ALBERTO MANUEL BARROS DA SILVA

INFERTILIDADE MASCULINA

Análise Cromossómica e do Esperma

Porto
1989

ALBERTO MANUEL BARROS DA SILVA

INFERTILIDADE MASCULINA

Análise Cromossómica e do Esperma

Dissertação Apresentada à
Faculdade de Medicina do Porto
para Obtenção do Grau de
Doutor em Medicina.

Porto
1989

O meu RECONHECIMENTO e a DEDICAÇÃO deste trabalho

- Aos meus pais e irmão, pelo amor e sacrifício que tornaram possível a minha formação.

- Ao Prof. Doutor Amândio S. Tavares, pelo apoio, estímulo e orientação.

- Ao Prof. Doutor Joaquim Maia, pela incansável disponibilidade na análise estatística dos dados.

- A todos os que trabalham no Serviço de Genética Médica da Faculdade de Medicina do Porto e ao Dr. Manuel Ramos, pela amizade e colaboração.

- À I. Isabel

- Aos meus amigos

De acordo com o Decreto-Lei nº 388/70, Artº. 8º, § 2, neste trabalho foram utilizados resultados já publicados, nos quais participei na recolha e análise do material e na elaboração do texto:

- Familial inv(1) (p36.3 q12) associated with sterility. Alberto Barros, M. C. Tavares, M. P. Gomes, M. P. Tavares. Journal of Medical Genetics 23: 90-91, 1986.

- Pericentric inversion and sterility. Alberto Barros, M. C. Tavares, M. P. Gomes, M. P. Tavares. Journal of Medical Genetics 24: 510, 1987.

Artº. 48º, § 3º - A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação. (Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto, 28 Janeiro 1951 - Decreto nº 19337).

I . INTRODUÇÃO 5

II . ESTUDO DO ESPERMA

Material e métodos 53

Resultados 62

III . ESTUDO CITOGENÉTICO

Material e métodos 101

Resultados 102

IV . DISCUSSÃO 119

V . CONCLUSÕES 145

BIBLIOGRAFIA 153

Anomalias cromossómicas
- aconselhamento genético 137, 140, 142
- efeito intercromossómico 141
- incidência 31-33, 103, 135
- inversões 46, 103, 111, 137
- parâmetros espermáticos indicadores do cariótipo 133, 138-140
- relação com a motilidade e a morfologia dos espermatozóides 115, 116
- relação com o número de Ez 33, 34, 105, 106, 110
- síndrome de Down 37
- síndrome de Klinefelter 35, 103
- síndrome do metamacho 36, 103, 138
- técnicas de estudo cromossómico 101,102
- translocações não recíprocas 44
- translocações recíprocas 38, 103, 110, 136
- translocações robertsoneanas 38, 103, 110, 136

Espermatogénese
- factores de alteração 11
  diabetes mellitus 19
  drogas 22
  ectopia testicular 23
  genéticos 12
  hipertermia 21
  imunológicos 13
  infecciosos 17
  psicológicos 20
  radiações ionizantes 23
  tabaco 20

torção testicular 23
traumatismos testiculares 23
varicocelo 15
- inactivação do cromossoma X 43, 44

Esperma
- abstinência sexual 8, 9
- bioquímica
ácido cítrico e frutose 26, 27, 61 92, 124
- cheiro 54
- colheita 53
- coloração 54
- liquefacção 54
- pH 55
- valores de referência 24
- variações fisiológicas 8
- viscosidade 55
- volume 54

Espermatozóides
- aglutinação espontânea
- coeficientes de correlação
(número, morfologia,
motilidade, hipo-osmolaridade) 65, 66, 71, 77, 82, 120
- capacidade fecundante
constituição cromossómica 30, 41
prognóstico 11, 27-29, 119, 122, 126, 128
prova de hipo-osmolaridade 29, 59, 123-130
prova de penetração nos
oócitos do Hamster 28

prova de sobrevivência dos Ez 28, 59, 99, 129, 130
- frequências de distribuição 62
- morfologia 57, 126
- motilidade 56, 126
- número 56, 126
- significado da oligo, terato e/ou astenozoospermia 126
- valores de referência 24
- vitalidade 58, 88, 123

Espermograma
- valorização 8, 145

Meiose
- mutações 50, 116, 141

Polimorfismos cromossómicos 31, 47, 103, 109, 110, 134, 135

Selecção natural
- eliminação de genes ou cromossomas anómalos 13, 143
- selecção embrionária precoce 41, 42

Técnicas de fecundação medicamente ajudada 126, 143

Deus disse a Abraão: "Não chamarás mais à tua mulher Sarai, mas Sara. Abençoá-la-ei e dela dar-te-ei um filho. Será por mim abençoada e será mãe de nações, e dela sairão reis". Abraão prostrou-se com o rosto por terra, e sorriu, dizendo intimamente: "Pode uma criança nascer de um homem de cem anos? E Sara, mulher de noventa anos, vai agora ter filhos?"... Mas Deus respondeu-lhe: "Sou Eu quem to afirma: Sara, tua mulher, dar-te-á um filho, a quem chamarás Isaac. Farei uma aliança com ele, aliança que será eterna para a sua posteridade e depois dele".

Génesis, 17

I. INTRODUÇÃO

A incapacidade reprodutiva de um casal, impossibilitando a sua continuidade biológica, tem sido uma perspectiva, muitas vezes concretizada, que tem acompanhado todas as gerações desde os primórdios da História.

Ao longo desta, se a fertilidade sempre foi fundamental para a sobrevivência das populações e, por isso, socialmente aceite e encorajada, a esterilidade era, pelo contrário, considerada como uma doença vergonhosa, até mesmo maldição dos deuses, que era necessário conjurar com rituais religiosos e mágicos, sendo sobretudo a mulher quem, em regra, era inculpada e muitas vezes desprezada, odiada e maltratada pela circunstância de não ter filhos.

Cerca de 10-15% dos casais são involuntariamente inférteis e outros 10% têm menos filhos que o desejado. Esta situação, contrária ao "instinto procriativo", é agravada pelo facto de haver cada vez menos crianças disponíveis para adopção, dada a difusão dos meios contraceptivos eficazes e a liberalização da interrupção voluntária da gravidez, diminuindo assim o número de filhos indesejados.

O diagnóstico de infertilidade estabelece-se quando não ocorre concepção após um ano de actividade sexual por parte de um casal que deseja ter um filho e que, consequentemente, não utiliza qualquer método contraceptivo. O termo "esterilidade" implica a presença de uma situação

irreversível, isto é, deve ser unicamente aplicado quando não existe qualquer processo terapêutico capaz de corrigir a alteração responsável pela não procriação.

O espectacular avanço das ciências médicas neste século permitiu que muito se conheça sobre o complexo processo da reprodução, embora muito haja ainda a descobrir para que as múltiplas causas de infertilidade sejam integralmente conhecidas e compreendidas. De facto, com os actuais meios de diagnóstico não é possível diagnosticar a causa da infertilidade em cerca de 5 a 10% dos casos. Assim, os casais devem ser desencorajados, através de um adequado esclarecimento, a "saltar" de médico para médico, no sentido de encontrar um "milagreiro", cada vez que se frustra a resolução do problema, desde que, evidentemente, estejam esgotadas todas as possibilidades diagnósticas e terapêuticas.

Do ponto de vista médico a infertilidade é, porventura, uma situação única, na qual cada membro do casal integra uma "unidade infértil", e é esta unidade que deve ser estudada e tratada. Na realidade, os factores de causa masculina e feminina distribuem-se em partes semelhantes pelo que o diagnóstico de uma eventual etiologia de infertilidade num dos membros não deve excluir o estudo pormenorizado do outro.

O objectivo deste trabalho é a avaliação de um dos elementos dessa "unidade infértil" - o homem -, analisando a função testicular exócrina através do seu produto de secreção, o espermatozóide, a função secretora das glândulas genitais acessórias e a relevância das anomalias cromossómicas na etiopatogenia da infertilidade masculina.

A. ESTUDO DO ESPERMA

Este estudo é indiscutivelmente a pedra angular na avaliação da aptidão biológica do homem, assumindo um carácter de imprescindibilidade. Não é, todavia, um "teste de fertilidade" pois, apesar de toda a capacidade diagnóstica actual, o único "teste de fertilidade" com resultados inquestionáveis é o diagnóstico de gravidez.

O esperma varia qualitativa e quantitativamente com a idade, a doença, a época do ano e a actividade sexual.

De acordo com Macleod, enquanto o volume de ejaculado, o número e a morfologia dos espermatozóides se mantêm com uma constância notável ao longo da idade reprodutiva, observa-se uma tendência para que, a partir dos 40 anos, a motilidade dos espermatozóides diminua.

A duração da abstinência sexual, não influenciando de forma significativa os valores relativos das formas normais e da motilidade - a percentagem de formas móveis é praticamente constante do 1º ao 5º dia de abstinência para ,em seguida, diminuir lentamente - determina resultados bastante diferentes do volume e do número de espermatozóides. Schwartz (1983) refere uma variação de 40 a 96 milhões /ml quando a abstinência passa de 1 para 5 dias. De uma forma geral verifica-se um crescimento linear do volume e do número de espermatozóides do 1º ao 5º dia de

abstinência, após o que se observa uma estabilização. Consequentemente, há necessidade de se estabelecer um período de abstinência padronizado que, em regra, é de 3 a 5 dias.

A ritmicidade circanual do número de espermatozóides presentes no ejaculado é a conclusão de vários trabalhos, destacando-se o de Tjoa et al. (1982) que descreveram uma variação de cerca de 34% durante o ano, atingindo-se os valores máximos da concentração espermática entre Fevereiro e Março e os valores mais baixos em Setembro (fig.I-1).

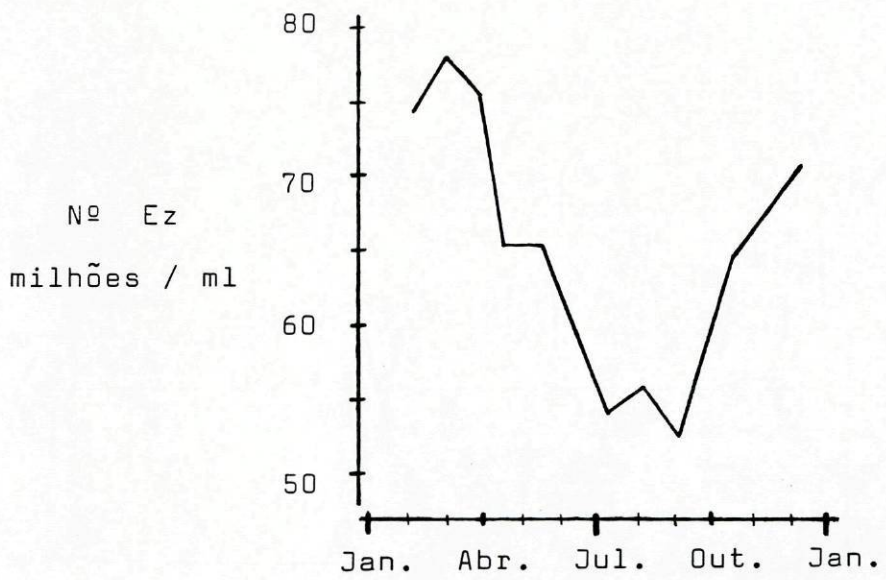


Fig. I-1 Ritmo circanual da concentração espermática. Adap. Tjoa et al.(1982).

Existe também uma variação individual, aparentemente independente de factores exógenos, que incide fundamentalmente no volume e no número de espermatozóides, dando origem a que a análise de uma só amostra seja insuficiente para avaliar o esperma de um indivíduo, pelo que se devem fazer 2 ou 3 colheitas com intervalo de 3 meses (fig.I-2).

