Aroldo, pelo enorme incentivo;

Ao Prof. Luiz Armando, pela oportunidade;

Ao Prof. Fernando, pela confiança e sábia orientação;

Aos colegas Verônica, Marco Aurélio, Hellen, Cynthia e Paulo Boy, por estarem comigo lado a lado na execução deste trabalho;

Aos colegas Rubens, Augusto, Fabiano e Juliana, pela imensa colaboração;

À equipe do Laboratório de Reprodução Humana, pelo apoio e dedicação;

À Fatinha, pela delicadeza em me presentear com a revisão ortográfica;

Aos membros da banca, pela contribuição para a concretização deste projeto;

Ao Dr. Salomão, pelo cuidado carinhoso e profissional;

À Dra. Sara, por me fazer conhecer uma outra face da medicina, e do viver;

Aos meus companheiros do GAEV, por me alimentarem de paz e sabedoria;

À D. Balbina, pelas mensagens de luz;

Aos meus amigos, por serem a minha fonte de energia;

Aos meus amores, por serem parte do que alimenta a minha paixão pela vida;

Aos meus familiares e “agregados”, pelo amoroso acolhimento;

Aos meus pais, pela vida e por me educarem para a vida com amor e sabedoria;

Aos meus irmãos, por me ajudarem sempre a encontrar um ponto de equilíbrio;

Às minhas filhas, dois anjos que caíram do céu, por me encherem de amor todos os dias;

Enfim, a todos os espíritos, de todos os planos, que participam da nossa evolução, em todos os sentidos.

“Seja qual for a tarefa confiada a você, desempenhe-a com amor
e você se sentirá feliz” (BRAHMA KUMARIS)

RESUMO

A recuperação de espermatozóides (SPZ) após criopreservação é bastante variável devido à imprevisibilidade dos efeitos deletérios causados pelo processo de congelamento e descongelamento.

O objetivo do estudo foi avaliar o valor preditivo das dosagens seminais de hormônio anti-Mulleriano (AMH) e Inibina B para recuperação espermática (sobrevivência e preservação da motilidade) após criopreservação.

As amostras seminais foram analisadas quanto à concentração (contagem em câmara de Neubauer), motilidade (microscopia ótica) e vitalidade (teste da eosina) dos SPZ. Cada amostra foi dividida em duas alíquotas: uma para as dosagens hormonais (ELISA=Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) no plasma seminal e outra para criopreservação (meio Tyb-G=Test Yolk Buffer with Gentamicine and 12% Glycerol / N₂=nitrogênio líquido). Após descongelamento (37°C / 10 minutos), a vitalidade e a motilidade dos SPZ foi novamente avaliada através das mesmas técnicas. As taxas de preservação da motilidade e de sobrevivência espermática foram comparadas com as dosagens de AMH e Inibina B no líquido seminal, em três diferentes grupos da população: Doador, Normal e Anormal. As análises foram realizadas em duplo cego. Não houve correlação entre as dosagens seminais de AMH e Inibina B e as taxas de motilidade e sobrevivência nos três grupos. Portanto, as dosagens seminais de AMH e inibina B não predizem as taxas de recuperação espermática.

Palavras-chave:

Infertilidade, sêmen, congelamento, criopreservação, recuperação espermática, inibina B, hormônio anti-Mulleriano.

ABSTRACT

The rate of total sperm retrieval after cryopreservation is very variable due to difficulty in predicting injury caused by the freezing and thawing process.

The aim of the study was to evaluate the predictive value of seminal levels of Inhibin B and Anti Mullerian hormone with regards to survival and spermatic motility after cryopreservation.

The seminal samples were analyzed for morphology using Kruger criteria, concentration (Neubauer counting chamber), motility (optical microscopy) and vitality. Each sample was divided into two aliquots of which one was analyzed immediately and the second underwent cryopreservation (Tyb-G) and thawing. In both aliquots seminal serum was analyzed by Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) for hormone levels, and sperm vitality and motility were assessed using the techniques listed above. The cryopreservation survival rate and motility maintenance rate were compared with seminal fluid levels of Inhibin B and AMH in three groups: Donor, Normal and Abnormal. Analysis was double blinded.

No correlation was found between seminal serum levels of Inhibin B and AMH and CSR or MPR. Therefore, these hormones do not appear to have value in predicting sperm retrieval after cryopreservation.

Keywords:

Infertility, semen freezing, cryopreservation, sperm recovery, inhibin B, anti-Mullerian hormone

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% = percentual

°C = graus centígrados

AMH = hormônio anti-Mulleriano

DNA = ácido desoxirribonucléico

ELISA = Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Fator Rh = fator Rhesus

FIV = fertilização in vitro

FSH = hormônio folículo estimulante

HBA = hyaluronan binding assay

ICSI = injeção intracitoplasmática de espermatozoide

IUI = inseminação intrauterina

mL = mililitro(s)

SPZ = espermatozoide(s)

TGF = Transforming Growth Factor

TM = taxa de preservação da motilidade

TRA = terapia(s) de reprodução assistida

TS = taxa de sobrevivência

Tyb-G = Test Yolk Buffer with Gentamicine and 12% Glycerol

VR = valor(es) de referência

WHO = Organização Mundial de Saúde

α = alfa

β = beta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Correlação entre dosagens hormonais e parâmetros relacionados à fertilidade masculina.....	26
Tabela 2 - Análise descritiva dos sujeitos da pesquisa e comparação dos três grupos pelo teste ANOVA.....	41
Tabela 3 - Parâmetros seminais X Recuperação espermática no total de pacientes.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Concentração de SPZ X Recuperação espermática: motilidade.....	43
Figura 2 - Concentração de SPZ X Recuperação espermática: sobrevivência.	43
Figura 3 - Dosagem de inibina B X concentração de SPZ no grupo Doador....	44
Figura 4.A - Comparação das dosagens de AMH seminal entre as amostras com alta e baixa recuperação espermática: motilidade.....	45
Figura 4.B - Comparação das dosagens de AMH seminal entre as amostras com alta e baixa recuperação espermática: sobrevivência.....	45
Figura 5.A - Comparação das dosagens de inibina B seminal entre as amostras com alta e baixa recuperação espermática: motilidade.....	46
Figura 5.B - Comparação das dosagens de inibina B seminal entre as amostras com alta e baixa recuperação espermática: sobrevivência.....	46
Figura 6.A - Comparação do valor preditivo de recuperação espermática da concentração de SPZ com o dos hormônios seminais: motilidade.....	47
Figura 6.B - Comparação do valor preditivo de recuperação espermática da concentração de SPZ com o dos hormônios seminais: sobrevivência.....	48

INDICE

1	Introdução.....	13
1.1	Reprodução humana.....	13
1.2	Infertilidade masculina.....	14
1.3	Terapia de reprodução assistida.....	14
1.4	Espermograma: valores de referência e sua relevância no diagnóstico de infertilidade masculina.....	15
1.4.1	Testes de vitalidade espermática.....	17
1.4.2	Morfologia estrita.....	18
1.4.3	Concentração.....	18
1.4.4	Contagem total.....	18
1.4.5	Motilidade total.....	19
1.4.6	Motilidade progressiva.....	19
1.4.7	Número de espermatozoides com motilidade progressiva.....	19
1.5	Bancos de sêmen.....	20
1.5.1	Banco de sêmen terapêutico.....	20
1.5.2	Banco de sêmen de doadores.....	21
1.5.3	Terapia de reprodução assistida com utilização de espermatozoides criopreservados.....	23
1.5.4	Criopreservação de espermatozoides.....	24
1.6	Marcadores de criossobrevivência espermática.....	25
1.7	Marcadores em infertilidade masculina.....	26
1.7.1	Hormônio anti-Mulleriano sérico.....	27
1.7.2	Inibina B sérica.....	27
1.7.3	Hormônio anti-Mulleriano seminal.....	28
1.7.4	Inibina B seminal.....	28

2	Justificativa.....	29
3	Objetivo.....	32
4	Método.....	33
4.1	Tipo de estudo.....	33
4.2	População estudada.....	33
4.3	Coleta, análise e processamento das amostras.....	34
4.3.1	Espermograma.....	34
4.3.2	Congelamento e descongelamento.....	35
4.3.3	Preparo do plasma seminal e dosagens hormonais.....	36
4.4	Duplo-cego.....	38
4.5	Análise estatística e cálculo amostral.....	38
5	Resultados.....	40
5.1	Descrição e comparação entre os grupos.....	40
5.2	Correlação entre parâmetros seminais e recuperação espermática.....	42
5.3	Correlação entre dosagens hormonais e parâmetros seminais.....	44
5.4	Correlação entre dosagens hormonais e recuperação espermática.....	45
6	Discussão.....	49
6.1	Características da população.....	49
6.2	Parâmetros seminais e recuperação espermática.....	50
6.3	Correlação entre dosagens hormonais e parâmetros seminais.....	50
6.4	Correlação entre dosagens hormonais e recuperação espermática.....	51
7	Conclusão.....	54
8	Referências.....	55

1 Introdução

1.1 Reprodução humana

A importância da reprodução vem sendo historicamente relatada nos diversos aspectos que compõem o espectro do ser humano: religioso (manutenção da vida); biológico (preservação da espécie); social (continuidade do grupo social); cultural (transmissão do conhecimento); político (delegação do poder); econômico (mão-de-obra laboral e intelectual); familiar (perpetuação da árvore genealógica); individual (criação de um novo ser). O impacto da infertilidade, portanto, atinge os vários níveis de abrangência do ser humano, uma vez que representa uma falha desta capacidade reprodutiva.

A ocorrência de gravidez na população geral é, em média de 20% a cada ciclo menstrual, 84% ao final de um ano, 92% em dois anos e 93% após três anos de susceptibilidade à concepção. Infertilidade conjugal é então definida como a falha de ocorrência de gravidez após um ano de atividade sexual regular, sem utilização de métodos contraceptivos [1].

As várias causas de infertilidade podem ser enquadradas em quatro grandes grupos, de acordo com a origem dos fatores etiológicos envolvidos: femininos (35%), masculinos (30%), combinados (20%) e sem causa aparente (15%). Portanto, o fator masculino contribui em aproximadamente a metade dos casos de infertilidade [1].