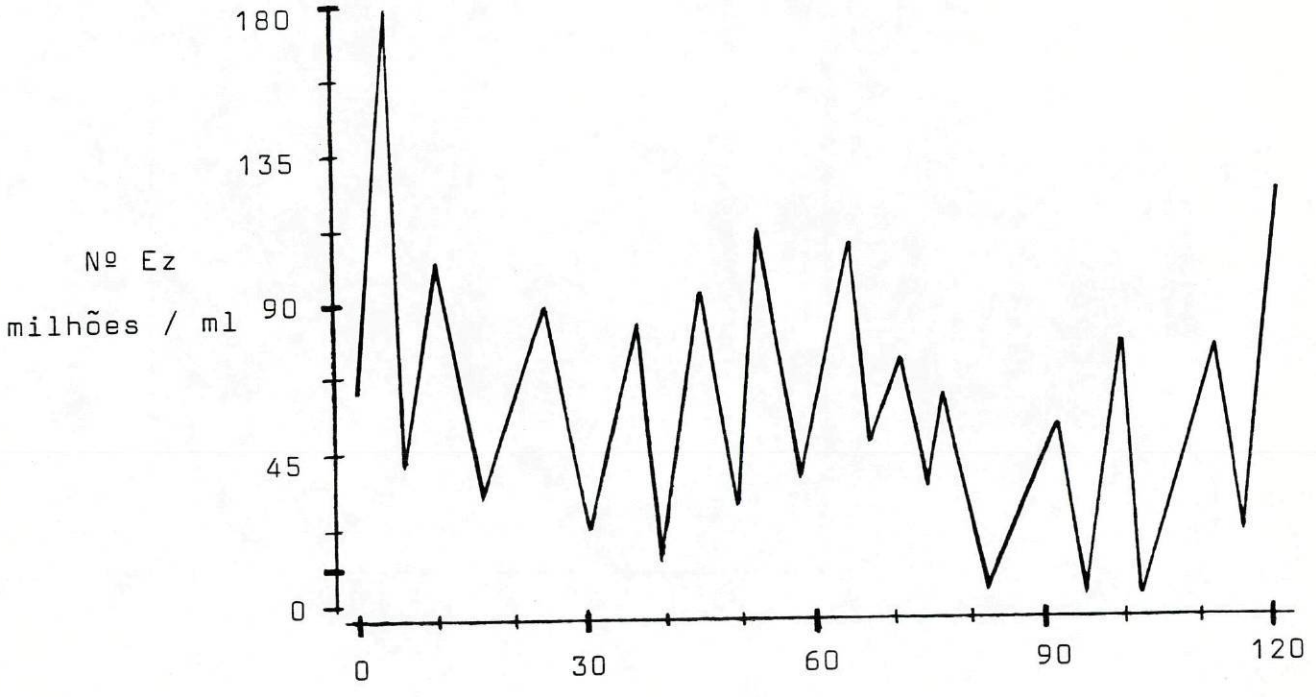


Fig. I-2 Concentrações espermáticas num indivíduo que fez colheitas bissemanais durante 120 semanas. Neste período não houve intercorrências febris nem qualquer terapêutica.

Adap. WHO (1987).

Para além da influência exercida pelos parâmetros atrás referidos, o esperma pode sofrer alterações decorrentes da intervenção de múltiplos factores (Quadro I-1). Dada a possibilidade de normalização da espermatogénese, espontânea ou iatrogénica, o prognóstico da capacidade fecundante de um indivíduo só deve ser deduzido após a repetição do estudo do esperma passados cerca de 3 meses, período que corresponde aos 74 dias necessários à diferenciação do espermatozóide e aos 14 dias de trânsito epididimário.

QUADRO I-1

FACTORES DE ALTERAÇÃO DA ESPERMATOGÉNESE

-Genéticos	-Tabaco
-Imunológicos	-Hipertermia
-Varicocelo	-Drogas
-Infecciosos	-Radiações ionizantes
-Diabetes mellitus	-Torção testicular
-Psicológicos	-Ectopia testicular
-Álcool	-Traumatismos testiculares

Factores génicos

QUADRO I-2

INFERTILIDADE MASCULINA - ETIOLOGIA GÉNICA

Entidade	Hereditariedade
-Anorquia familiar congénita	XR
-Aplasia das células germinativas	XR ou AD
-Aplasia congénita dos canais deferentes	AR
-Deficiência isolada de gonadotrofinas	AR
-Deficiência isolada de LH	AR
-Fibrose cística	AR
-Hipospádias	AD
-Infertilidade oligo-sináptica	AD ou XR
-Síndrome do canal de Muller persistente	AR
-Síndrome de Kallman	AD ou AR
-Síndrome dos testículos rudimentares	XR
-Pseudo-hermafroditismo masculino familiar incompleto tipo I	XR, AD
-Síndrome de inversão sexual	AR
-Síndrome dos cílios imóveis	AR
-Malformação do acrossoma	AR, AD

O conhecimento dos factores de origem genética - génica (quadro I-2) e cromossómica - que produzem infertilidade e, sobretudo, a capacidade de os interpretar correctamente, é de importância indiscutível para uma prática clínica e laboratorial adequada. Isto porque, ao

contrário das outras inúmeras causas de infertilidade resultantes da acção nefasta de agentes biológicos, químicos ou físicos e cujo combate, em regra, terá uma tradução positiva em termos individuais e de espécie, a infertilidade de causa genética pode considerar-se como um possível mecanismo biológico automático de eliminação de genes ou cromossomas anómalos e, consequentemente, a hipótese do seu combate deve ser exaustivamente analisada e ponderada dada a perspectiva de ir contrariar um processo de selecção natural.

Anticorpos anti-espermatozóides

A frequência dos anticorpos anti-espermatozóides na população masculina infértil é variável segundo os vários autores, pois depende da selecção dos doentes, da técnica utilizada e da interpretação das provas. A pesquisa destes anticorpos deve ser efectuada no plasma sanguíneo e no esperma. No que se refere aos anticorpos séricos, alguns trabalhos apontam uma reduzida percentagem de casos com aglutinação positiva em homens férteis, que não excede os 3%. No grupo dos homens inférteis não seleccionados esta percentagem varia entre 3 e 15%, enquanto é de 35% quando há antecedentes ou sinais biológicos sugestivos de auto-imunização anti-espermatozóides (De Almeida, 1987). O paradigma destes antecedentes pessoais é a vasectomia, que acarreta o aparecimento de anticorpos circulantes em 50 a 60% dos casos (Jouannet e De Almeida, 1983), sendo os traumatismos, cirúrgicos ou acidentais, e as infecções

genitais outros factores que podem despertar auto--imunização; os sinais biológicos evocativos de um processo imunológico são a aglutinação espontânea dos espermatozóides, onde se encontram anticorpos circulantes em 42 (Schoenfeld et al. 1976) a 70% dos casos (De Almeida et al. 1981) e a observação de que os espermatozóides em contacto com o muco cervical se imobilizam ou adquirem um movimento de agitação "in situ", designado por "shaking movements".

A pesquisa de anticorpos fixados nos espermatozóides pela técnica das imuno-esferas (Clark et al. 1982) foi positiva em 7 a 9% dos espermas examinados por infertilidade conjugal (Clark et al. 1985; Jennings et al. 1985). Numa população infértil seleccionada em função da auto-aglutinação observada no ejaculado, De Almeida et al. (1986) encontraram imuno-esferas fixadas em mais de 10% dos espermatozóides em 44% dos espermas observados contra 6% de positividade num grupo comprovadamente fértil.

A alteração do transporte transcervical dos espermatozóides é, depois dos trabalhos de Fjallbrant (1969), o efeito melhor conhecido dos anticorpos; os espermatozóides livres, revestidos por anticorpos, são capazes de penetrar no muco cervical mas fixam-se muito rapidamente às suas micelas glicoproteicas, através do fragmento Fc das imunoglobulinas, imobilizando-se; esta imobilização pode ser precedida dos "shaking movements". A importância desta alteração da migração dos espermatozóides depende do título e da classe dos anticorpos, assim como da qualidade funcional do esperma.

A redução do número de espermatozóides intra-uterinos pode ser também explicada pela activação da sua fagocitose pelos macrófagos do aparelho genital; "in vitro", a incubação de espermatozóides normais com anticorpos séricos aumenta significativamente a sua fagocitose pelos macrófagos peritoneais (London et al. 1985).

O desenvolvimento da fertilização "in vitro" tornou possível estudar o efeito dos anticorpos anti-espermatozóides nas diferentes fases da fecundação. Alguns trabalhos demonstraram que os auto-anticorpos podem impedir a interacção dos espermatozóides com o oócito em diferentes momentos: fixação e penetração na zona pelúcida (Bronson et al. 1982; Kamada et al. 1985), fusão com a membrana oocitária e penetração no oócito do Hamster (Bronson et al. 1981; Dor et al. 1981).

Varicocelo

A incidência de varicocelo clinicamente evidente é de cerca de 15% na população masculina em geral e 20% nos homens inférteis (Sachot e Ratajczak, 1987). A importância desta dilatação e incompetência da veia espermática interna na infertilidade é ainda muito controversa pois há numerosos portadores de varicocelos que não têm quaisquer problemas de fertilidade. O significado do varicocelo na infertilidade masculina é ainda mais discutível no caso dos varicocelos

subclínicos em virtude da sua elevada incidência na população masculina de fertilidade comprovada - 44% (Kursh, 1987).

Os varicocelos são classificados pelo tamanho, mas não existe uma clara relação entre eles e a infertilidade, o que leva alguns autores a tratar cirurgicamente doentes com varicocelos subclínicos, atitude fortemente criticada por outros.

Em 1965, MacLeod referiu a presença de anomalias específicas na citologia seminal no varicocelo, que designou por "stress pattern": proporção aumentada de espermatozóides com cabeças pontiagudas e de espermatozóides imaturos. Todavia, na literatura existem diferentes opiniões sobre o significado desta observação - enquanto uns a consideram característica de varicocelo (Glezerman et al. 1976; Butler, 1979) muitos outros não confirmam esta especificidade morfológica (Rodriguez-Rigan et al. 1981; Panidis et al. 1984; Ayodeji e Baker, 1986).

A dúvida e controvérsia que envolve o varicocelo inclui também os mecanismos fisiopatológicos, que continuam mal elucidados (hipertermia, hipóxia, refluxo de substâncias tóxicas para o parênquima testicular?).

Infecção

A infecção dos órgãos genitais masculinos pode obstruir os canais deferentes ou o epidídimo e provocar lesões testiculares. A frequência de azoospermia em indivíduos com ou sem antecedentes de doenças de transmissão sexual é semelhante mas a frequência de astenozoospermia é significativamente superior nos primeiros, o que se relaciona com alterações funcionais das glândulas sexuais acessórias. A parotidite infecciosa pré-pubertária raramente se complica de orquite (apenas 4,4% dos doentes que têm parotidite após a puberdade); a orquite aumenta significativamente a incidência de azoospermia, sobretudo se é bilateral, e de oligo-asteno-teratozoospermia (Comhaire et al. 1987).

Rehewy et al. (1979) observaram níveis mais elevados de Escherichia coli no esperma de doentes inférteis em relação aos indivíduos férteis. As enterobactérias aeróbicas (gram-negativas) são a causa mais comum de infecções bacterianas não-gonocócicas no aparelho genital masculino; num estudo de 100 casais inférteis, estas bactérias gram-negativas foram apenas detectadas nos casos em que havia anomalias do esperma (Ulstein et al. 1976).

A importância do mycoplasma (Ureaplasma urealyticum e Mycoplasma hominis) na infertilidade não está totalmente clarificada pois estes organismos são frequentemente isolados em culturas uretrais de indivíduos normais mas raramente causam infecções sintomáticas da

próstata ou do epidídimo (Alexander, 1982); todavia, trabalhos comparativos geralmente diagnosticam com mais frequência Ureaplasma nos casais inférteis do que em grupos controle ou casais férteis (Friberg et al. 1974). Estudos de esperma contendo Ureaplasma revelaram motilidade reduzida e formas aberrantes dos espermatozóides (Fowlkes et al. 1975) e a microscopia eléctrónica mostrou que estes microorganismos podem aderir aos espermatozóides (Grossgebauer et al. 1977).