1.2 Infertilidade masculina

A avaliação do fator masculino da infertilidade tem como objetivo identificar os possíveis fatores etiológicos e classificar o indivíduo em grupos, visando a orientar o curso do tratamento [2]:

1. Indivíduos portadores de doenças que podem exigir atenção médica especializada;
2. Indivíduos portadores de anormalidades genéticas que poderiam ser transmitidas aos descendentes, que necessitam de aconselhamento genético prévio à instituição do tratamento;
3. Situações específicas em que a causa da infertilidade pode ser corrigida através de tratamento clínico ou cirúrgico;
4. Indivíduos cuja infertilidade não é passível de correção, mas pode ser tratada por meio de terapia de reprodução assistida (TRA);
5. Indivíduos cuja infertilidade não pode ser corrigida e não podem utilizar SPZ próprio para a TRA, mas podem se beneficiar da TRA com utilização de sêmen de doador.

1.3 Terapia de reprodução assistida

Os indivíduos que pertencem aos grupos quatro e cinco são candidatos a algum tipo de TRA: inseminação intrauterina (IIU) ou fertilização in vitro (FIV) com ou sem injeção intracitoplasmática de SPZ (ICSI).

Na IUI, os SPZ previamente selecionados e separados do plasma seminal são injetados na cavidade uterina da mulher em fase ovulatória, preferencialmente estimulada e monitorada, e a fertilização ocorre de forma natural, no trato reprodutivo feminino.

Na FIV convencional os oócitos são colocados in vitro em contato com 50 a 100 mil SPZ e a inseminação ocorre através da penetração espontânea do SPZ no oócito.

Na ICSI um único SPZ é injetado diretamente no citoplasma de cada oócito.

A escolha do tipo de TRA a ser utilizada é baseada na avaliação tanto dos fatores femininos como idade, função ovulatória e anatomia do trato reprodutivo, quanto da quantidade e qualidade dos SPZ disponíveis, que é determinada através da análise seminal.

1.4 Espermograma: valores de referência e sua relevância no diagnóstico de infertilidade masculina

A análise seminal inicial é feita através do espermograma, que avalia vários parâmetros seminais. Os valores de referência (VR) são definidos como limites mínimos considerando um intervalo de confiança de 95%:

Volume: 1.5 (1.4–1.7) mL

Concentração espermática: 15 (12–16) milhões/mL

Contagem total de SPZ: 39 (33–46) milhões/ejaculado

Motilidade total: 40 (38–42) %

Motilidade progressiva: 32 (31–34) %

Morfologia estrita normal: 4 (3–4) %

Vitalidade: 58 (55–63) %

A definição de alguns conceitos é importante para a melhor interpretação dos dados e realização da análise proposta:

- VR não representam valores mínimos absolutos que separam a população de homens em férteis e inférteis, uma vez que encontramos homens férteis com espermograma anormal e vice-versa. Os VR citados foram definidos em 2010, pela Organização Mundial de Saúde (WHO) [3] e representam os valores de percentil 50 (25-75), obtidos por meio da análise de uma população de mais de 1900 homens de oito países em três continentes, cujas parceiras engravidaram em até um ano.
- A definição ideal de sucesso da TRA seria a obtenção, como resultado final, de “um bebê saudável em casa” (gestação única, nascido vivo, sem doença). Entretanto, a maioria dos trabalhos utiliza outros parâmetros, que representam sucesso em alguma etapa do processo, anterior ao resultado final (como as taxas de fertilização e de gestação), para avaliação do sucesso das TRA.
- A definição clássica de infertilidade considera a infertilidade do casal, que engloba tanto os fatores femininos quanto os masculinos. Quando se fala em infertilidade masculina, refere-se exclusivamente aos fatores masculinos de infertilidade.
- A qualidade da amostra seminal seria mais bem definida pela capacidade dos SPZ de realizar todas as etapas que lhe competem no processo de reprodução para a obtenção do referido “bebê saudável em casa”. Para isso, seria necessária a avaliação das várias características dos SPZ necessárias para a realização deste processo: integridade genética e morfológica, motilidade, capacidade de realizar reação

acrossômica, penetrar e fecundar o oócito. Diversos são os testes disponíveis para a avaliação de cada uma dessas características, todos com vantagens, limitações e indicações específicas [4]. Na prática clínica, os três parâmetros mais utilizados rotineiramente para avaliação da qualidade da amostra seminal são obtidos através do espermograma: a morfologia, a concentração e a motilidade espermáticas.

Na análise dos dados fornecidos pelo espermograma, considera-se que o valor preditivo para infertilidade é proporcional ao número de parâmetros seminais alterados: para um, dois ou três parâmetros alterados, a probabilidade de infertilidade seria de duas a três, cinco a sete e 16 vezes maior, respectivamente [2].

Entretanto, dados relevantes podem ser obtidos por meio da avaliação individual de cada parâmetro.

1.4.1 Testes de vitalidade espermática

Os testes de vitalidade espermática têm como objetivo diferenciar os SPZ viáveis dos mortos. O resultado é dado em porcentagem de SPZ viáveis. A WHO preconiza dois testes de vitalidade: O teste da eosina determina a porcentagem de SPZ viáveis dentre os SPZ imóveis de uma amostra e está indicado quando mais da metade dos SPZ da amostra são imóveis. O teste hiposmótico determina a porcentagem de SPZ viáveis dentre o total de SPZ da amostra. Este último pode ser utilizado para identificar SPZ viáveis quando, no momento da realização da ICSI, os SPZ da amostra são imóveis [5].

1.4.2 Morfologia estrita

Na avaliação da morfologia estrita, quando se considera um ponto de corte de 5% de SPZ normais, a sensibilidade é de 19% e a especificidade de 94% para identificação de infertilidade [6]. Estes dados demonstram que, ao adotar o VR de 4% para morfologia estrita, recomendado pela WHO em 2010, este passa a ser um bom exame de confirmação diagnóstica (especificidade alta) apesar de não ter valor como exame de screening (sensibilidade baixa).

1.4.3 Concentração

A chance de gravidez espontânea é maior quando a concentração espermática é maior que 40-50 milhões de SPZ/ml e o risco de infertilidade aumenta em aproximadamente cinco vezes, quando esta concentração é menor que 13.5 milhões/ml [2], valor bem próximo do VR de 15% da WHO.

1.4.4 Contagem total

A contagem total de SPZ é o produto da multiplicação da concentração de SPZ pelo volume da amostra seminal. A determinação da contagem total é importante para o cálculo do número de SPZ com motilidade progressiva, ou seja, de SPZ ativos. Interessante notar que o VR de 39 milhões, definido pela WHO não corresponde à simples multiplicação dos VR de concentração (15 milhões de SPZ/mL) e volume (1.5 ml), que daria como produto o valor de 22.5 milhões de SPZ,

uma vez que esse valor não foi obtido por meio de cálculo, mas da análise de dados populacionais reais [3].

1.4.5 Motilidade total

Apesar de alguns estudos correlacionarem a chance de gravidez espontânea a pontos de corte mais elevados, como 60% [6], outros, que definem pontos de corte mais baixos como o de 45% (com percentil 10 = 28% de motilidade total) [7], corroboram o VR de 40% definido pela WHO.

1.4.6 Motilidade progressiva

A chance de infertilidade masculina aumenta aproximadamente cinco vezes (OR 5.6, 95% CI 3.5–8.3), quando a motilidade progressiva é menor que 32% [6], coincidente com o VR da WHO para este parâmetro.

1.4.7 Número de espermatozóides com motilidade progressiva

O número de SPZ com motilidade progressiva de uma amostra é calculado através do produto do número total de SPZ da amostra e da porcentagem de SPZ com motilidade progressiva. Este parâmetro é de extrema importância, pois fornece uma estimativa do número absoluto de SPZ ativos do ejaculado que, em casos de IIU para tratamento de fator masculino de infertilidade, tem correlação com a taxa de sucesso. Nestes casos, os melhores resultados são obtidos quando o número de

SPZ com motilidade progressiva inseminado é maior que 10 milhões sendo que, quando este número é menor que um milhão, as chances de sucesso são remotas. Quando são utilizados SPZ criopreservados na IIU, este número deve ser, idealmente, maior que 20 milhões [2].

1.5 Bancos de sêmen

A origem dos bancos de sêmen remonta da segunda metade do século XVIII, quando se cogitou a possibilidade de homens mortos em batalhas terem herdeiros legais a partir da utilização do sêmen congelado e estocado em casa, mas foi apenas dois séculos depois que estes se estabeleceram, após a primeira gravidez humana bem sucedida com o uso de SPZ criopreservado em 1954 [8].

Atualmente, SPZ criopreservados são rotineiramente utilizados em procedimentos de reprodução assistida.

Os bancos de sêmen podem armazenar SPZ tanto para utilização própria (homóloga) quanto para utilização em terceiros (heteróloga), por meio da criopreservação de SPZ próprios ou de doadores, respectivamente.

1.5.1 Banco de sêmen terapêutico

Armazenamento de SPZ para utilização homóloga, com as seguintes indicações:

- Pré-tratamentos gonadotóxicos (quimioterapia e/ou radioterapia): as células germinativas são muito vulneráveis à terapia citotóxica, uma vez que estão em constante multiplicação [9]. O comprometimento da

espermatogênese pela terapia citotóxica resulta em alterações não apenas no número, mas também na motilidade, morfologia e integridade do DNA do espermatozóide. Portanto, idealmente, a coleta dos SPZ deve ocorrer antes do início do tratamento [10].

- Pós-punção de epidídimo / biópsia testicular: Em casos de azoospermia, os SPZ recuperados do epidídimo ou testículo, tanto em procedimentos diagnósticos quanto terapêuticos, poderão ser criopreservados para posterior utilização em TRA. Para amostras com contagem e/ou motilidade espermáticas reduzidas podem ser utilizadas técnicas especiais de criopreservação de pequeno número de SPZ [11].
- Pós-recuperação de SPZ na urina: Em pacientes portadores de ejaculação retrógrada cuja obtenção de SPZ do ejaculado não é viável, estes podem ser recuperados através de pesquisa de SPZ na urina pós-ejaculação e utilizados a fresco em TRA ou criopreservados para utilização posterior [12].
- Pré-vasectomia: A vasectomia é um método de esterilidade masculina. No entanto, homens vasectomizados que apresentam o desejo de ter mais filhos podem recorrer à reversão cirúrgica da mesma. Durante o procedimento, podem-se obter SPZ para criopreservação e posterior utilização em TRA, considerando-se a possibilidade de falha da reversão. Entretanto, o momento ideal para criopreservação dos SPZ é antes da realização da vasectomia, quando várias amostras de sêmen fresco podem ser obtidas por masturbação.

1.5.2 Banco de sêmen de doadores

Armazenamento de SPZ para utilização heteróloga, com as seguintes indicações:

- Infertilidade por fator masculino grave: Casais com infertilidade por fator masculino grave que recorrem a TRA quase sempre são candidatos a FIV/ICSI, uma vez que, nestes casos, os SPZ recuperados geralmente estão em número reduzido e com baixa motilidade. Algumas vezes não se consegue obter SPZ próprios para TRA. Estes casais podem se beneficiar da TRA com utilização de sêmen de doador. Neste caso, se não houver fator feminino que contraindique a IIU, esta técnica (mais simples, de menor custo e com menos efeitos colaterais) poderá ser utilizada com amostra de sêmen de doador de boa qualidade.
- Casos específicos de isoimunização: Em algumas mulheres previamente imunizadas contra o fator Rhesus (Rh) o risco de doença hemolítica grave e morte do concepto Rh positivo é tão alto que pode haver indicação de utilização de sêmen de doador Rh negativo quando o parceiro for do grupo sanguíneo Rh positivo.
- Algumas doenças hereditárias: Quando o homem é portador de alterações genéticas que são transmitidas ao concepto através do SPZ, o casal pode optar pela utilização de sêmen de doador, uma vez que este passa por uma rigorosa triagem, que elimina os candidatos portadores ou considerados de risco para doenças genéticas.
- Casais homoafetivos femininos: Casais homoafetivos femininos que desejam filhos podem recorrer à TRA com utilização de sêmen de doador em uma das parceiras.

1.5.3 Terapia de reprodução assistida com utilização de espermatozoides criopreservados

A avaliação das taxas de gravidez em TRA com uso de sêmen criopreservado de pacientes com câncer tem demonstrado índices de sucesso satisfatórios [13].

Quando se realiza ICSI, parece não haver diferença significativa entre SPZ frescos e criopreservados [14]. Ao se comparar os resultados da ICSI com uso de SPZ testicular móvel/imóvel, fresco/congelado, podem ser encontradas taxas de fertilização semelhantes [15]. Quando se recuperam SPZ móveis por biópsia testicular, boas taxas de fertilização e gravidez podem ser obtidas, sem diferença quanto à utilização de SPZ frescos ou congelados [16].

Quando se realiza IIU com SPZ criopreservados, a probabilidade de gravidez pode ser de até três vezes menor que com SPZ frescos [14]. As chances de sucesso da IIU com SPZ criopreservados são maiores quando o número de SPZ móveis inseminado é maior que 20 milhões [2]. Portanto, após o descongelamento, o número de SPZ móveis da amostra deve ser determinado e, se necessário, outras alíquotas devem ser descongeladas, com o objetivo de se obter número suficiente de SPZ móveis para serem inseminados.

As amostras de sêmen doadas, habitualmente, são divididas em alíquotas que são criopreservadas para posterior utilização. A qualidade destas alíquotas no momento de sua utilização é muito variável, uma vez que os danos causados aos SPZ durante os processos de congelamento e descongelamento são imprevisíveis. Foi demonstrada uma variação de até 10 vezes entre o número de SPZ móveis das alíquotas descongeladas de doadores [17].

1.5.4 Criopreservação de espermatozoides

As amostras congeladas podem ser criopreservadas por tempo indeterminado. Como o processo de congelamento e descongelamento causa danos aos SPZ, a possibilidade de não haver recuperação de SPZ viáveis deve ser considerada, principalmente em casos de amostras com contagem e/ou motilidade espermáticas muito reduzidas [18].

Com o objetivo de minimizar os danos causados aos SPZ, vários protocolos de congelamento e descongelamento têm sido propostos [19], dentre eles:

- Congelamento rápido: a amostra é colocada na fase de vapor por 10 minutos, em seguida é imersa em Nitrogênio líquido a -196°C .
- Congelamento lento: a amostra é gradualmente resfriada utilizando-se uma máquina de congelamento automática programável, a uma velocidade de resfriamento de 1 a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
- Descongelamento rápido: 37°C por 5-10 min.
- Descongelamento lento: temperatura ambiente por 30-60 minutos.

Para redução do dano celular e obtenção de melhores taxas de recuperação espermática, o descongelamento deve ser realizado levando-se em consideração o tipo de congelamento, ou seja, se foi realizado congelamento rápido, deve-se optar pelo descongelamento rápido e vice-versa. Apesar disso, a taxa de recuperação espermática após o descongelamento encontra-se, em média, em torno dos 50% [18] e é extremamente variável entre as amostras [20].

Essa taxa média de 50% de recuperação espermática é, então, utilizada como critério de seleção das amostras doadas aos bancos de sêmen apesar da sua baixa precisão e exatidão, uma vez que o valor preditivo dos parâmetros seminais da

amostra fresca para recuperação espermática após criopreservação é controverso [21], [22].

1.6 Marcadores de criossobrevivência espermática

Diante do impacto da qualidade da amostra seminal nos resultados da TRA, em especial das amostras criopreservadas, na prática do funcionamento dos bancos de sêmen, uma importante pergunta, para a qual ainda não se tem uma resposta satisfatória é: “Quantos SPZ móveis serão recuperados após o descongelamento desta alíquota?” A resposta a esta pergunta seria de grande utilidade na tomada de decisões, com as quais os responsáveis pelo congelamento e pela liberação das amostras frequentemente se deparam no dia a dia:

- No momento do congelamento: “Esta amostra deve ou não ser criopreservada?”, “Quantas amostras devem ser coletadas?”, “Em quantas alíquotas esta amostra deve ser dividida?”, e, principalmente, “Qual será o destino de utilização desta alíquota: IIU ou FIV/ICSI?”.
- No momento do descongelamento: “Para a realização deste procedimento, quais amostras poderiam ser utilizadas?”, “Das amostras selecionadas, quantas alíquotas deveriam ser descongeladas?”.

Portanto, justificada a importância da identificação de marcadores que forneçam uma estimativa mais precisa e exata da recuperação espermática de uma amostra individual, surge uma nova pergunta: “Quais seriam os possíveis candidatos?”

1.7 Marcadores em infertilidade masculina

O AMH e as inibinas são membros da família TGF β (Transforming Growth Factor, beta), uma superfamília de fatores de crescimento e diferenciação. Suas moléculas têm uma estrutura semelhante (são glicoproteínas cujos peptídeos são ligados por pontes dissulfeto).

O valor da dosagem sérica e seminal destes hormônios na avaliação da infertilidade tem sido progressivamente demonstrado na literatura [23] (tabela 1).

Tabela 1 - Correlação entre dosagens hormonais e parâmetros relacionados à fertilidade masculina.

Material biológico	Sangue		Sêmen	
	AMH	Inibina B	AMH	Inibina B
Diferenciação e função das células de Sertoli	(+)	(+)		
Função testicular (número de espermatogônias)				(+)
Espermatogênese (número de SPZ produzidos)	NC	(+)		(+)
Concentração e contagem de SPZ no sêmen		(+)	?	
Motilidade espermática			?	
Morfologia espermática		?	(+)	
Azoospermia obstrutiva		NC	(-)	(-)
Diferenciação entre azoospermia obstrutiva e não obstrutiva				NC
Positividade da biópsia testicular em azoospermia não obstrutiva		NC	NC	NC
Testosterona sérica			(+)	
Hormônio folículo estimulante (FSH) sérico			(-)	
Ação do FSH na função testicular	(+)			

(+) = correlação positiva / (-) = correlação negativa / NC = não há correlação / ? = correlação controversa

1.7.1 Hormônio anti-Mulleriano sérico

O AMH sérico é um dos marcadores específicos de diferenciação, função e tumor das células de Sertoli [23]. Está relacionado tanto à proliferação destas células, quanto à atividade da síntese proteica em resposta ao FSH. Na avaliação da função testicular em homens em fase pré-puberal, o AMH sérico pode ser usado como marcador da ação do FSH [24]. Entretanto, não é considerado um bom marcador de espermatogênese [25].

1.7.2 Inibina B sérica

A inibina B sérica é um dos marcadores específicos de diferenciação, função e tumor das células de Sertoli [23].

A dosagem da inibina B sérica tem correlação positiva com marcadores clássicos de espermatogênese, como concentração espermática e contagem total de SPZ no sêmen [25]. É também um bom preditor de espermatogênese pós-varicocelelectomia [26].

A dosagem sérica de Inibina B em homens com azoospermia obstrutiva é semelhante à de homens férteis [23].

Na predição da positividade da biópsia testicular em pacientes com azoospermia não obstrutiva, seu valor é controverso na literatura. Entretanto, metanálise recente chegou à conclusão de que a Inibina B sérica, nesses casos, não tem validade como marcador individual [25].

A correlação da inibina B sérica com a morfologia espermática ainda é controversa [27].

1.7.3 Hormônio anti-Mulleriano seminal

O AMH pode ser dosado no plasma seminal da maioria dos homens férteis, em níveis mais elevados que os do plasma sanguíneo. Como o AMH do plasma seminal tem origem testicular, o mesmo não é encontrado no plasma seminal em casos de azoospermia obstrutiva [28]. Em casos de azoospermia não obstrutiva, o AMH seminal foi cogitado como possível marcador de presença de espermatogênese persistente. Entretanto, seu valor preditivo da positividade da biópsia testicular não foi confirmado em estudos subsequentes [29], [30]. A dosagem de AMH seminal é proporcional à testosterona sérica e à morfologia espermática, e inversamente proporcional ao FSH sérico [24]. Em relação à concentração e à motilidade a literatura é controversa [24], [31], [32].

1.7.4 Inibina B seminal

Nos casos de azoospermia obstrutiva, a concentração de Inibina B no plasma seminal está significativamente reduzida [33]. A dosagem seminal de Inibina B parece não ter utilidade na diferenciação entre homens com azoospermia obstrutiva e não obstrutiva [34]. O valor preditivo da inibina B para positividade da biópsia testicular em homens com azoospermia não obstrutiva era controverso na literatura, mas evidências recentes refutam esta hipótese [30]. A dosagem seminal de Inibina B tem correlação direta com a função dos testículos (número de espermatogônias na biópsia testicular) e espermatogênese (número de SPZ produzidos), podendo ser utilizada como marcador da função testicular e espermatogênese [33].

2 Justificativa

O fator masculino contribui em aproximadamente metade dos casos de infertilidade conjugal [1]. Quando a causa da infertilidade não é passível de correção por meio de tratamento clínico ou cirúrgico, pode ser indicada a TRA. A escolha do tipo de TRA a ser utilizada é baseada na avaliação tanto dos fatores femininos, quanto da quantidade e qualidade dos SPZ disponíveis. Esta é determinada através da análise seminal cujos três parâmetros mais utilizados rotineiramente são: morfologia, concentração e motilidade espermáticas.