Aproximadamente 40% dos indivíduos com uretrite não específica têm Chlamydia tracomatis na uretra. Embora o seu papel na infertilidade masculina esteja por esclarecer, a Chlamydia é responsável pela doença de transmissão sexual mais frequente nos E.U.A. (Alexander, 1982); na mulher causa doença inflamatória pélvica e obstrução das trompas (Berger et al. 1979; Mardla et al. 1977).

Para além dos mecanismos patogénicos já referidos, as anomalias da espermatogénese de causa infecciosa podem também dever-se a endotoxinas bacterianas através das suas propriedades espermicidas e espermo-imobilizantes (Paulsen et al. 1977; Teague et al. 1971).

Comhaire (1987) refere a associação da infecção das glândulas genitais acessórias com o varicocelo e os factores imunológicos. Entre os indivíduos com varicocelo 8,7% tinham infecção das glândulas acessórias (IGA) comparado com os 6,5% sem varicocelo; visto que o varicocelo é uma patologia congénita de causa anatómica (Steeno et al.

1976) enquanto a IGA é adquirida, a sua coincidência sugere que o varicocelo predispõe à IGA. Por outro lado, a associação entre a infecção das glândulas genitais acessórias, incluindo os epidídimos, e os factores imunológicos pode dever-se ao facto desta infecção causar uma obstrução parcial à passagem do esperma o que é uma causa aceitável para precipitar a reacção imunológica (Witkin et al. 1983). A coincidência do varicocelo com a IGA e da IGA com os factores imunológicos pode explicar parcialmente a associação entre varicocelo e a auto--imunidade; todavia, esta relação mantém-se significativa mesmo na ausência de IGA, sugerindo que o varicocelo pode favorecer uma reacção imunológica, independentemente de qualquer infecção ou inflamação das glândulas acessórias (Comhaire et al. 1987).

Diabetes mellitus

A diabetes mellitus está relacionada com uma frequência aumentada de ejaculação retrógrada, total ou parcial, e de impotência mas não há uma significativa associação com anomalias quantitativas ou qualitativas dos espermatozóides; assim, os dados apresentados por Comhaire (1987) sugerem que a diabetes mellitus pode influenciar a fertilidade, não por alterar a espermatogénese mas pela perturbação da ejaculação.

Factores psicológicos

A capacidade fértil é também influenciada por factores psicológicos: de acordo com estudos animais realizados, situações de intenso "stress" estão associadas a uma depressão da espermatogénese (Alexander, 1982). No Homem, a pressão psicológica da cirurgia ou do combate deprime os níveis de testosterona circulante (Monden et al. 1972).

Álcool

O consumo excessivo de álcool pode levar à impotência ou à diminuição da fertilidade; de facto, o alcoolismo crónico reduz a fertilidade de uma forma indirecta, diminuindo os níveis de gonadotrofinas, e directamente através da lesão das células de Leydig e redução dos níveis de testosterona. A atrofia testicular decorrente tem como expressão histológica a fibrose peritubular e redução acentuada do epitélio germinativo. De acordo com Mendelson e Mello (1979), 70-80% dos alcoólicos têm líbido diminuída, impotência e esterilidade.

Tabaco

Existem múltiplos trabalhos, com conclusões não concordantes, sobre as consequências do tabaco na espermatogénese. Vogt et al. (1986), num estudo envolvendo

150 fumadores, 37 ex-fumadores e 52 não fumadores, não observaram um efeito estatisticamente significativo do tabaco na morfologia e motilidade dos espermatozóides, tendo observado apenas nos grandes fumadores uma ligeira diminuição, não significativa, na concentração dos espermatozóides o que, segundo os autores, poderia estar relacionado com outros factores associados ao tabajismo; resultados semelhantes são referidos por Dikshit et al. (1987) que concluem que o uso do tabaco não está associado com alterações qualitativas do esperma. Evans et al. (1981) tinham observado um aumento significativo da percentagem de espermatozóides morfologicamente anormais num grupo de 43 fumadores comparado com 43 não fumadores consultando também por infertilidade e comparados em idade e na concentração dos espermatozóides; os fumadores tinham cerca de 10% mais espermatozóides anormais que os não fumadores mas não foi estabelecida uma clara relação entre o número de cigarros fumados e a percentagem de espermatozóides com alterações morfológicas; uma redução na motilidade dos espermatozóides foi também observada (Evans, 1982). Destas observações discordantes podemos concluír que actualmente não está provada a existência de um eventual efeito deletério do tabaco sobre as células da linha espermática.

Hipertermia

Estudos experimentais demonstraram que a hipertermia testicular atinge rapidamente a função testicular, provocando o bloqueio da maturação espermática

(Robinson e Rock, 1967; Robinson et al. 1968); num deles, realizado durante um período de 10 semanas, foi observada uma diminuição de 75% no número de espermatozóides, quantidade que voltou ao normal após a remoção da hipertermia experimental. Estes achados sugerem um possível efeito semelhante causado por roupas apertadas comprimindo os testículos. Do mesmo modo, uma temperatura superior a 38°C pode levar a deterioração temporária da quantidade e qualidade dos espermatozóides e à redução da fertilidade. Por exemplo, o efeito supressor da espermatogénese atribuído à mononucleose infecciosa (Wolnisty, 1962) e à hepatite (Derrick e Dahlberg, 1976) é provavelmente devido à febre que as acompanha (Alexander, 1982).

Drogas

As células de Leydig são bastante mais resistentes aos efeitos tóxicos das drogas que as células de Sertoli e o epitélio germinativo, sendo a intensa actividade mitótica e meiótica deste epitélio o que explica a maior predisposição para lesões causadas por múltiplos agentes químicos e físicos. O consumo crónico de marijuana diminui os níveis de testosterona (Kolodny et al. 1974) e a concentração de espermatozóides (Hembree et al. 1976), assim como a heroína e a metadona afectam o eixo hipotálamo-hipofisário, diminuindo o volume de ejaculado e o número e a motilidade dos espermatozóides (Cicero et al. 1975; Purohit et al. 1979). Múltiplas drogas usadas terapêuticamente - citostáticos, benzodiazepinas, fenacetina, derivados do

ácido salicílico, salazosulfapiridina, nitrofurantoína, inibidores da MAO, colquicina, estrogéneos e progestativos - interferem negativamente com a espermatogénese.

Radiações ionizantes

O uso terapêutico das radiações ionizantes, tal como o de citostáticos, origina secundariamente lesões graves do parênquima testicular, provocando até azoospermia. Todavia, esta agressão da espermatogénese não deve ser considerada sempre irreversível, pois tem sido demonstrada fertilidade normal em alguns indivíduos antes submetidos a estas terapêuticas (Buchanan et al. 1975; Hinkes e Plotkin, 1973).

Torção, ectopia e traumatismos testiculares

Comhaire (1987) descreve a associação de antecedentes de torção e ectopia testiculares com a maior frequência de azoospermia e alterações da espermatogénese, particularmente oligozoospermia; também nos indivíduos com história clínica de lesões testiculares com hematoma escrotal ou hematúria há aumento significativo de azoospermia e de oligo-asteno-teratozoospermia.

A grande heterogeneidade celular do esperma humano, a variabilidade intra-individual, as alterações - muitas vezes transitórias - da espermatogénese, e o papel determinante do elemento feminino na expressão da fertilidade masculina, aconselha a ser bastante prudente na interpretação dos diversos parâmetros de estudo do esperma. Assim, é mais aconselhável falar em "valores de referência" do que em "valores normais", até porque apesar das diversas técnicas biológicas que analisam os factores espermáticos, não é ainda possível definir todos os critérios que caracterizam o espermatozóide fecundante.

Da análise das publicações de Freund et al. (1976), Eliasson (1981), Jouannet et al. (1981), Brassesco (1983) e Comhaire (1987), consideramos os "valores de referência" seguintes:

Volume	2-6 ml
Cor	amarelo-grisalho branco-grisalho
Cheiro	"sui generis"
Viscosidade	normal
Liquefacção	completa aos 30'
pH	7,2-7,8

Concentração (Nº Ez/ml)	≥20 <250x10^6
Motilidade (Ez rápidos+muito rápidos)	≥40%
Morfologia (% formas normais)	≥40%
Vitalidade	≥60%
Espermatogónias, espermátides 1 e 2, espermátides/100 Ez	<3
Leucócitos/ml	<10^6
Aglutinação	ausente
Frutose	8-28 mMol/l
Ácido cítrico	10-35 mMol/l

Usando estes valores, Bostofte et al. (1984) e Steinberger (1984) observaram que cerca de 25% dos homens que procriaram tinham uma concentração (número de espermatozóides/ml), morfologia e/ou motilidade "anormais".

Os resultados de Van der Ven et al. (1986) corroboraram estas observações: usando apenas a motilidade como parâmetro, 85% das amostras "normais" e 73,9% das "anormais" fecundaram oócitos "in vitro", fecundação que também foi obtida por 86,2% e 60% dos espermas com morfologia "normal" e "anormal", respectivamente.

Após a fase pré-ejaculatória, que corresponde às secreções das glândulas bulbo-uretrais e das glândulas de Littré, a primeira porção do ejaculado é sobretudo composta por secreções de origem prostática (30% do ejaculado) e epidídimo-testicular (5%), ao passo que as secreções das vesículas seminais constituem a parte final e maioritária do ejaculado (65%). O interesse do estudo bioquímico do esperma justifica-se pela secreção exclusiva de certas substâncias por parte das glândulas acessórias, sendo exemplo o ácido cítrico, a fosfatase ácida e o zinco (próstata), a frutose (vesículas seminais) e a carnitina e acetilcarnitina (epidídimo).

A importância do plasma seminal não está ainda bem estabelecida, parecendo, por exemplo, que o líquido prostático não auxilia apenas o início da motilidade dos espermatozóides como também os protege dos aparentes efeitos deletérios das vesículas seminais (Eliasson, 1976). O doseamento dos marcadores bioquímicos em regra estudados - a frutose e o ácido cítrico - não tem sido valorizado na interpretação das oligo, asteno, teratozoospermias, ao contrário do que acontece nos processos inflamatórios, infecciosos ou não, das vesículas seminais e da próstata -

onde os respectivos marcadores biológicos podem ter valores mais baixos - e nos casos de oclusão das vias espermáticas, em que o doseamento da frutose e ácido cítrico permite situar o nível da obstrução: epidídimo-deferencial se estes marcadores estão normais e nos canais ejaculadores se o valor da frutose é nulo ou muito baixo e o ácido cítrico está normal ou elevado; níveis baixos de frutose podem também dever-se a uma ejaculação incompleta ou retrógrada e a sua ausência aponta para a agenesia das vesículas seminais.

Lunenfeld (1984) refere que, dos parâmetros avaliados por rotina (número, morfologia, motilidade) é o número de espermatozóides que apresenta uma correlação estatisticamente significativa com a infertilidade: David et al. (1979) apresentam um risco relativo de infertilidade de 10,3 quando a concentração de espermatozóides é inferior a 10 milhões/ml, enquanto Feneux et al. (1986) mostram que com um número de espermatozóides inferior a 1 milhão/ml os casais têm 10 e 30% de possibilidades de obter uma gravidez durante, respectivamente, um e três anos.

O insuficiente valor prognóstico que do ponto de vista clínico estes dados proporcionam, assim como a valorização discrepante conferida sobretudo à morfologia dos espermatozóides, conduziu à pesquisa de meios laboratoriais de avaliação da capacidade fecundante do esperma.

Prova de penetração nos oócitos do Hamster

A prova de penetração dos espermatozóides humanos nos oócitos do Hamster aproveita a propriedade excepcional destes em ter a sua especificidade ao nível da zona pelúcida e não da membrana plasmática. Introduzido por Yanagimachi (1976), não viu concretizada a expectativa de se tornar a prova ideal na avaliação do poder fecundante dos espermatozóides humanos dada a sua variabilidade mesmo intra-individual e a observação de provas sempre negativas em homens com fertilidade provada (Martin et al. 1983; Junca et al. 1982). A discordância dos resultados obtidos pelas diversas equipas internacionais verifica-se também na correlação entre a prova e a taxa de fecundação dos oócitos humanos "in vitro", cujos limites são a correlação boa (Ausmanas et al. 1985) e a nula (Kusan et al. 1987). Estes últimos concluem que esta prova é um "pobre indicador" do resultado da fertilização dos oócitos humanos "in vitro" e que, portanto, não serve para eliminar doentes de um programa de fertilização "in vitro" (FIV).

Prova de sobrevivência dos espermatozóides

A prática de fertilização "in vitro" humana permitiu a Mandelbaum et al. (1984) observar a correlação existente entre a motilidade pós-capacitação e a capacidade fecundante do esperma "in vitro". Surgiu assim a prova de sobrevivência dos espermatozóides, que estabelece a relação entre a percentagem do número de espermatozóides móveis/ml

antes e após 17h de cultura. Mandelbaum et al. (1987) observaram que os excepcionais espermas normais com sobrevivência nula são todavia fecundantes em 72% dos casos, enquanto os espermas anormais apenas o são em 20%, o que proporciona uma significativa diferença entre os dois grupos; para os referidos autores uma prova de sobrevivência nula impede a realização da FIV em 20% dos homems com esperma anormal, pois a possibilidade de fecundar "in vitro" os oócitos humanos é consideravelmente reduzida.

Prova de hipo-osmolaridade

A assunção da importância da membrana plasmática do espermatozóide no processo de capacitação, reacção acrossómica e fusão dos gâmetas está na base da prova de hipo-osmolaridade, descrita por Jeyendran et al. (1984), indicadora da integridade funcional da membrana do espermatozóide, e com os resultados da qual tem sido observada uma alta correlação com a capacidade de fertilização "in vitro" dos espermatozóides (Van der Ven et al. 1986).

B. ESTUDO CITOGENÉTICO

O carácter indiscutível da etiologia cromossómica na infertilidade masculina tem conduzido a múltiplos trabalhos procurando a sua quantificação. Em 1972, Jacobs concluiu que aproximadamente um terço das anomalias cromossómicas diagnosticadas na população humana, calculadas em 7% das gravidezes diagnosticadas, eram resultantes de espermatozóides cromossomicamente anormais. Portanto, no ejaculado de um indivíduo de cariótipo somático normal, cerca de 2% dos espermatozóides seriam geneticamente anormais. O incremento destas frequências tem sido uma constante desde que Rudak et al. (1978) descreveram uma técnica que permite a análise directa da constituição cromossómica dos espermatozóides humanos, através da fertilização dos oócitos do Hamster e posterior estudo cromossómico do pronúcleo masculino. Martin et al. (1983), ao estudar o cariótipo de 1000 espermatozóides humanos, originários de 2 grupos de indivíduos - de fertilidade provada e não provada - obtiveram em relação aos dois grupos, respectivamente, uma frequência de anomalias cromossómicas de 6,9 e 10,8%. Brandriff et al. (1985) estudaram a constituição cromossómica de 2468 espermatozóides humanos, tendo obtido uma frequência global de anomalias cromossómicas de estrutura de 7,7% e 1,7% de aneuploidias. Finalmente, Martin et al. (1987) determinaram o cariótipo de 1582 espermatozóides de 30 indivíduos de fertilidade provada, obtendo uma frequência média de

anomalias cromossómicas de 10,4% - 4,7% de aneuploidias e o restante correspondendo a alterações estruturais, sobretudo roturas cromossómicas.

Desde que Ferguson-Smith et al. (1957) introduziram o cariótipo de linfócitos no protocolo de estudo do homem infértil, múltiplos trabalhos têm demonstrado a repercussão das anomalias cromossómicas somáticas na infertilidade masculina, embora a incidência destas anomalias seja variável, o que resulta fundamentalmente dos diferentes critérios de selecção dos vários grupos avaliados. Assim, num grupo de 2247 homens inférteis, seleccionado por Tiepolo et al. (1980), a frequência total de anomalias cromossómicas foi de 8,9% (7,3% de heterossomopatias e 1,6% de autossomopatias), mas baixou para 2,1% (1,4 e 0,7% de hetero e autossomopatias, respectivamente) em 2372 homens inférteis não seleccionados (Chandley, 1979).

Os resultados obtidos por Chandley revelam que a incidência das anomalias cromossómicas "major" na população masculina infértil (aneuploidias, translocações, inversões e outras alterações estruturais) foi 3 vezes superior à obtida por Jacobs et al. (1974) em 7849 recém-nascidos do sexo masculino (quadro I-3). Os polimorfismos cromossómicos não foram incluídos nestas percentagens porque, segundo Chandley (1983), a sua frequência é semelhante na população masculina infértil e na população geral. A análise do quadro I-3 permite observar que os homens 47,XXY (síndrome de Klinefelter), os portadores de translocações

recíprocas e de cromossomas marcadores ou supranumerários são, respectivamente, cerca de 9, 5,5 e 12 vezes mais frequentes na população masculina infértil que na população geral. A frequência semelhante entre translocações recíprocas e robertsoneanas está de acordo com os valores apresentados por Jacobs et al. (1974) que referem uma incidência aproximada de 1,5 translocações autossómicas por 1000 recém-nascidos do sexo masculino. Todavia, a importância relativa dos dois tipos de translocação nos indivíduos inférteis é controversa, apresentando alguns autores uma maior frequência das translocações recíprocas (Chandley et al. 1975 e 1979; Chandley, 1983; Koulischer e Schoysman, 1974), enquanto noutros estudos há predomínio das translocações robertsoneanas (Kjessler, 1966; Hendry et al. 1976; Abyholm e Stray-Pedersen, 1981).

QUADRO I-3

Frequência de anomalias cromossómicas em 2374 homens inférteis e em 7849 recém-nascidos do sexo masculino

	Frequência/1000	
	Homens inférteis	R.N.
Total de anomalias	21,50	7,00
Heterossomopatias	13,91	3,05
47,XXY	10,11	1,15
47,XYY	2,10	1,27
Translocações robertsoneanas	1,69	0,76
Translocações recíprocas	4,22	0,76
Cromossomas marcadores ou supranumerários	1,69	0,13

Adap. Chandley, 1983

Outro facto muito importante é a estreita relação entre a frequência das anomalias cromossómicas e o número de espermatozóides. Na realidade e ainda de acordo com o citado estudo de Chandley (1983), 15,38% dos azoospérmicos eram cromossomicamente anormais (12,85% deles com cariótipo 47,XXY), diminuindo a incidência das anomalias cromossómicas à medida que o número de espermatozóides aumentava (quadro I-4).Esta tendência é um elemento comum aos vários trabalhos publicados, diferindo estes, sobretudo, na incidência das anomalias cromossómicas nos indivíduos oligozoospérmicos -

Chandley (1983, referência a observação pessoal), e Abyholm e Stray-Pedersen (1981): 4 e 4,4% de anomalias cromossómicas quando o número de espermatozóides era inferior, respectivamente, a 20x10^6 /ml e 10x10^6 /ml.

QUADRO I-4

Frequência de anomalias cromossómicas em 2275 homens em relação com o número de espermatozóides

Nº Ez.x10^6	% anomalias cromossómicas
0	15,38
1- 20	1,76
21- 60	0,94
21-100	0,70
100	0,20

Adap. Chandley, 1983

Após estas notas prévias, que pretendem introduzir e exprimir a importância das anomalias cromossómicas como causa de infertilidade masculina, analisaremos sucessivamente as anomalias, de número e de estrutura, mais frequentemente observadas.

Anomalias cromossómicas de número (aneuploidias)

1 - Síndrome de Klinefelter

A aneuploidia mais frequente nos indivíduos inférteis do sexo masculino provoca o síndrome de Klinefelter, cujo cariótipo habitual é 47,XXY. A identificação desta anomalia cromossómica com o síndrome (1942) foi a primeira demonstração, no Homem, da associação entre uma anomalia cromossómica e a infertilidade masculina. A incidência na população masculina geral é de 1 a 1,27 por 1000 (Jacobs et al. 1974; Chandley, 1983), tornando-se, como vimos, muito mais frequente na população masculina infértil - 10,11 por 1000 (Chandley, 1983). Em regra, estes indivíduos são azoospérmicos e os testículos apresentam-se pequenos, hialinizados e com aplasia ou bloqueio da espermatogénese. Porém, existem observações, por biópsia testicular, de espermatogénese completa (Grabski et al. 1979) e, inclusivamente, da presença de espermatozóides no ejaculado (Kjessler, 1966; Foss e Lewis, 1971). Nestes casos, é possível que uma linha celular diplóide 46,XY se tenha formado no epitélio germinativo, dando origem à proliferação de espermatócitos XY (Burgoyne, 1978).

O mecanismo pelo qual a constituição cromossómica 47,XXY provoca infertilidade parece relacionar-se com o fenómeno de dosagem génica, sendo provável que a presença de dois cromossomas X numa célula germinativa masculina lhe confira letalidade (Burgoyne, 1978).

2 - Síndrome do metamacho

O significado do síndrome do metamacho (cariótipo mais frequente - 47,XYY) não está estabelecido. É que, embora na maioria dos casos haja fertilidade normal e os descendentes sejam em regra cromossomicamente normais, há observações contraditórias, como as de Chandley (1976), a indicar uma menor incidência do síndrome na população masculina infértil do que na população testemunha (1,88 e 1,92 por 1000), e o contrário (2,10 e 1,27 por 1000) em 1983. Por outro lado, alguns investigadores observaram alterações da maturação ou bloqueio da espermatogénese nesses indivíduos (Skakkebaek et al. 1973; Baghdassarian et al. 1975). Burgoyne (1979) sugere que as alterações da produção gamética nos homens 47,XYY são devidas à falta de emparelhamento de um dos cromossomas Y, levando esta "univalência Y" à morte dos espermatócitos I. A possibilidade dos 47,XYY terem um risco aumentado de descendentes aneuplóides, por não-disjunção secundária ou efeito inter-cromossómico, é contrariada por Benet e Martin (1988) que estudaram o cariótipo de 75 espermatozóides de um metamacho e observaram em todos eles apenas um cromossoma sexual; consequentemente, estes autores apoiam a hipótese de um cromossoma Y ser eliminado durante a espermatogénese e sugerem que os homens 47,XYY não têm um risco maior de filhos cromossomicamente anormais.

3 - Síndrome de Down

No que diz respeito às aneuploidias autossómicas, a trissomia 21 (síndrome de Down) é a única situação compatível com a sobrevivência até à idade reprodutiva. Contudo, ao contrário das mulheres - cuja fertilidade está demonstrada pelas 27 gravidezes descritas (Jagiello, 1981; Johannisson et al. 1983) - não é conhecido qualquer caso de fertilidade masculina. Esta esterilidade deve-se principalmente ao bloqueio da espermatogénese (Johannisson et al. 1983) embora, segundo Chandley (1981), estes indivíduos não devam ser considerados estéreis unicamente numa base citológica pois, nalguns casos, foram observados espermatozóides no ejaculado, por vezes em número normal (Stearns et al. 1960). Aqui, a infertilidade terá por base mais a impotência sexual do que a incapacidade de produzir número suficiente de gâmetas (Chandley, 1981). Naturalmente, embora Chandley não esclareça a sua dimensão, esta impotência sexual terá que ser encarada não apenas numa perspectiva física como também do ponto de vista psicológico e social.

Anomalias cromossómicas de estrutura

1 - Translocações recíprocas e robertsoneanas

As translocações robertsoneanas são uma forma particular de translocação recíproca onde a troca de fragmentos cromossómicos, com formação de um heterozigoto equilibrado, se verifica entre cromossomas acrocêntricos (os pares 13, 14, 15, 21, 22) com roturas em lados opostos dos respectivos centrómeros (i. e. roturas justacentroméricas, uma no braço curto e a outra no braço longo) com união dos braços longos e dos braços curtos; o cromossoma resultante da união dos braços curtos acaba por perder-se e, consequentemente, o portador de uma translocação robertsoneana possui apenas 45 cromossomas. As translocações robertsoneanas mais frequentes ocorrem entre os cromossomas do grupo D (13, 14, 15), com incidência aproximada de 1 por 1000 nado-vivos (Hamerton et al. 1972). Destas, e de acordo com Centerwall e Merrell (1975), cerca de 90% são translocações entre cromossomas não homólogos, sendo as mais frequentes entre os cromossomas 13 e 14.