Em situações específicas, como tratamentos gonadotóxicos, punção de epidídimo / biópsia testicular, ejaculação retrógrada e vasectomia, os SPZ podem ser criopreservados para posterior utilização homóloga [1]. Indivíduos que não podem utilizar SPZ próprio para a TRA podem se beneficiar da TRA com utilização de sêmen de doador.

Gradualmente, após a ejaculação, os SPZ perdem motilidade e vitalidade. Em SPZ criopreservados, esta perda ocorre mais rapidamente devido aos danos causados aos SPZ durante o processo de criopreservação, mesmo em amostras de boa qualidade como as de doadores [2].

Quando se realiza IIU com SPZ criopreservados, a probabilidade de gravidez pode ser três vezes menor que com o uso de SPZ frescos [14]. Portanto, para melhores chances de sucesso da IIU com SPZ criopreservados o número de SPZ móveis inseminado deve ser, se possível, maior que 20 milhões [2]. Quando se realiza ICSI, parece não haver diferença significativa entre SPZ frescos e criopreservados [14].

A qualidade das alíquotas criopreservadas, quando analisada através do número de SPZ móveis das alíquotas descongeladas, pode variar em até 10 vezes [17]. A utilização dos parâmetros seminais de amostras frescas como preditores de criossobrevivência espermática foram bastante estudados nas décadas de 80 e 90 [21], [22], [35], [36], [37], [38], [39]. Devido à grande controvérsia em relação ao tema, utiliza-se, então, a taxa média de recuperação espermática após o descongelamento de 50% [18], apesar da sua baixa precisão e exatidão [20].

Diante do impacto da qualidade da amostra seminal nos resultados da TRA, em especial das amostras criopreservadas, novos marcadores deveriam, então, ser utilizados para uma estimativa mais precisa e exata da recuperação espermática após a criopreservação. Na última década outros marcadores têm sido estudados, alguns com resultados promissores, como o teste de fluidez da membrana plasmática [40], outros nem tanto, como o HBA (hyaluronan binding assay) [41]. Como, neste caso, como o sêmen é o material disponível, a identificação de bons marcadores seminais seria bastante relevante.

O AMH, também conhecido como Substância Inibitória Mulleriana, é uma glicoproteína homodimérica. As cadeias constitutivas do AMH têm uma forte homologia com as cadeias α (alfa) e β das inibinas. No embrião do sexo masculino, o AMH é responsável pela regressão do ducto Mulleriano. Sua produção não é interrompida após o período fetal, mantendo-se em níveis séricos elevados até a puberdade, com conseqüente aumento da sua concentração no plasma seminal e redução dos níveis séricos [25], [42]. No homem adulto, é produzido exclusivamente pelas células de Sertoli do testículo, em resposta ao estímulo do FSH [24]. Os principais fatores reguladores da produção de AMH são os andrógenos, as gonadotrofinas e o grau de diferenciação das células germinativas adjacentes às

células de Sertoli, mas os mecanismos da ação regulatória desses fatores precisam ser elucidados [23].

As inibinas são glicoproteínas heterodiméricas compostas por uma subunidade α e uma subunidade β . São moléculas multifuncionais: estão envolvidas no controle da secreção do FSH (feedback negativo), são reguladoras parácrinas nos testículos e ovários e podem ser utilizadas como marcadoras de infertilidade. São conhecidas duas formas ativas de inibinas: Inibina A e B, que diferem entre si pela subunidade β : β_A e β_B , respectivamente. O desenvolvimento de imunoenaios para identificação das subunidades da inibina, no início da década de 90, tornou possível a dosagem específica dos dímeros da inibina: A e B [43]. A partir de então, vários estudos demonstraram uma relação positiva entre a dosagem sérica da Inibina B e a espermatogênese [44], [45], [46]. A Inibina B é produzida pelas células de Sertoli dos testículos possivelmente com a participação de células de Leydig na produção das duas subunidades e das células germinativas (espermatócitos e espermatídes) que parecem produzir apenas a subunidade β_B . A Inibina B é, então, liberada pelas células de Sertoli nos túbulos seminíferos fazendo parte do conteúdo do plasma seminal. A inibina A é indetectável nos indivíduos do sexo masculino, tanto no plasma, quanto no sêmen [23].

O presente estudo visa a testar a hipótese de que os hormônios AMH e Inibina B podem ter valor preditivo para a recuperação espermática após a criopreservação, uma vez que a função das células de Sertoli parece estar relacionada não só à produção, mas também à qualidade do SPZ produzido [28], [47].

3 Objetivo

Avaliar o valor preditivo das dosagens seminais de AMH e Inibina B para a preservação da motilidade e sobrevivência dos SPZ após criopreservação.

4 Método

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de estudo do tipo avaliação de acurácia diagnóstica, em coorte de validação com bom padrão de referência, realizado em um único centro clínico: nível de evidência 1B.

Fatores em estudo: concentrações de AMH e Inibina B no líquido seminal.

Desfechos principais: Taxa de preservação da motilidade (TM) e taxa de sobrevivência espermática (TS)

- Positivo = TM e TS \geq 50%
- Negativo = TM e TS $<$ 50%

4.2 População estudada

Parceiros masculinos de casais em propedêutica para infertilidade

Critério de inclusão:

Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Critérios de exclusão:

- Morfologia estrita anormal ($<$ 4% de EPZ normais);
- Volume seminal $<$ 2ml;
- Azoospermia ou contagem total $<$ 1 milhão de SPZ;
- Motilidade progressiva = 0%;

Grupos estudados:

Para evitar a interferência de fatores de confusão relativos à qualidade da amostra pré-congelamento, a população total foi estratificada da seguinte forma:

- Grupo Doador: espermograma normal, com número de SPZ com motilidade progressiva ≥ 125 milhões.
- Grupo Normal: espermograma normal, com número de SPZ com motilidade progressiva < 125 milhões.
- Grupo Anormal: espermograma anormal.

Para essa estratificação, foram usados os seguintes valores de referência:

- Concentração: ≥ 15 milhões SPZ/ml
- Contagem total: ≥ 39 milhões SPZ
- Motilidade progressiva: $\geq 32\%$

4.3 Coleta, análise e processamento das amostras

A coleta das amostras de sêmen foi realizada entre 07:30h e 09:30h, pelos próprios pacientes, por masturbação, em frasco descartável e estéril, no laboratório onde foi realizado o experimento, entre 12/08/10 e 08/07/11.

4.3.1 Espermograma

O espermograma foi realizado conforme protocolo da WHO [4], na primeira hora após a coleta. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Morfologia estrita: confecção de esfregaço em lâmina e fixação com metanol por cinco minutos, seguida por coloração em hematoxilina por 10 minutos, secagem em meio ambiente e avaliação sob microscopia óptica em objetiva de imersão com óleo mineral, com aumento de 1000X,
- Concentração: contagem em Câmara de Neubauer após diluição da amostra em água destilada, sob microscopia ótica com aumento de 400X
- Motilidade: exame direto de gota de sêmen fresco entre lâmina e lamínula, sob microscopia óptica com aumento de 400X
- Teste de vitalidade espermática: exame direto de gota de sêmen fresco diluída na proporção 1:1 com solução de eosina a 0,5%, entre lâmina e lamínula, sob microscopia óptica, com aumento de 400X

4.3.2 Congelamento e descongelamento

O tempo entre a coleta e o congelamento variou de 30 minutos a 1 hora.

O congelamento do sêmen foi realizado conforme protocolo definido [48].

Os frascos de crioprotetor Test Yolk Buffer with Gentamicine and 12% Glycerol (TyB-G) da Irvine Scientific, previamente armazenado em freezer a 20°C negativos, foram descongelado em temperatura ambiente por 30 minutos;

Um volume de 0,5ml de crioprotetor foi adicionado gota a gota com agulha e seringa ao mesmo volume de sêmen fresco, sob homogeneização constante com pipeta de Pasteur, em criotubos previamente identificados;

Os criotubos foram fixados em racks posicionadas horizontalmente sobre o vapor do nitrogênio líquido em caixa de isopor, a 10 cm da superfície líquida, por 10 minutos e, em seguida mergulhados no nitrogênio líquido antes de serem transferidos para o bujão de nitrogênio líquido a -196°C .

Descongelamento do sêmen: 37°C por 10 minutos [8].

Após descongelamento, a motilidade e a vitalidade espermáticas foram novamente avaliadas, conforme os mesmos protocolos utilizados antes do congelamento.

4.3.3 Preparo do plasma seminal e dosagens hormonais

O preparo do plasma seminal foi realizado conforme o seguinte protocolo: Uma alíquota de 1,0 a 1,5 ml de cada amostra de sêmen foi centrifugada em tubo de ependof de 1,5 ml, em microcentrífuga a 230 rotações por minuto, por 15 minutos;

O plasma seminal sobrenadante foi aliqotado e armazenado em freezer a 80°C negativos, para as dosagens hormonais.

As dosagens de AMH e inibina B foram realizadas por método ELISA utilizando kits comerciais fornecidos pela DSL-Diagnostic Systems Laboratories (www.dslabs.com):

Padrões, controles e amostras de soro foram depositados em placa de ELISA revestida com anticorpo primário;

Após período de incubação e lavagem, foi adicionado outro anticorpo primário marcado com biotina;

Após segunda incubação e lavagem, foi adicionada streptavidina-peroxidase de rábano (HRP);

Após terceira incubação e lavagem foi adicionado o substrato tetrametilbenzidina (TMB) para revelação da reação de peroxidase, seguida por adição de solução ácida de interrupção da reação;

A determinação do grau de reposição enzimática do substrato foi realizada por medida de absorbância em duplo comprimento de onda a 450 e 620nm.

A absorbância medida é diretamente proporcional à concentração de hormônio presente. Um conjunto de padrões foi usado para traçar a curva padrão de absorbância versus concentração e, a partir dessa curva, a concentração de hormônio nas amostras foi calculada.