Os portadores destas translocações autossómicas recíprocas, robertsoneanas ou não, não apresentam, em regra, anomalias fenotípicas pelo que são designados portadores ou heterozigotos equilibrados (Evans et al. 1978). Porém, o aumento da frequência de translocações autossómicas recíprocas em indivíduos com atraso mental tem sido sugerido por diversos autores (Jacobs, 1974; Funderburk et al. 1977; Fryns e Van den Berghe, 1979). Fryns et al. (1986), ao analisar as indicações do cariótipo em 153 indivíduos portadores equilibrados de translocações recíprocas, verificaram que em 65% dos casos o cariótipo foi feito no estudo de recém-nascidos com malformações, abortamentos de repetição, nado-mortos ou de infertilidade.

O efeito destas translocações sobre a fertilidade parece limitar-se aos heterozigotos masculinos, embora a repercussão na espermatogénese seja variável, havendo, inclusivamente, heterozigotos com fertilidade normal. A infertilidade dos portadores de translocações autossómicas pode ser devida a alterações da espermatogénese (com consequente oligo ou azoospermia) e/ou produção de gâmetas com alterações cromossómicas que não têm capacidade fecundante ou conduzem ao abortamento espontâneo do produto de concepção. Nestes casos, em vez da figura habitual do bivalente, os espermatozóides resultam da segregação anafásica de um tetravalente (no caso das translocações recíprocas) ou trivalente (nas robertsoneanas); esta segregação pode ser 2:2 (alterna, adjacente 1 e 2) ou 3:1. Na segregação alterna metade dos gâmetas formados têm uma

constituição cromossómica normal, enquanto os restantes são portadores equilibrados da translocação. Na segregação adjacente os centrómeros homólogos vão para polos diferentes (adjacente 1) ou para o mesmo polo (adjacente 2), formando-se gâmetas desequilibrados, com dissomias e nulissomias parciais. Porém, os desequilíbrios cromossómicos não se formam apenas como resultado das segregações adjacentes, afirmando Lindenbaum e Bobrow (1975) que 6 a 25% dos descendentes cromossomicamente anormais de indivíduos com translocações recíprocas equilibradas resultam da segregação 3:1.

A hipótese proposta por Jalbert et al. (1980) de que é possível prever o tipo de segregação a partir da análise do diagrama do tetravalente em paquíteno foi deduzida do estudo dos descendentes de portadores de 151 translocações recíprocas. No entanto, embora o número de observações seja ainda limitado, a análise de portadores de translocações recíprocas, robertsoneanas ou não, não tem confirmado esta hipótese. Martin (1983) realizou o estudo cromossómico dos espermatozóides de um portador equilibrado da translocação t(11;22) (q23;q11), para a qual não está descrito qualquer caso de descendentes cromossomicamente desequilibrados resultantes das segregações adjacentes 1 e 2, apesar de haver mais de 80 casos de descendência anormal por segregação 3:1 (Zackai e Emanuel, 1980). Os referidos resultados demonstraram que esta translocação 11;22 não favorece especificamente a segregação 3:1 e Martin conclui pela inviabilidade dos embriões resultantes das segregações adjacentes.

Outra possibilidade seria a de selecção "in vivo" contra os espermatozóides portadores dos produtos da segregação adjacente. Contudo, estudos realizados no rato (Epstein e Travis, 1979) e por fecundação de oócitos de Hamster por espermatozóides humanos sugerem ser pouco provável que o conteúdo cromossómico influencie a capacidade fecundante de um espermatozóide; os resultados de um estudo europeu de colaboração em que foi feito diagnóstico pré-natal por amniocentese precoce quando qualquer dos progenitores era portador de anomalias cromossómicas (Hamerton et al. 1980; Boué e Gallano, 1984) revelam cariótipo fetal desequilibrado em 11,7% quando era o pai o portador de uma translocação recíproca. Este valor, bastante inferior ao risco teórico e também inferior à frequência de anomalias cromossómicas observadas em espermatozóides de portadores de translocações recíprocas - 18,8% para a t(5;18) (p15;q21) e 31,6% para a t(6;14) (p24;q22) (Balkan e Martin, 1983) - deverá resultar da frequente morte embrionária, sendo muitas vezes o abortamento tão precoce que a gravidez não chega a ser reconhecida. No caso das translocações robertsoneanas no referido estudo europeu, não foi observada qualquer anomalia cromossómica fetal quando era o pai o portador, enquanto a frequência de espermatozóides com desequilíbrio cromossómico num caso de t(14,21) foi de 13% (Balkan e Martin, 1983b).

Deste modo, os dados existentes não apoiam a selecção espermática mas, antes, a selecção embrionária precoce. Esta hipótese é reforçada por Sonta et al. (1984)

que, utilizando também o Hamster, cruzaram fémeas cromossomicamente normais e machos portadores de uma translocação recíproca, t(2;10), e observaram não uma selecção gamética ou zigótica mas a paragem do crescimento de 9,1 a 10,8% dos embriões, numa fase muito precoce do desenvolvimento embrionário (2 células). Para os referidos autores, os resultados obtidos indicam que todos os zigotos, incluindo aqueles com genomas notavelmente desequilibrados, podem desenvolver-se pelo menos até à fase de embrião com duas células; para além disto alguns embriões cromossomicamente anormais (principalmente monossómicos) possuem ao 4º dia de gestação um número menor de blastómeros que os embriões cromossomicamente normais, podendo esta divisão celular retardada significar que a maioria dos embriões monossómicos estão destinados a morrer pouco após a implantação (Sonta et al. 1984).

No que diz respeito à frequência relativa dos vários tipos de segregação, é necessário estudar muito mais casos para se poder concluir se as diferenças observadas são apenas devidas ao reduzido tamanho das amostras ou resultam do diferente comportamento das diversas translocações recíprocas (Balkan e Martin, 1983; Martin, 1984).

Os resultados apresentados por Hamerton et al. (1980) e por Boué e Gallano (1984) permitem também afirmar que os portadores equilibrados do sexo masculino têm um número significativamente menor de filhos do que os de sexo feminino (30,6 e 39,0%, respectivamente, para as translocações robertsoneanas e recíprocas), o que vem

reforçar a ideia de que a mulher parece muito menos susceptível do que o homem às alterações gametogénicas provocadas pelas anomalias cromossómicas - um argumento mais a favor da selecção gamética preferencial.

Uma explicação para esta diferente capacidade reprodutiva dos portadores de translocações equilibradas, consoante o sexo, é a proposta por Forejt (1979), que observou na meiose de ratos do sexo masculino, portadores equilibrados de translocações autossómicas, que as configurações "em cadeia" estavam associadas com o cromossoma X apenas quando havia infertilidade. Apoiando-se na sugestão de Lifschitz e Lindsley (1972), de que o cromossoma X é inactivado durante a prófase I da meiose masculina, e no aspecto descondensado do cromossoma X quando associado com a translocação, Forejt propõe que a translocação possa interferir com a normal inactivação do cromossoma X durante a meiose. Visto que a inactivação do cromossoma X em espermatócito I será um mecanismo de controle da espermatogénese normal (Lifschitz e Lindsley, 1972), esta desrepressão do cromossoma X durante a meiose masculina originará a descontinuidade na diferenciação espermatogénica. Como os cromossomas X não são inactivados durante a oogénese, este mecanismo poderá explicar a razão pela qual as translocações não provocam infertilidade às portadoras do sexo feminino.

A interferência com a normal inactivação do cromossoma X foi também referida para justificar o bloqueio da espermatogénese num indivíduo com o síndrome de Down (47,XY,+21), propondo Johannisson et al. (1983) que a interferência resulta da associação do cromossoma 21 adicional com o bivalente sexual. Por outro lado, Rosenmann et al. (1985) consideram que, em virtude de este mecanismo depender da presença de segmentos cromossómicos não emparelhados, não apenas as translocações (recíprocas e não recíprocas), como também os cromossomas marcadores supranumerários e polimorfismos cromossómicos, poderão ter efeitos negativos no bivalente X-Y e desse modo interferir com a gametogénese.

Não é possível, todavia, chegar a uma conclusão definitiva, até porque não se pode excluir a possibilidade das observações referidas poderem representar consequências citológicas e não causa de bloqueio da espermatogénese.

2 - Translocações não recíprocas

As translocações não recíprocas são uma forma de anomalia cromossómica de estrutura, nas quais há transferência de um fragmento de um cromossoma para outro.

As translocações entre autossomas e o cromossoma Y têm uma incidência de aproximadamente 0,5 por 1000 (Nielson e Rasmussen, 1976). Na revisão apresentada em 1979, Smith et al. dividem as 50 translocações descritas até então na

literatura em dois grupos: translocações entre acrocêntricos e o cromossoma Y e translocações entre autossomas não acrocêntricos e o Y. Os doentes pertencentes ao primeiro grupo apresentavam um fenótipo variável (atraso mental, malformações congénitas, hipogonadismo, hipospádias, síndrome de Klinefelter, etc.) e apenas 3 eram homens inférteis (Chandley et al. 1975; Laurent e Dutrillaux, 1976; Curtis, 1977); em todos os casos a translocação foi transmitida. No entanto, nenhum dos doentes estudados por Nielson et al. (1974) e Nielsen e Rasmussen (1976) apresentava qualquer anomalia fenotípica ou aumento da incidência de infertilidade ou abortamentos espontâneos em qualquer dos doentes e familiares. Baseados nisto, Smith et al. (1979) sugerem que este tipo de translocação (autossoma; cromossoma Y) será um achado acidental, não relacionado com o fenótipo ou a fertilidade, ao contrário do grupo das translocações entre cromossomas não acrocêntricos e o cromossoma Y, em que foram encontrados 7 indivíduos do sexo masculino com infertilidade, tendo a anomalia surgido de novo em todos os casos.

Os portadores de translocações entre os autossomas e o cromossoma X são invariavelmente inférteis no rato (Eicher, 1970) e na Drosophila (Lindsey et al. 1980). No homem, dos 9 adultos referidos por Mattei et al. (1982) e Madan (1983), 6 eram azoospérmicos, 1 tinha oligozoospermia grave e 2 procriaram (1 filho cada), embora apenas num haja confirmação da paternidade por marcadores genéticos. Porém, ainda mais que na situação anterior, o pequeno número de observações relatadas é insuficiente para permitir quaisquer

conclusões, o mesmo se passando com as translocações entre o cromossoma X e Y em que os 2 únicos indivíduos do sexo masculino avaliados do ponto de vista da fertilidade apresentavam azoospermia (Yamada et al. 1982).

3 - Inversões

As inversões são bastante frequentes na população geral: as pericêntricas têm uma incidência de 1 a 2% (Kaiser, 1984), 5 vezes superior à das paracêntricas (Canki e Dutrillaux, 1979).

Vários autores têm relacionado casos de inversões pericêntricas, sobretudo do cromossoma 9, com abortamentos espontâneos e infertilidade (Boué et al. 1975; Croquette et al. 1979). Dutrillaux e Guegen (1971) observaram também uma inversão pericêntrica do cromossoma 7 num indivíduo com oligozoospermia, tendo explicado esta diminuição da actividade meiótica por "aneussomia de recombinação".

Ao contrário do que acontece com as inversões pericêntricas do cromossoma 9, as inversões pericêntricas do cromossoma 1 são raras. Em toda a literatura mundial estão apenas descritos 4 casos de inversão pericêntrica do cr. 1 relacionada com a infertilidade (Giraldo et al. 1981; Tóth et al. 1982; Rivera et al. 1984; Barros et al. 1986).

Os possíveis mecanismos etiopatogénicos propostos para explicar as anomalias da espermatogénese são as alterações da sinapse (Pearson et al. 1970; Dutrillaux e Guegen, 1971; Croquette et al. 1979; Joseph e Thomas, 1982), o efeito de posição (Ford, 1970; Cacheiro et al. 1974; Léonard et al. 1979) e a interferência com a inactivação do bivalente X-Y (Lyfschytz e Lindsley, 1972; Forejt e Gregorová, 1977; Forejt, 1979; Chandley, 1981). Destas hipóteses, apenas a última poderá explicar por que razão estas anomalias cromossómicas perturbam seriamente a meiose masculina e não causam efeitos negativos na oogénese.

A infertilidade destes indivíduos poderá ser, então, causada quer pela incapacidade fecundante dos gâmetas ou inviabilidade dos embriões (ambas consequência da "aneussomia de recombinação"), quer por deficiência da espermatogénese.

Polimorfismos cromossómicos

Os polimorfismos cromossómicos consistem na ocorrência, numa população, de cromossomas com duas ou mais formas estruturalmente diferentes (Rieger et al. 1968) mas sem o significado de anomalia estrutural. A sua interpretação é um dos capítulos da citogenética em que as observações antagónicas se sucedem e a discussão persiste, sendo controverso se estas variações cromossómicas, com a frequência de 2 a 3% (Lubs e Ruddle, 1970), aumentam o risco de abortamentos de repetição, malformações congénitas nos

descendentes ou diminuição da capacidade reprodutiva. Tsenghi et al. (1976) revelaram que, na população com abortamentos de repetição, os polimorfismos cromossómicos ocorrem em 7,79%, valor 3 vezes superior ao da população geral. Relativamente à repercussão na aptidão biológica, Carothers et al. (1982) não encontraram qualquer diminuição, mas Tho et al. (1982) demonstraram uma incidência de 12% de polimorfismos em indivíduos inférteis, o que representa mais de 4 vezes a frequência na população geral - 2,6% (Court-Brown, 1967).

As variações do cromossoma Y são os polimorfismos mais frequentes na população masculina. O aumento do tamanho do cromossoma (Yq+) em 2% dos homens (Court-Brown, 1967) e a incidência das deleções varia de 0 a 0,25% (Ratcliffe et al. 1970; Lubbs e Ruddle, 1970). Em 1974, Koulischer e Schoysman sugeriram a associação entre deleções do cromossoma Y e infertilidade masculina, e Genest (1979), num estudo de casais com abortamentos de repetição, encontrou mais abortamentos espontâneos nos casais em que o homem tinha o cromossoma Yq+: 19,6% dos indivíduos eram 46,XYq+ enquanto na população geral a frequência deste polimorfismo não excedia 1,5%. Todavia, a maioria dos investigadores considera as variações do Y sem importância significativa, pois são frequentemente observadas nos homens férteis. A discordância na interpretação destas observações mantém-se, sendo de importância fundamental para a sua clarificação o estudo dos familiares masculinos, procurando averiguar se

estas variações do Y são novas mutações que podem causar infertilidade ou são herdadas e, consequentemente, não afectam grandemente a aptidão biológica.

As variações morfológicas das zonas de heterocromatina constitutiva (demonstradas pelas bandas C) são consideradas polimorfismos pois ocorrem com elevada frequência nas populações humanas - 1qh+ em 0,5%, 9qh+ em 1,2% e 16qh+ em 0,88% (Ferguson-Smith, 1974) -, não estão associadas a alterações do desenvolvimento e são hereditárias (Ghosh e Singh, 1976). Estas variações localizam-se em regiões ricas em DNA de sequências repetitivas, que provavelmente não possuem genes estruturais, sendo impreciso o seu significado funcional e biológico. Para alguns, estas variações poderão resultar de um "crossing-over" desigual das sequências repetitivas de DNA dispostas em "tandem", cujo aumento será tolerado sem consequências fenotípicas. Todavia, também para estes polimorfismos há quem estabeleça relações com a patologia: Kunze e Tolksdorf (1974) e Kunze e Maw (1975) referem maior incidência de 1qh+ e 9qh+ em crianças com malformações múltiplas que em recém-nascidos fenotipicamente normais. No entanto, a opinião generalizada é a de que estes polimorfismos não serão responsáveis por quaisquer malformações, podendo, quando muito e devido à eventual dificuldade de emparelhamento meiótico, prejudicar a capacidade fecundante e predispôr para abortamentos espontâneos, com redução da aptidão biológica.

Mutações meióticas

O estudo histológico testicular dos indivíduos inférteis permite verificar frequentemente que a proporção dos espermatócitos 2, espermátides e espermatozóides relativamente às espermatogónias e espermatócitos 1 está diminuída, o que significa que há um bloqueio da meiose. Este bloqueio pode ter uma causa genética, pelo que o estudo citogenético do tecido testicular, com a realização do cariótipo de meioses e o estudo dos complexos sinaptonémicos, que permitem o emparelhamento dos cromossomas homólogos na profase da 1ª divisão meiótica, é importante no diagnóstico e prognóstico de muitas situações de esterilidade e infertilidade. Assim se observarão mutações meióticas - assinapse (falta de emparelhamento dos cromossomas) ou dessinapse (emparelhamento anormal) - e, nas translocações, o trivalente ou tetravalente que formam os cromossomas comprometidos: uma configuração "em cadeia" tem prognóstico desfavorável, aparentemente por favorecer as segregações adjacentes 1 e 2 (com formação de células cromossomicamente desequilibradas), enquanto a configuração "em anel" facilitará a segregação alterna (Chandley et al. 1976). Além disso, há uma correlação entre o número de espermatozóides e a percentagem de configurações "em cadeia" (Chandley, 1981).

O estudo meiótico efectuado a 1100 homens estéreis e inférteis (Egozcue et al. 1983) revelou 4,35% de mutações meióticas, sobretudo dessinapses (3,72%). Nas dessinapses há que distinguir três situações:

1) lesão de todos os bivalentes na totalidade das células estudadas (dessinapse completa total),

2) lesão de todos os bivalentes mas não em todas as células (dessinapse completa parcial),

3) anomalias do emparelhamento limitadas a alguns bivalentes (dessinapse individual de bivalentes) (Templado et al. 1981).

Naturalmente, o prognóstico destas mutações é desfavorável, sobretudo na dessinapse completa total, sendo estas anomalias resistentes a qualquer terapêutica.

II. ESTUDO DO ESPERMA

Material e métodos

O estudo do esperma realizou-se a 426 indivíduos, com idade entre os 24 e os 43 anos (média ± desvio padrão = 31,5 ± 4,9), queixando-se de infertilidade conjugal mínima de 1 ano, e cuja história clínica não integrasse quaisquer factores de alteração da espermatogénese (Quadro I-1); deste modo foram excluídos desta análise todos os espermas contendo leucócitos e imagens de aglutinação, dada a possibilidade de reflectirem situações infecciosas ou de auto-imunidade.

A colheita do esperma foi sempre realizada por masturbação - para um frasco de vidro esterilizado e aquecido, com cerca de 7 cm de diâmetro - após um período de abstinência sexual de 3 a 5 dias; o coito interrompido, pela possibilidade de perda parcial do ejaculado e contaminação vaginal (bacteriana e pH ácido), e a ejaculação em preservativos, potencialmente espermicidas, não foram autorizados. Aos doentes era explicada a importância do cumprimento destas normas, assim como a invalidade da amostra incompleta (normalmente a 1ª porção do ejaculado contém a mais alta concentração de espermatozóides e a melhor motilidade); era permitida a colheita no domicílio dos doentes desde que o frasco fosse fornecido pelo laboratório e a amostra entregue no máximo 30 minutos após a colheita, sendo mantida a uma temperatura entre os 20-37°C durante o intervalo.

I. Estudo macroscópico

A. Coloração e cheiro

O esperma normal tem uma côr branco-grisalho ou amarelo-grisalho e um cheiro "sui generis". Um aspecto claro, transparente, traduzirá uma concentração muito baixa de espermatozóides ou até azoospermia. A côr fortemente amarelada ou esverdeada e, eventualmente, um cheiro fétido podem significar infecção; uma côr castanha ou avermelhada indica a presença de eritrócitos, em consequência de traumatismo ou infecção.

B. Liquefacção

Deve estar completa 30 minutos depois da ejaculação, mantendo-se o esperma à temperatura ambiente. O esperma normal pode conter pequenas massas gelatinosas cuja liquefacção é mais tardia ou não se verifica, sem que isto tenha um significado patológico.

C. Volume

O volume do ejaculado é medido aspirando toda a amostra para uma pipeta graduada; o valor normal oscila entre os 2 e 6 ml.

D. Viscosidade

Avalia-se aspirando o esperma para uma seringa de insulina ou para uma pipeta de Pasteur, observando-se o comprimento do fio de esperma; o esperma normal exterioriza-se da agulha em pequenas gotas enquanto nos casos de viscosidade anormal a "gota" forma um fio com mais de 2 cm de comprimento.

E. pH

Após a liquefacção, uma gota de esperma é colocada sobre uma fita de leitura de pH (limites: 6,5 - 10); após 1 minuto a côr da zona impregnada é comparada com as cores padrão. O pH normal varia entre 7,2 e 7,8; um valor superior a 7,8 pode significar infecção e se é inferior a 7 numa amostra com azoospermia é provável uma agenesia ou disgenesia dos canais deferentes, vesículas seminais ou epidídimos.

II. Estudo microscópico

A fase inicial da investigação microscópica do esperma é uma observação geral, tendo como objectivos estimar a concentração e a motilidade dos espermatozóides assim como registar a presença de outras células e de imagens de aglutinação dos espermatozóides.

A. Motilidade

A motilidade dos espermatozóides é determinada quantitativa e qualitativamente logo após a liquefacção do esperma, em microscópio de luz a uma ampliação de 400x. O estudo é realizado à temperatura ambiente, de preferência compreendida entre os 18 e os 24°C; no caso de a temperatura ser inferior as lâminas são aquecidas previamente na estufa (37°C). São avaliados cerca de 10 campos microscópicos, separados e escolhidos ao acaso, e a motilidade dos espermatozóides estabelecida em percentagem relativa às seguintes categorias:

-motilidade nula
-"in situ"
-progressão lenta
-progressão rápida
-progressão muito rápida

B. Número

A concentração dos espermatozóides realiza-se utilizando o hemocitómetro de Neubauer melhorado. Após homogenização, o esperma é diluído em água destilada, dependendo o título da diluição da estimativa anteriormente efectuada do número de espermatozóides. A suspensão é homogeneizada e transferida uma gota para a câmara de contagem; deixa-se sedimentar as células durante 2 - 5 minutos fazendo-se em seguida a contagem dos espermatozóides

- com uma ampliação microscópica de 200 ou 400 vezes - e os cálculos da respectiva concentração. Não são consideradas na contagem as caudas isoladas dos espermatozóides.

C. Morfologia

O estudo morfológico dos espermatozóides foi realizado em microscopia óptica (ampliação 1000 X) após estender uma gota de esperma numa lâmina, deixar secar ao ar, fixar com metanol e corar pelo método de Papanicolaou - Shorr.

O espermatozóide normal apresenta uma cabeça oval, de contornos regulares e com o acrossoma revestindo mais de um terço da porção superior da cabeça. O comprimento da cabeça está entre os 3 e os 5 μm e a largura varia entre os 2 e os 3 μm; a largura deve estar compreendida entre metade e os dois terços do comprimento. A peça intermediária é delgada, correspondendo a menos de um terço da largura da cabeça, rectilínea e de contornos regulares; deve estar alinhada com o eixo longitudinal da cabeça e tem aproximadamente 7 - 8 μm de comprimento. A cauda é também delgada, não enrolada, com contornos regulares e comprimento mínimo de 45 μm.

As anomalias da morfologia e as células jovens da linha espermática presentes no ejaculado foram classificadas do seguinte modo:

macrocéfalos
microcéfalos
acéfalos
bicéfalos
alongados
pontiagudos
sem acrossoma
com microacrossoma
cabeça irregular
cabeça em lise
anomalias do colo
anomalias da peça intermediária
acaudados
bicaudados
cauda curta
cauda enrolada
imaturos
com restos citoplasmáticos

espermatogónias
espermatócitos I
espermatócitos II
espermátides

D. Vitalidade

A utilização de um corante supravital - eosina Y - permite distinguir os espermatozóides vivos dos mortos, técnica que se baseia no princípio de que as células mortas possibilitam a entrada do corante para o espaço intracelular devido às lesões da membrana plasmática do espermatozóide. Todavia, e atendendo a este princípio, mais do que a vitalidade celular, esta prova avalia a integridade anatómica da membrana.