Características analíticas da dosagem do AMH:

- Limite de detecção = 0.08ng/ml;
- Coeficiente de variação intraensaio = 5.4%;
- Coeficiente de variação interensaio = 5.6%;
- Especificidade do anticorpo primário = específico para AMH (ausência de reação cruzada com Inibina A, ativina A, FSH e LH)

Características analíticas da dosagem de Inibina B:

- Limite de detecção = 2.6pg/ml;
- Coeficiente de variação intraensaio = 3.82%;
- Coeficiente de variação interensaio = 5.64%;
- Especificidade do anticorpo primário = específico para inibina B (ausência de reação cruzada com Inibina A, ativina A, ativina B, ativina AB, FSH, LH e folistatina)

4.4 Duplo-cego

As amostras de sêmen foram identificadas numericamente de forma sequencial (1, 2, etc.), para realização do espermograma. Após centrifugação, as alíquotas de plasma seminal foram identificadas de forma aleatória (sorteio de números de 1 a 200) por um colaborador (que não tem conhecimento dos resultados dos exames), que guardou em sigilo as informações referentes à identificação da amostra de sêmen correspondente. As dosagens de AMH e Inibina B foram realizadas sem o conhecimento da identificação das amostras e sem o conhecimento do grupo ao qual pertencem. Somente após o registro das dosagens, foi feita a correspondência dos resultados para análise.

4.5 Análise estatística e cálculo amostral

Todas as análises foram feitas internamente nos três grupos da população. Em cada grupo, foram formados subgrupos de pacientes definidos pelo desfecho principal: recuperação espermática com alta taxa de sobrevivência ($TS \geq 50\%$) vs. recuperação espermática com baixa taxa de sobrevivência ($TS < 50\%$) e recuperação espermática com alta taxa de motilidade ($TM \geq 50\%$) vs. recuperação espermática com baixa taxa de motilidade ($TM < 50\%$). Os subgrupos foram comparados quanto às concentrações de AMH e inibina B no plasma seminal. Os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov e, quando confirmada a distribuição normal, os resultados foram expressos como média e desvio-padrão e comparados pelo teste t de Student para amostras independentes. Quando não

houve distribuição normal, os dados foram expressos como mediana e comparados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Para identificar uma diferença de pelo menos 280 pmol/l no AMH e 330 pg/ml na inibina B seminal entre os dois grupos, com poder estatístico de 80% e nível de confiança de 95%, seriam necessários no mínimo 10 pacientes por subgrupo.

Também avaliamos a possível correlação linear entre as TM e TS e as dosagens hormonais seminais. Para tanto, foram necessários 34 pacientes para se determinar o coeficiente de correlação com poder estatístico de 80% e confiança de 95%, com nível de significância de $p < 0.05$.

5 Resultados

5.1 Descrição e comparação entre os grupos

Não houve diferença entre os grupos no que se refere às características dos pacientes e ao volume e tempo de congelamento das amostras. Os parâmetros seminais das amostras entre os grupos são diferentes, uma vez que o critério de divisão entre grupos foi exatamente a qualidade da amostra. A recuperação espermática tanto em termos de sobrevivência, quanto de preservação da motilidade, foi diferente entre os grupos e proporcional à qualidade da amostra (tabela 1).

Tabela 2 - Análise descritiva dos pacientes e comparação dos três grupos pelo teste ANOVA.

	Doador N=55	Normal N=49	Anormal N=49	Total N=153	ANOVA p
Sujeitos					
Idade (anos)	37±7	36±6	36±8	36±7	0.597
Febre (%)	5	4	6	5	0.900
Abstinência (dias)	5(5-5)	5(5-5)	5(5-5)	5(5-5)	0.612
Amostra					
Tempo congelado (dias)	110(52-115)	105±71	110±70	117(49-167)	0.930
Volume (ml)	4.2±1.6	3.6±1.1	3.6±1.1	3.5(2.8-4.4)	0.130
Parâmetros seminais					
Concentração (SPZ/ml)	123±74	37±20	12(5-60)	45(19-98)	0.000
Contagem (n° SPZ)	483±279	127±61	42(16-203)	173(69-335)	0.000
Motilidade Total Pré-congelamento (%)	70(60-70)	66±10	40(40-50)	60(50-70)	0.000
Motilidade Total Pós-descongelamento (%)	38±17	31±17	10(5-25)	30(15-40)	0.000
Motilidade Progressiva Pré-congelamento (%)	56±12	54±12	30(20-40)	50(32-60)	0.000
Motilidade Progressiva Pós-descongelamento (%)	30±17	23±16	5(3-15)	20(5-32)	0.000
Vitalidade Pré-congelamento (%)	59±14	59±13	51±15	56±14	0.010
Vitalidade Pós-descongelamento (%)	28±10	23±9	22±8	25±9	0.011
Hormônios seminais					
AMH	0.53(0.26-1.55)	0.53(0.20-1.69)	0.40(0.18-0.93)	0.49(0.22-1.55)	0.659
Inibina B	0.33(0.23-1.35)	0.34(0.22-0.85)	0.34(0.21-0.89)	0.34(0.23-0.90)	0.734
Recuperação espermática					
Motilidade (%)	55±34	43±29	37±36	45±34	0.019
Sobrevivência (%)	64±16	54±19	49±28	56±22	0.020

5.2 Correlação entre parâmetros seminais e recuperação espermática

Os parâmetros seminais concentração, contagem e vitalidade tiveram correlação positiva com a recuperação espermática em termos de motilidade. Os parâmetros seminais concentração, contagem, motilidade progressiva e vitalidade tiveram correlação positiva com a recuperação espermática em termos de vitalidade. Entretanto, todas as correlações foram fracas, com $R < 0.7$ (tabela 2).

Tabela 3 - Parâmetros seminais X Recuperação espermática no total de pacientes.

	Recuperação espermática	
	Motilidade	Sobrevivência
Concentração	R=0.444**	R=0.416**
Contagem	R=0.375**	R=0.360**
Motilidade Total	R= -0.13	R=0.109
Motilidade Progressiva	R=0.024	R=0.175*
Vitalidade	R=0.356**	R=0.249**

* correlação ao nível de 0.05

** correlação ao nível de 0.01

Destes, o parâmetro seminal que teve melhor correlação com a recuperação espermática foi concentração de SPZ da amostra (figuras 1 e 2)

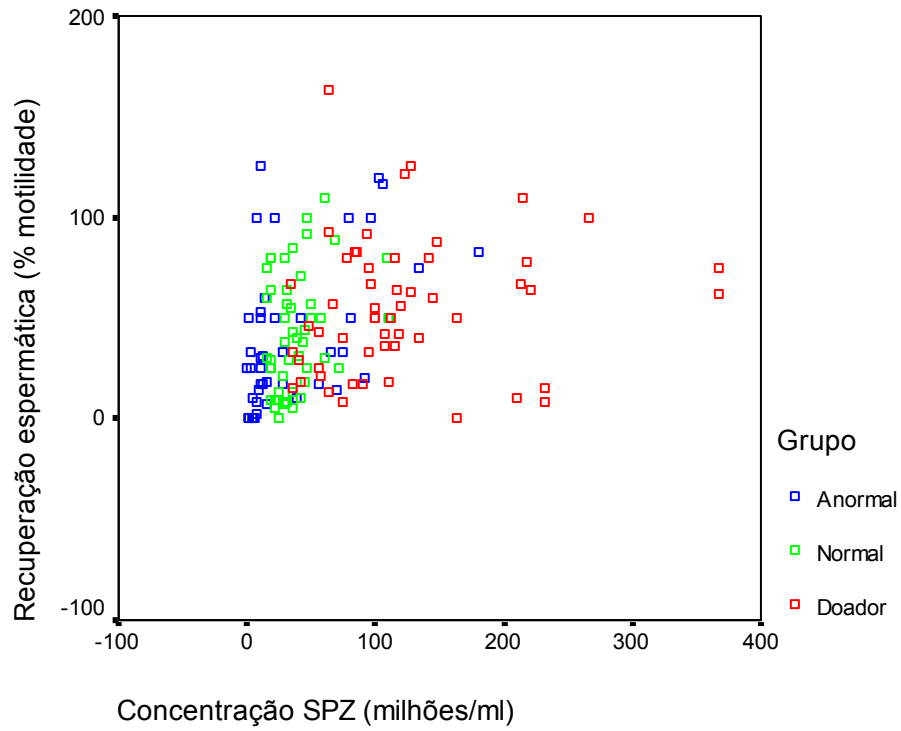


Figura 1 - Concentração de SPZ X Recuperação espermática: motilidade

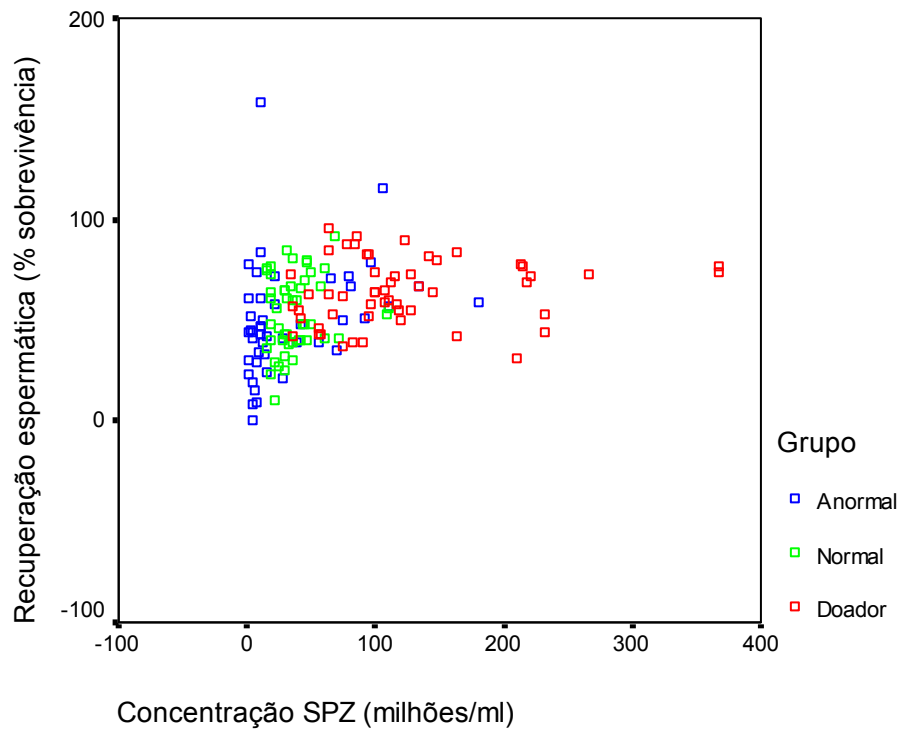


Figura 2 - Concentração de SPZ X Recuperação espermática: sobrevivência

5.3 Correlação entre dosagens hormonais e parâmetros seminais

As dosagens seminais de AMH não se correlacionaram com nenhum dos parâmetros seminais avaliados em nenhum dos grupos.