Mistura-se uma gota de esperma (aproximadamente 0,1 ml) com um volume igual de uma solução isotónica de eosina Y a 1%; após 1 - 2 minutos realiza-se o esfregaço,

deixa-se secar ao ar e faz-se a leitura ao microscópio a ampliação de 400 X. Os espermatozóides mortos e/ou com alterações estruturais da membrana surgem corados de vermelho, ao contrário dos vivos e/ou com a membrana estruturalmente íntegra.

E. Prova de hipo-osmolaridade

Esta prova foi realizada de acordo com a técnica descrita por Jeyendran et al. (1984), misturando 0,1 ml de esperma total com 1 ml de solução hipo-osmótica (preparada pela combinação de 7,35 g de citrato de sódio 2H2O e 13,51 g de frutose em 1 l de água destilada). Após 30 - 60 minutos de incubação a 37°C é feita a observação microscópica (ampliação de 400 X) e determinada a percentagem de espermatozóides com o enrolamento típico da cauda (fig. II-1), sendo a prova considerada normal quando a percentagem de espermatozóides reactivos é igual ou superior a 60% (Van der Ven et al. 1986).

F. Prova de sobrevivência dos espermatozóides

Efectuada a 78 indivíduos , escolhidos ao acaso (à excepção da presença de leucócitos ou de imagens de aglutinação que implicavam a exclusão) segundo a técnica seguinte:

- misturar 1 ml de esperma total com 3ml de meio de cultura (MC - HAM F-10 + 20% de soro de embrião de vitela + 1% de penicilina G e estreptomicina)

- centrifugar durante 10 minutos a 1.500 rpm

- rejeitar o sobrenadante

- ressuspender o sedimento com 3 ml de MC

- centrifugar durante 10 minutos a 1.500 rpm

- rejeitar o sobrenadante

- adicionar lentamente ao sedimento 1 a 4 ml de MC (conforme o número de espermatozóides da amostra)

- deixar migrar os espermatozóides para a porção superior do MC durante 30 a 60 minutos, numa estufa a 37°C e com uma atmosfera de 95% ar e 5% CO2

- retirar os 2/3 superiores do sobrenadante, homogeneizar e fazer a leitura da motilidade e do número de espermatozóides móveis

- preparar um tubo de cultura com 100.000 - 200.000 espermatozóides móveis por ml de MC

- incubar durante 17 h - 37°C, 95% ar, 5% CO2

Fig. II-1 Reacção dos espermatozóides à hipo-osmolaridade: enrolamento típico da cauda.

- fazer a leitura da motilidade, determinando a percentagem de espermatozóides rápidos e muito rápidos.

A sobrevivência dos espermatozóides corresponde à relação em percentagem entre o número de espermatozóides rápidos e muito rápidos por ml antes e após as 17 h de incubação:

$$\text{sobrevivência} = \frac{\%\ \text{Ez móveis após a cultura}}{\%\ \text{Ez móveis antes da cultura}} \times 100$$

A prova é considerada positiva quando a sobrevivência é superior a 15% e negativa quando é igual ou inferior a 15% (Mandelbaum et al. 1984).

III. Estudo bioquímico

A frutose foi doseada segundo a técnica de Roe modificada por Mann (1981), que se baseia na medição da côr rosa-violácea surgida ao aquecer a frutose com resorcina alcoolizada em meio ácido.

O método utilizado para a determinação do ácido cítrico foi o de Chambon modificado (Brassesco, 1983), que consiste na medição colorimétrica do amarelo desenvolvido após aquecimento a 37°C, na presença de piridina e anidrido acético.

Resultados

Na população masculina infértil por nós estudada (total de indivíduos: 426) foi determinada a média e o desvio padrão da motilidade (1) - soma dos espermatozóides rápidos e muito rápidos, número de espermatozóides/ml (2), prova de hipo-osmolaridade (3) e percentagem de espermatozóides morfologicamente normais (4) - quadro II-1.

QUADRO II-1

Motilidade(1) %	Número(2) x 10^6/ml	P. hipo-osm.(3) %	Morfologia(4) %
m=26,46	m=54,65	m=68,02	m=31,63
s=17,930	s=64,734	s=15,412	s=19,024

Os gráficos das frequências de distribuição da motilidade (fig. II-1) e do número (fig. II-2) apresentam uma inclinação para a esquerda, o primeiro com uma significativa frequência de zero e próxima de zero e o segundo também com uma elevada percentagem de oligozoospermia grave, observações que não surpreendem pois trata-se de um grupo infértil. A frequência de distribuição da morfologia (fig. II-4), de tipo unimodal, não apresenta tão marcada inclinação para a esquerda como as anteriores, nomeadamente o elevado número próximo de zero, o que é

provavelmente devido à não descrição percentual da morfologia nos casos de oligozoospermia muito grave - concentração inferior a 1 x 10^6/ml. Esta interpretação parece-nos firmemente sustentada pela altissimamente significativa correlação que observamos entre os dois parâmetros - número e morfologia (quadros II-1 e II-2; fig. II-9). A prova de hipo-osmolaridade proporciona um gráfico com uma frequência de distribuição bimodal (fig. II-3), com as médias de 45 - 55% e 65 - 75%, valores respectivamente anormal e normal.

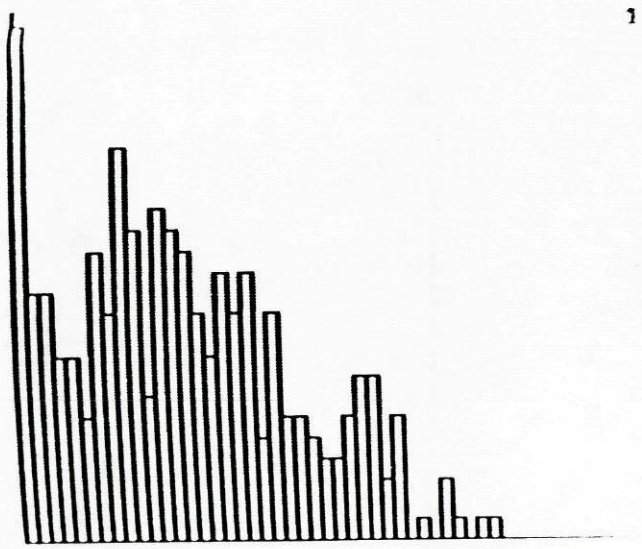


Fig. II-1 Frequência de distribuição da motilidade dos Ez.

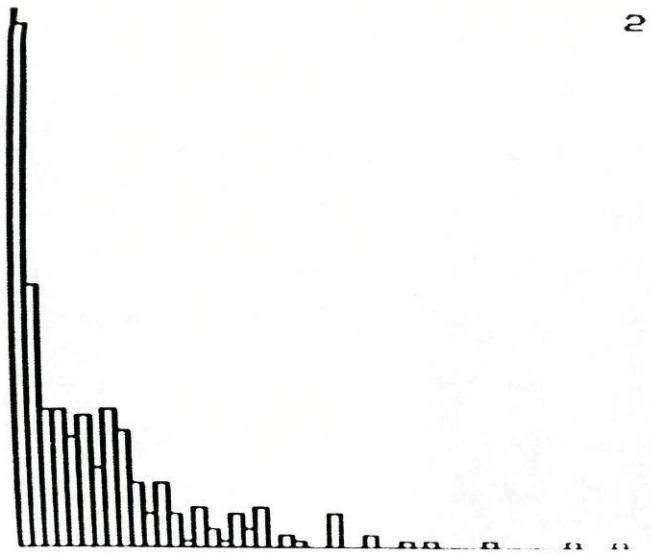


Fig. II-2 Frequência de distribuição do número de Ez.

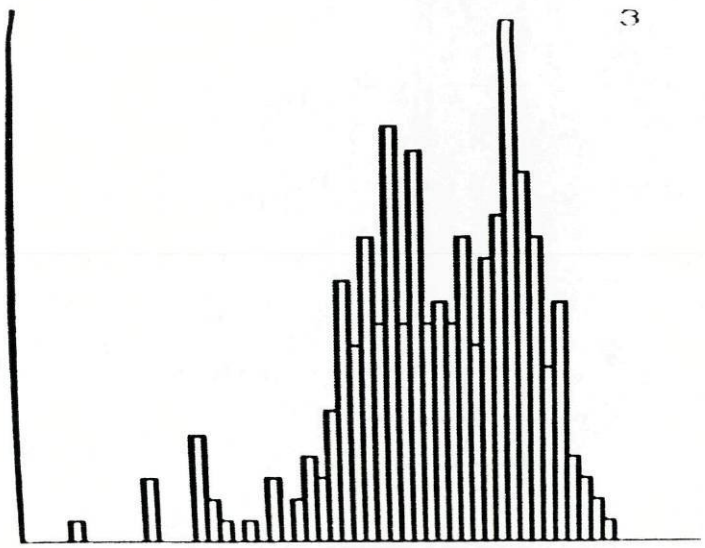


Fig. II-3 Frequência de distribuição da prova de hipo-osmolaridade.

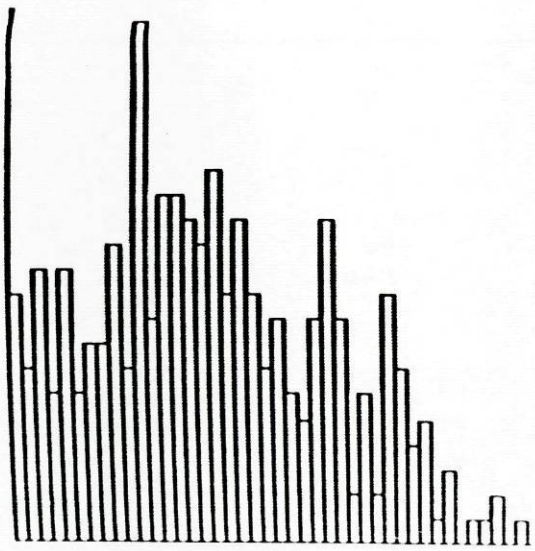


Fig. II-4 Frequência de distribuição da morfologia dos Ez.

A hipótese de existir ou não uma inter-relação estatisticamente significativa entre a motilidade (1), número (2), prova de hipo-osmolaridade (3) e morfologia (4) foi estudada pelo cálculo dos coeficientes de correlação (r) linear de Pearson - quadro II-2 - e dos coeficientes de correlação parciais - quadro II-3.

QUADRO II-2

	Coef. correlação linear	t - Student	P
r(1,2)	0,090	1,606	>0,05
r(1,3)	0,389	6,942	<0,000001
r(1,4)	0,419	7,938	<0,000001
r(2,3)	0,257	4,439	<0,000001
r(2,4)	0,428	8,144	<0,000001
r(3,4)	0,415	7,476	<0,000001

QUADRO II-3

	Coef. correlação parcial	t - Student	P
r(1,2.3,4)	-0,0911	-1,622	>0,05
r(1,3.2,4)	0,298	5,463	<0,000001
r(1,4.2,3)	0,341	6,299	<0,000001
r(2,3.1,4)	0,156	2,798	<0,000001
r(2,4.1,3)	0,394	7,401	<0,000001
r(3,4.1,2)	0,228	4,116	<0,000001

A comparação dos coeficientes de correlação linear e parciais permite observar um valor mais baixo nestes últimos pois no seu cálculo é eliminada a influência - positiva mas parcial - dos outros parâmetros, obtendo-se um

coeficiente de correlação independente entre duas variáveis. Todavia, qualquer dos valores traduz uma correlação altissimamente significativa ($P<0,000001$) entre:

- motilidade e prova de hipo-osmolaridade ($r=0,298$)

- motilidade e morfologia ($r=0,341$)

- número e prova de hipo-osmolaridade ($r=0,156$)

- número e morfologia ($r=0,394$)

- morfologia e prova de hipo-osmolaridade ($r=0,228$).