A dosagem seminal de inibina B teve fraca correlação positiva ($R=0.266$ e $p<0.05$) com a concentração de SPZ apenas no grupo Doador (figura 3). Não foram encontradas outras correlações entre dosagem seminal de inibina B e parâmetros seminais em nenhum dos grupos.

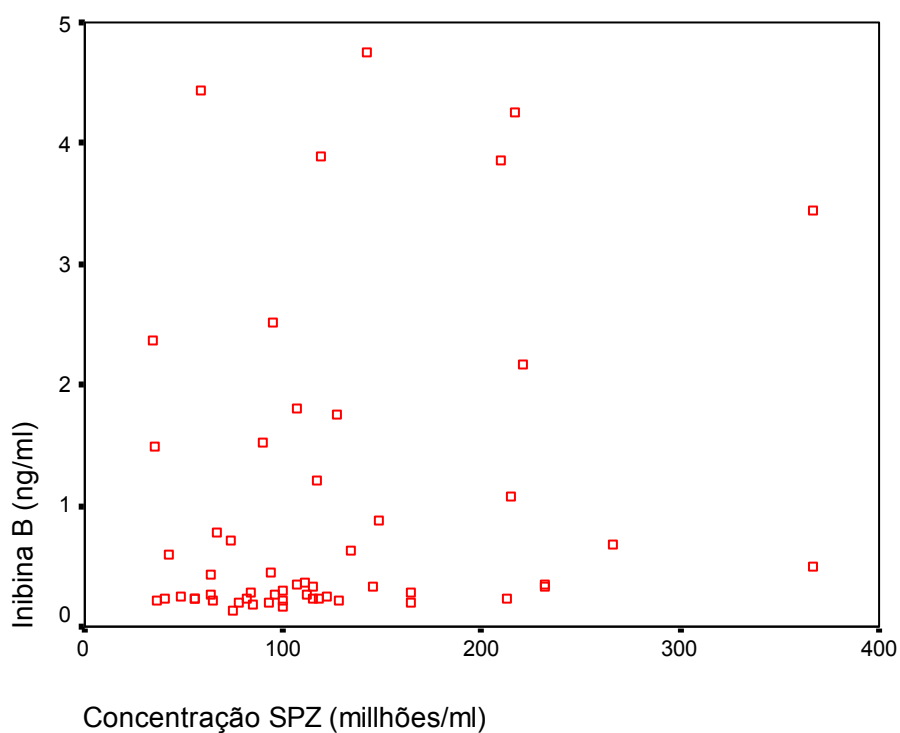


Figura 3 - Dosagem de inibina B X concentração de SPZ no grupo Doador

5.4 Correlação entre dosagens hormonais e recuperação espermática

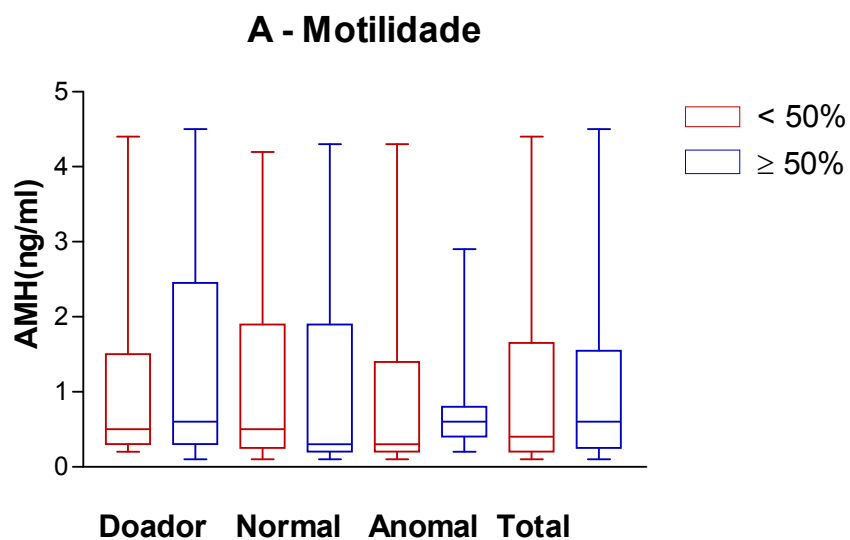


Figura 4.A - Comparação das dosagens de AMH seminal entre as amostras com alta e baixa recuperação espermática: motilidade

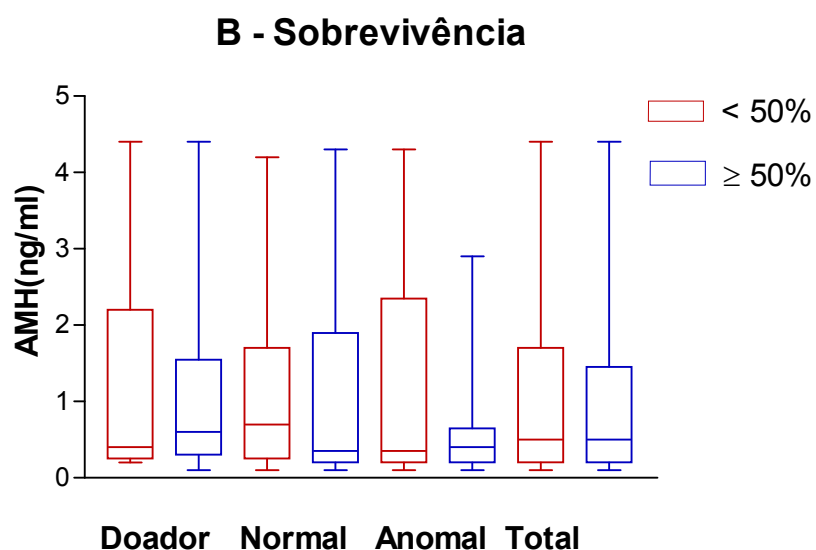


Figura 4.B - Comparação das dosagens de AMH seminal entre as amostras com alta e baixa recuperação espermática: sobrevivência

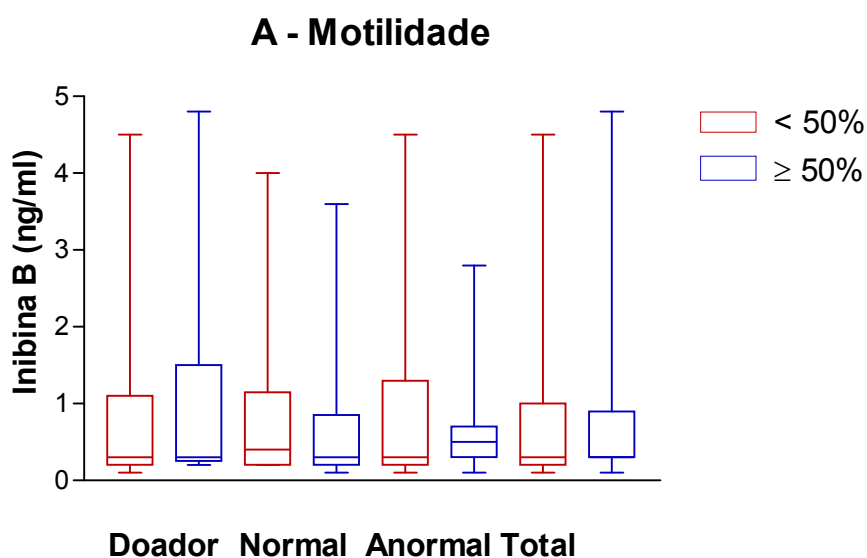


Figura 5.A - Comparação das dosagens de inibina B seminal entre as amostras com alta e baixa recuperação espermática: motilidade

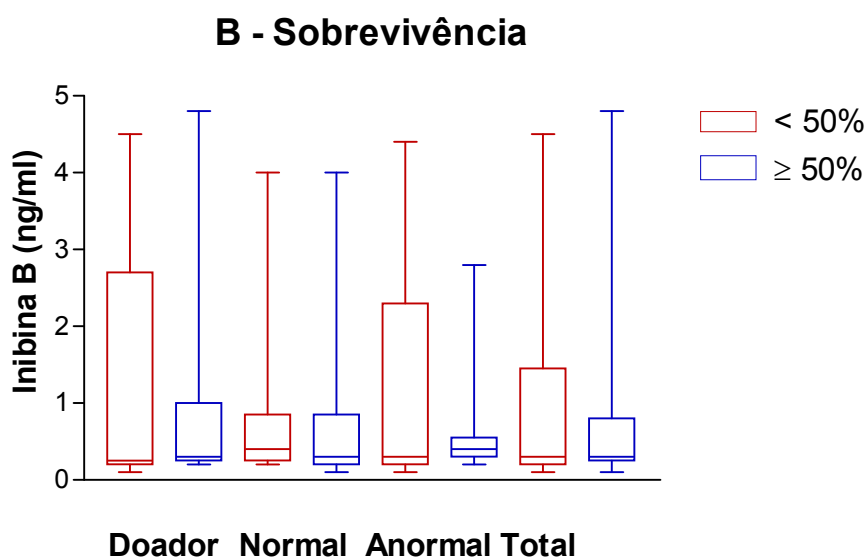


Figura 5.B - Comparação das dosagens de inibina B seminal entre as amostras com alta e baixa recuperação espermática: sobrevivência

Ao comparar as dosagens seminais de AMH e Inibina B entre as amostras com alta e baixa recuperação espermática (TM e TS) considerando o ponto de corte de 50%, não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos estudados, demonstrando a ausência de correlação entre as dosagens seminais de

AMH (figuras 4.A e 4.B) e Inibina B (figuras 5.A e 5.B) e as taxas de preservação da motilidade e criossobrevivência espermática nos três grupos.

O parâmetro seminal inicial que teve melhor correlação com a recuperação espermática foi concentração de SPZ. Tanto em relação à motilidade quanto à sobrevivência, essa correlação foi fraca ($R < 0,7$) (tabela 3). As dosagens seminais de AMH e Inibina B tiveram pior desempenho em termos de sensibilidade X especificidade que a concentração de SPZ, tanto para motilidade (figura 6.A), quanto para sobrevivência (figura 6.B).

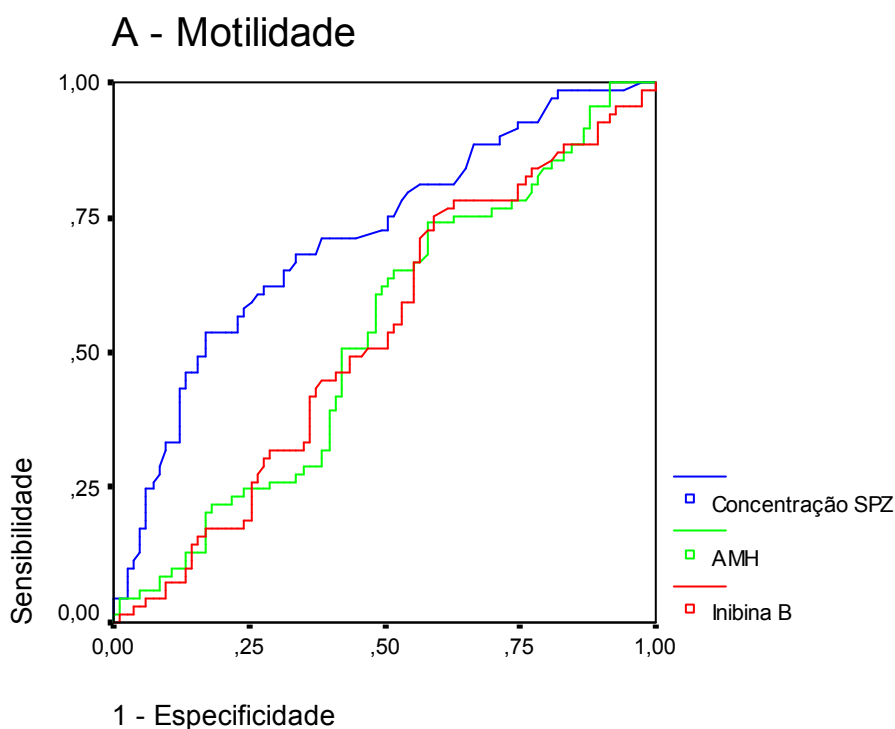


Figura 6.A - Comparação do valor preditivo de recuperação espermática da concentração de SPZ com o dos hormônios seminais: motilidade

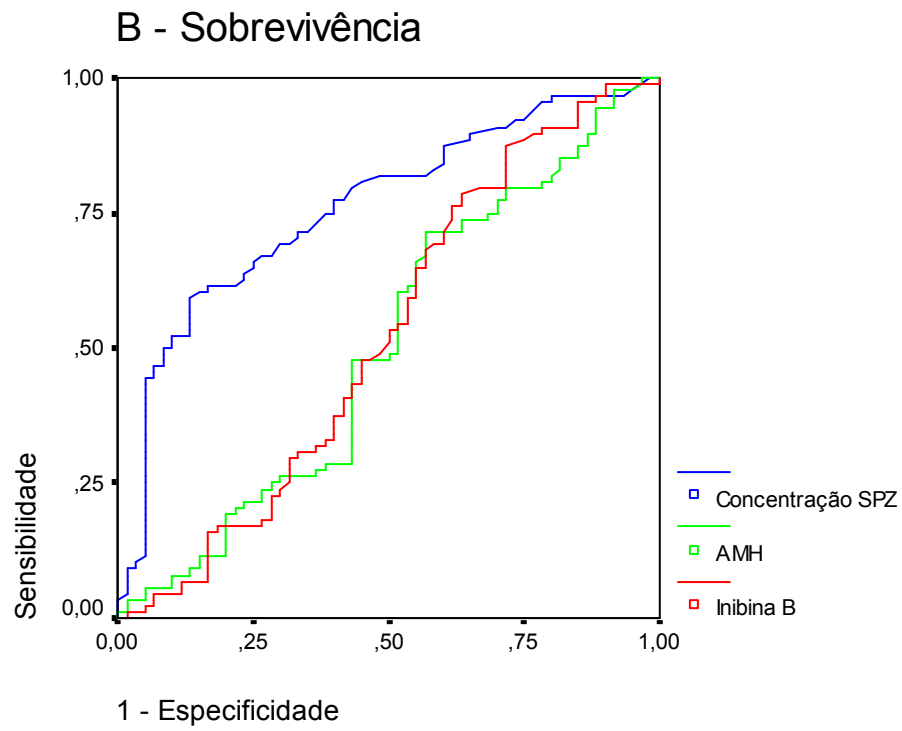


Figura 6.B - Comparação do valor preditivo de recuperação espermática da concentração de SPZ com o dos hormônios seminais: sobrevivência

6 Discussão

6.1 Características da população

O fator idade, no homem, não tem tanto impacto quanto nas mulheres, no que se refere à fertilidade. Existem estudos demonstrando uma piora da qualidade dos SPZ relacionada, principalmente, a danos no DNA com o aumento da idade dos homens. Entretanto a idade limite e a magnitude dos riscos ainda não estão bem definidas [49]. Como não houve diferença desse parâmetro entre os grupos, este não foi um fator de interferência.

A ocorrência de febre durante o período de espermatogênese pode levar a alterações nesse processo resultando em produção deficiente de SPZ. A ocorrência de febre nos últimos três meses (tempo maior que o de um ciclo completo de espermatogênese) foi baixa e semelhante entre os grupos, o que nos indica que a interferência deste fator provavelmente não foi significativa.

O período de abstinência está relacionado a alterações na quantidade e vitalidade dos SPZ da amostra. O período recomendado pela WHO é de dois a sete dias da última ejaculação [4]. Amostras coletadas com períodos menores podem apresentar redução da quantidade de SPZ e maiores, com queda da vitalidade espermática. Todos os pacientes se encontravam dentro do período de abstinência recomendado e não houve diferença entre os grupos. Portanto, não houve interferência deste fator.

O tempo de congelamento das amostras não é o fator determinante do nível de lesão de SPZ criopreservado, uma vez que as lesões ocorrem principalmente nos

momentos do congelamento e do descongelamento [50]. No presente estudo, o tempo de congelamento foi pequeno e semelhante entre os grupos, não havendo a interferência deste fator.

6.2 Parâmetros seminais e recuperação espermática

Como os parâmetros seminais foram utilizados como critério de divisão dos grupos, a qualidade seminal foi, naturalmente, diferente entre os grupos: Doador > Normal > Anormal.

A recuperação espermática foi medida por percentual. Desta forma, a comparação entre grupos de qualidade seminal diferente foi válida.

A relação entre a qualidade seminal e a recuperação espermática, demonstrada pela melhor recuperação no grupo Doador e a pior no Anormal, é descrita na literatura [20] e pode ser utilizada como referência, ainda que vaga, de que a recuperação espermática em bancos de sêmen de doadores seria, em geral, melhor que em bancos de sêmen terapêuticos.

6.3 Correlação entre dosagens hormonais e parâmetros seminais

No presente estudo, a dosagem seminal de AMH não se correlacionou com nenhum dos parâmetros seminais avaliados. Este resultado é concordante com alguns estudos [24] e discordante com outros, que encontraram correlação positiva do AMH com a concentração e a motilidade dos SPZ [28] e que encontraram correlação negativa do AMH com a motilidade [31]. Estas discordâncias podem ter

ocorrido devido à possível presença de correlação apenas em determinada faixa de concentração de SPZ, ou à existência de uma correlação fraca, que só seria detectada em estudos com grandes populações.

A correlação entre a dosagem sérica de inibina B e a concentração de SPZ é bem definida na literatura [25]. A dosagem seminal de Inibina B tem correlação direta com a função dos testículos e espermatogênese [33]. No presente estudo, a dosagem seminal deste hormônio se correlacionou com a concentração de SPZ, entretanto, apenas no grupo Doador. Este grupo representa os indivíduos com melhor função espermática e espermatogênese mais intensa, o que explicaria o aparecimento de correlação entre a inibina seminal e a concentração espermática apenas neste grupo, uma vez que não houve diferença entre os grupos em relação à dosagem hormonal, mas apenas em relação à concentração de SPZ. Entretanto, apesar da presença de correlação entre inibina B e concentração de SPZ e de correlação entre concentração de SPZ e recuperação espermática, não houve correlação entre inibina B e recuperação espermática, o que nos leva a supor que a correlação existente neste grupo, apesar de significativa do ponto de vista estatístico, não o seja do ponto de vista clínico.

6.4 Correlação entre dosagens hormonais e recuperação espermática

No presente estudo ficou demonstrado que não há correlação entre as dosagens seminais de AMH e inibina B e a recuperação espermática após criopreservação, apesar da correlação entre as dosagens de AMH e Inibina B e outros parâmetros de infertilidade masculina ser descrita na literatura: AMH sérico X

função das células de Sertoli e ação do FSH na função testicular (positiva); AMH seminal X testosterona sérica e morfologia espermática (positiva); AMH seminal X FSH sérico e azoospermia obstrutiva (negativa); Inibina B sérica X função das células de Sertoli, espermatogênese e concentração espermática (positiva); Inibina B seminal X função testicular e espermatogênese (positiva); Inibina B seminal X azoospermia obstrutiva (negativa).

Uma possível explicação para este resultado seria que os fatores que conferem resistência ao SPZ à criopreservação, ainda que relacionados ao número e função dos mesmos, sejam independentes do controle hormonal da espermatogênese, ou seja, outros fatores (não hormonais) determinariam uma maior ou menor resistência do SPZ à criopreservação.

A maturidade do SPZ, avaliada pelo teste HBA, apesar de demonstrar uma correlação positiva com a capacidade de sobrevivência do SPZ à criopreservação, não pode ser considerado um bom marcador, pois seu valor preditivo também foi menor que o da concentração e morfologia espermáticas [41]

Uma possibilidade é de que a capacidade de criossobrevivência espermática esteja relacionada mais à resistência da membrana plasmática dos SPZ que a fatores hormonais ou funcionais, uma vez que os danos sofridos pelos mesmos durante o processo de congelamento/descongelamento ocorrem principalmente na membrana plasmática [50], [51]. Já foi demonstrado que após o processo de congelamento/descongelamento a membrana plasmática do SPZ torna-se mais rígida e que a resistência do SPZ à criopreservação é proporcional à fluidez da membrana plasmática antes do congelamento [40].

Os marcadores de apoptose também podem ser potenciais preditores de criossobrevivência espermática. Alguns deles parecem promissores, como a externalização da fosfatidilserina, verificada por meio da ligação do SPZ à anexina

V, que tem relação inversa com a criossobrevivência espermática [52], mas o papel da fragmentação do DNA ainda precisa ser elucidado [53].

Os elementos bioquímicos são substâncias facilmente mensuráveis na amostra seminal e podem ser candidatos a marcadores de criossobrevivência espermática. A dosagem Ca seminal parece ser inversamente proporcional à criossobrevivência espermática, mas a de colesterol não demonstrou ser um bom marcador [54]. A dosagem de outros elementos bioquímicos como frutose e proteínas, poderia ser útil para a identificação de outros marcadores.

Outra possibilidade é de que a resistência do SPZ à criopreservação seja geneticamente definida [55], o que sugere a investigação de marcadores genéticos que identificariam indivíduos (e não mais amostras) de bom ou mau prognóstico para criopreservação seminal, o que determinaria então uma mudança de paradigma a ser incorporada pelos bancos de sêmen de doadores.

Com relação à aplicabilidade clínica e laboratorial dos hormônios testados, como não encontramos outros estudos com objetivo semelhante (de tentar avaliar a relação entre dosagens hormonais seminais e recuperação espermática) na literatura, não foi possível comparar o nosso resultado com outros estudos que o corroborassem. Entretanto, como esse resultado foi considerado consistente e não demonstrou nenhuma correlação (positiva ou negativa) estatisticamente significativa, podemos dizer que as dosagens seminais de AMH e inibina B não devem ser utilizadas como teste laboratorial na prática clínica como marcadores de criossobrevivência espermática, pelo menos até que se tenham evidências científicas que sugiram o contrário.

7 Conclusão

As dosagens seminais de AMH e Inibina B não predizem as taxas de recuperação espermáticas no que se refere à preservação da motilidade e à sobrevivência dos SPZ após o processo de criopreservação

8 Referências

1. A.F., C., et al., *Anticoncepção, endocrinologia e infertilidade: soluções para as questões da ciclicidade feminina*. 2011, Belo Horizonte: Coopmed. 1186.
2. Fritz, M.A. and L. Speroff, *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 8th edition ed. 2011, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
3. Cooper, T.G., et al., *World Health Organization reference values for human semen characteristics*. Hum Reprod Update, 2010. **16**(3): p. 231-45.
4. WHO, S.P.R., *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th ed. ed. 2010, Melbourne: World Health Organization.
5. Casper, R.F., et al., *The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia*. Fertil Steril, 1996. **65**(5): p. 972-6.
6. Guzick, D.S., et al., *Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1388-93.
7. Ombelet, W., et al., *Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing*. Hum Reprod, 1997. **12**(5): p. 987-93.
8. HOSSAIM, A. and M. NAGAMN, *Book infertility and assisted reproduction*. 2008, Cambridge: Cambridge University Press.
9. Maltaris, T., et al., *Gonadal damage and options for fertility preservation in female and male cancer survivors*. Asian J Androl, 2006. **8**(5): p. 515-33.
10. Lee, S.J., et al., *American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients*. J Clin Oncol, 2006. **24**(18): p. 2917-31.
11. AbdelHafez, F., et al., *Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review*. Hum Reprod Update, 2009. **15**(2): p. 153-64.
12. Meacham, R.B., *Strategies for enhancing sperm survival in specimens obtained from patients with retrograde ejaculation*. J Androl, 2005. **26**(2): p. 174-5.
13. Hourvitz, A., et al., *Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using cryopreserved sperm from men with malignant neoplasm yields high pregnancy rates*. Fertil Steril, 2008. **90**(3): p. 557-63.
14. BAUMANN, K.e.a., *Assisted reproduction using cryopreserved sperm: a mini review*. J Reproduk Endokrinol, 2007. **4**(2): p. 97-100.
15. Konc, J., K. Kanyo, and S. Cseh, *The effect of condition/state of testicular spermatozoa injected to the outcome of TESE-ICSI-ET cycles*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2008. **141**(1): p. 39-43.
16. Ishikawa, T., et al., *Fertilization and pregnancy using cryopreserved testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection with azoospermia*. Fertil Steril, 2009. **92**(1): p. 174-9.
17. Carrell, D.T., et al., *Prospective, randomized, blinded evaluation of donor semen quality provided by seven commercial sperm banks*. Fertil Steril, 2002. **78**(1): p. 16-21.
18. Oehninger, S., et al., *Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome*. Mol Cell Endocrinol, 2000. **169**(1-2): p. 3-10.
19. Vutyavanich, T., W. Piromlertamorn, and S. Nunta, *Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa*. Fertil Steril, 2010. **93**(6): p. 1921-8.

20. Keel, B.A., *Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors*. Fertil Steril, 2006. **85**(1): p. 128-34.
21. Chan, S.Y.W., et al., *Human spermatozoal tail hypo-osmotic swelling test, motility characteristics in hypotonic saline, and survival of spermatozoa after cryopreservation*. Human Reproduction, 1993. **8**(5): p. 717-721.
22. Lin, M.H., et al., *Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-Y staining*. Fertil Steril, 1998. **70**(6): p. 1148-55.
23. Deffieux, X. and J.M. Antoine, *[Inhibins, activins and anti-Mullerian hormone: structure, signalling pathways, roles and predictive value in reproductive medicine]*. Gynecol Obstet Fertil, 2003. **31**(11): p. 900-11.
24. Zalata, A.A., et al., *Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism and seminal anti-Mullerian hormone in fertile and infertile men*. Andrologia, 2008. **40**(6): p. 392-7.
25. Toulis, K.A., et al., *Inhibin B and anti-Mullerian hormone as markers of persistent spermatogenesis in men with non-obstructive azoospermia: a meta-analysis of diagnostic accuracy studies*. Hum Reprod Update, 2010. **16**(6): p. 713-24.
26. Dadfar, M., et al., *Pre-operative serum level of inhibin B as a predictor of spermatogenesis improvement after varicocelelectomy*. Urol J, 2010. **7**(2): p. 110-4.
27. Jorgensen, N., et al., *Serum inhibin-b in fertile men is strongly correlated with low but not high sperm counts: a coordinated study of 1,797 European and US men*. Fertil Steril, 2010. **94**(6): p. 2128-34.
28. Fujisawa, M., et al., *The significance of anti-Mullerian hormone concentration in seminal plasma for spermatogenesis*. Hum Reprod, 2002. **17**(4): p. 968-70.
29. Duvilla, E., et al., *Significance of inhibin B and anti-Mullerian hormone in seminal plasma: a preliminary study*. Fertil Steril, 2008. **89**(2): p. 444-8.
30. Mitchell, V., et al., *Seminal plasma levels of anti-Mullerian hormone and inhibin B are not predictive of testicular sperm retrieval in nonobstructive azoospermia: a study of 139 men*. Fertil Steril, 2010. **94**(6): p. 2147-50.
31. Fallat, M.E., et al., *The presence of mullerian inhibiting substance in human seminal plasma*. Hum Reprod, 1996. **11**(10): p. 2165-9.
32. Al-Qahtani, A., et al., *Development of a sensitive enzyme immunoassay for anti-Mullerian hormone and the evaluation of potential clinical applications in males and females*. Clin Endocrinol (Oxf), 2005. **63**(3): p. 267-73.
33. Luisi, S., et al., *Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy*. Hum Reprod Update, 2005. **11**(2): p. 123-35.
34. El Garem, Y.F., et al., *Possible relationship between seminal plasma inhibin B and spermatogenesis in patients with azoospermia*. J Androl, 2002. **23**(6): p. 825-9.
35. Glander, H.J., H. Bock, and P. Winiecki, *Sperm motile efficiency (SME) of fresh spermatozoa in a hypotonic medium correlates with their cryosurvival in fertile men and infertility patients (predicting test)*. Andrologia, 1989. **21**(4): p. 363-9.
36. Chan, S.Y., et al., *The hypoosmotic swelling test and cryosurvival of human spermatozoa*. Hum Reprod, 1990. **5**(6): p. 715-8.

37. Centola, G.M., R.F. Raubertas, and J.H. Mattox, *Cryopreservation of human semen. Comparison of cryopreservatives, sources of variability, and prediction of post-thaw survival*. J Androl, 1992. **13**(3): p. 283-8.
38. Aribarg, A., et al., *Prediction of post-thaw sperm motility and sperm cryosurvival rate using the pre-freeze sperm parameters*. J Med Assoc Thai, 1995. **78**(9): p. 474-80.
39. Davis, R.O., E.Z. Drobnis, and J.W. Overstreet, *Application of multivariate cluster, discriminate function, and stepwise regression analyses to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival*. Fertil Steril, 1995. **63**(5): p. 1051-7.
40. Giraud, M.N., et al., *Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa*. Hum Reprod, 2000. **15**(10): p. 2160-4.
41. Yogev, L., et al., *Assessing the predictive value of hyaluronan binding ability for the freezability potential of human sperm*. Fertil Steril, 2008. **93**(1): p. 154-8.
42. Lee, M.M., et al., *Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(2): p. 571-6.
43. Groome, N. and M. O'Brien, *Immunoassays for inhibin and its subunits. Further applications of the synthetic peptide approach*. J Immunol Methods, 1993. **165**(2): p. 167-76.
44. Jensen, T.K., et al., *Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis: correlation to differences in sperm concentration and follicle-stimulating hormone levels. A study of 349 Danish men*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4059-63.
45. Pierik, F.H., et al., *Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(9): p. 3110-4.
46. Kumanov, P., et al., *Inhibin B is a better marker of spermatogenesis than other hormones in the evaluation of male factor infertility*. Fertil Steril, 2006. **86**(2): p. 332-8.
47. Mostafa, T., et al., *Seminal plasma anti-Mullerian hormone level correlates with semen parameters but does not predict success of testicular sperm extraction (TESE)*. Asian J Androl, 2007. **9**(2): p. 265-70.
48. Jr, J.G.F., *Manual de Procedimentos Laboratório de Reprodução Assistida*. Red Latinoamericana de Reproducción Asistida ed. 2006.
49. Stewart, A.F. and E.D. Kim, *Fertility concerns for the aging male*. Urology, 2011. **78**(3): p. 496-9.
50. Yogev, L., et al., *Long-term cryostorage of sperm in a human sperm bank does not damage progressive motility concentration*. Hum Reprod, 2010. **25**(5): p. 1097-103.
51. Watson, P.F., *Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function*. Reprod Fertil Dev, 1995. **7**(4): p. 871-91.
52. Sion, B., et al., *Annexin V binding to plasma membrane predicts the quality of human cryopreserved spermatozoa*. Int J Androl, 2004. **27**(2): p. 108-14.
53. Said, T.M., A. Gaglani, and A. Agarwal, *Implication of apoptosis in sperm cryoinjury*. Reprod Biomed Online, 2010. **21**(4): p. 456-62.
54. Meseguer, M., et al., *Role of cholesterol, calcium, and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage after a cycle of freezing and thawing*. Fertil Steril, 2004. **81**(3): p. 588-94.

55. Thurston, L.M., P.F. Watson, and W.V. Holt, *Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation?* *Cryo Letters*, 2002. **23**(4): p. 255-62.