É de referir a altíssima associação entre o número e a morfologia - a que corresponde o coeficiente de correlação mais elevado - apesar de nos casos de oligozoospermia muito grave não se ter considerado a morfologia em virtude do reduzido número de espermatozóides lidos.

A ausência de inter-relação entre a motilidade/número - o único caso em que o coeficiente de correlação não é significativo - traduz-se pela possibilidade de esboço de uma linha praticamente horizontal no gráfico de correlação entre as duas variáveis (fig. II-5), ao contrário dos restantes em que as linhas são ascendentes (fig. II-6 a II-10).

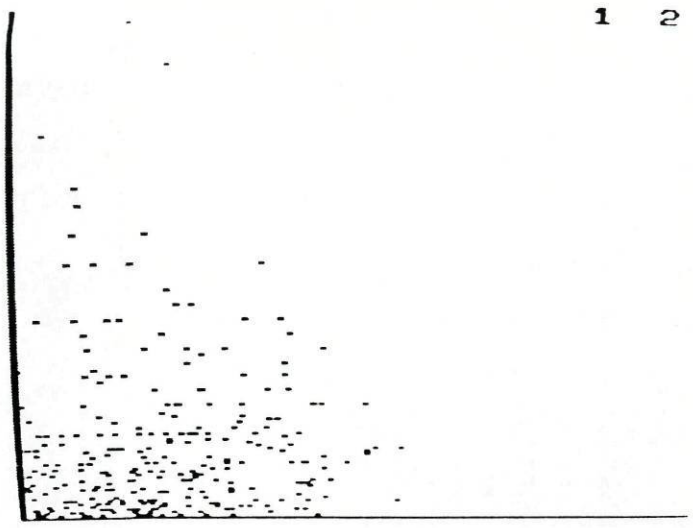


Fig. II-5 Gráfico de correlação entre a motilidade (1) e o número (2) de Ez; (1) abcissas, (2) ordenadas.

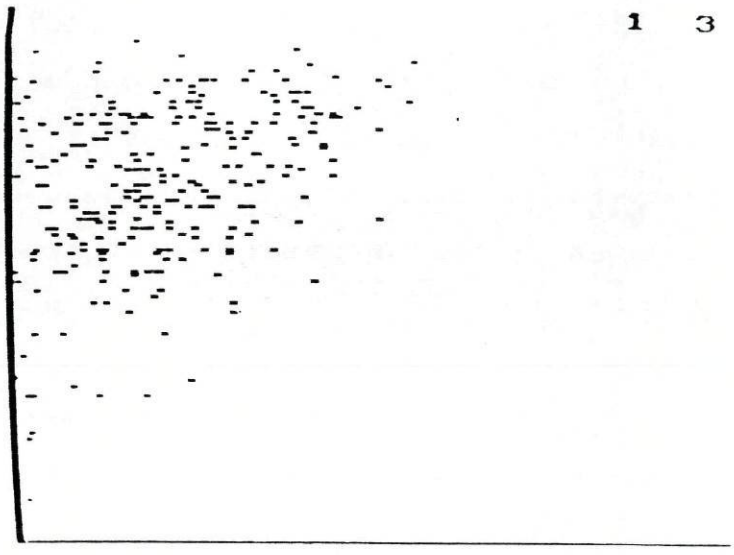


Fig. II-6 Gráfico de correlação entre a motilidade (1) dos Ez e a prova de hipo-osmolaridade (3); (1) abcissas, (3) ordenadas.

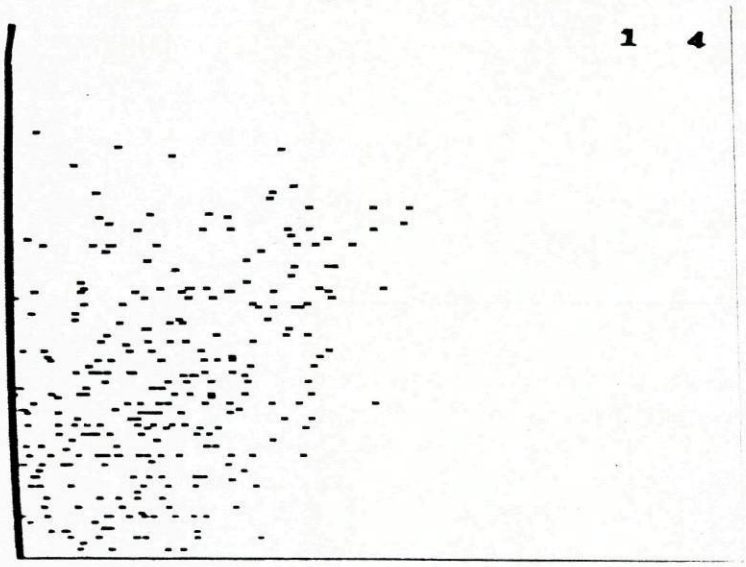


Fig. II-7 Gráfico de correlação entre a motilidade (1) e a morfologia (4) dos Ez; (1) abcissas, (4) ordenadas.

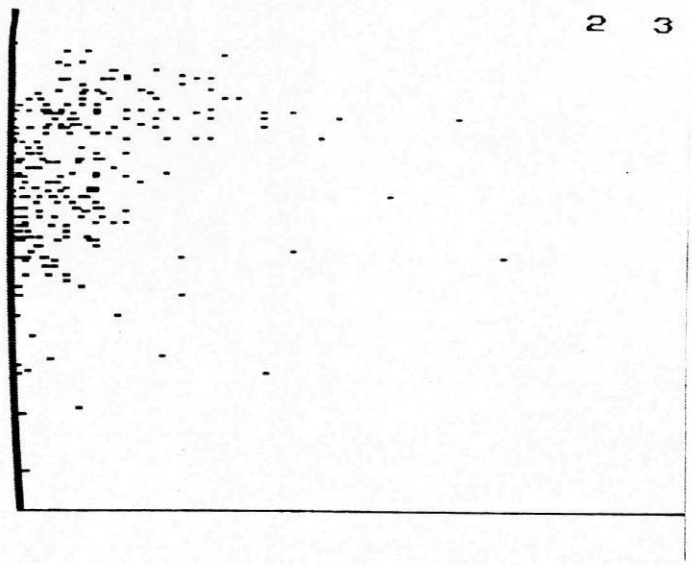


Fig. II-8 Gráfico de correlação entre o número (2) de Ez e a prova de hipo--osmolaridade (3) ; (2) abcissas, (3) ordenadas.

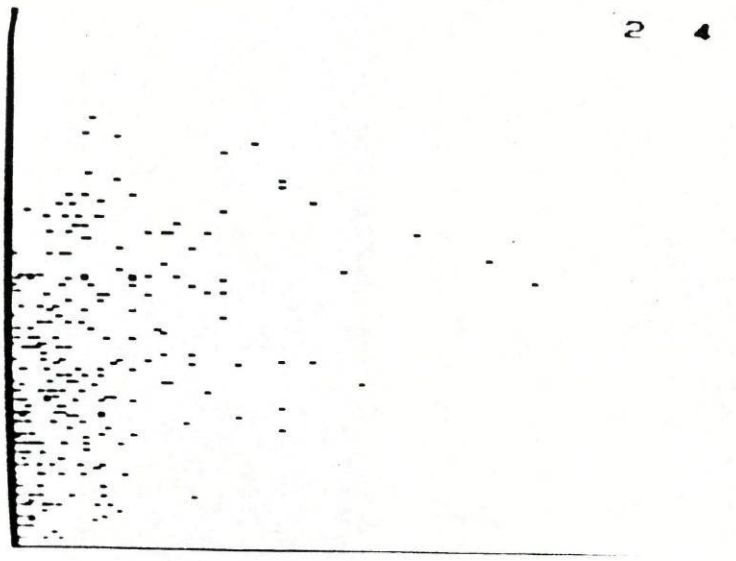


Fig. II-9 Gráfico de correlação entre o número (2) e a morfologia (4) dos Ez; (2) abcissas, (4) ordenadas.

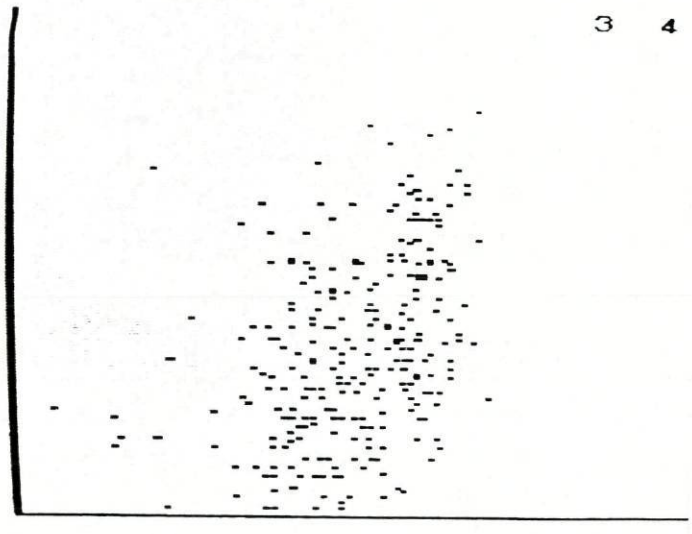


Fig. II-10 Gráfico de correlação entre a prova de hipo-osmolaridade (3) e a morfologia (4) dos Ez; (3) abcissas, (4) ordenadas.

A concretização dos coeficientes de correlação observados foi conseguida considerando para cada parâmetro - número, morfologia ou motilidade dos espermatozóides - uma divisão em 4 grupos, um normal e os outros anormais (de gravidade moderada, grave e muito grave), e relacionando-o com os restantes, a vitalidade e a prova de hipo-osmolaridade.

O NÚMERO de espermatozóides foi dividido do seguinte modo:

		Nº espermatozóides/ml
grupo 1	-------	< 1 x 10^6
grupo 2	-------	≥ 1 x 10^6 < 10 x 10^6
grupo 3	-------	≥ 10 x 10^6 < 20 x 10^6
grupo 4	-------	≥ 20 x 10^6

QUADRO II-4

	1	2	3	4
Morfologia (%)	n= 26 m= 10,1 s= 4,67	n= 59 m= 20,0 s= 5,14	n= 41 m= 24,5 s= 3,90	n=202 m= 35,6 s= 4,61

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	8,359	83	<< 0,001
1|3	13,574	65	<< 0,001
1|4	26,512	243	<< 0,001
2|3	4,733	98	< 0,001
2|4	22,273	254	<< 0,001
3|4	14,409	241	<< 0,001
1+2|3+4	21,108	326	<< 0,001

QUADRO II-5

	1	2	3	4
Motilidade (%)	n= 47 m= 12,5 s= 6,95	n= 59 m= 15,7 s= 5,87	n= 41 m= 24,1 s= 5,27	n=201 m= 26,8 s= 5,81

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	2,501	104	< 0,01
1|3	8,667	86	<< 0,001
1|4	14,541	246	<< 0,001
2|3	7,346	98	<< 0,001
2|4	12,888	258	<< 0,001
3|4	2,750	240	< 0,01
1+2|3+4	17,137	346	<< 0,001

QUADRO II-6

	1	2	3	4
Prova Hipo-osmol (%)	n= 0	n= 52 m= 58,7 s= 4,07	n= 40 m= 63,6 s= 4,65	n=197 m= 72,7 s= 2,48

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
2|3	5,457	90	< 0,001
2|4	31,157	247	<< 0,001
3|4	17,621	235	<< 0,001
2|3+4	17,536	293	<< 0,001

QUADRO II-7

1	2	3	4
Vitalidade n= 0	n= 57	n= 41	n=202
	m= 65,3	m= 74,9	m= 77,2
(%)	s= 5,45	s= 3,26	s= 2,52

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
2|3	10,013	96	<< 0,001
2|4	23,525	257	<< 0,001
3|4	5,211	241	< 0,001
1+2|3+4	19,537	314	<< 0,001

A análise dos quadros II-4 a II-7 revela-nos uma relação directa entre a concentração de espermatozóides e as diversas médias das variáveis em comparação, sendo as diferenças entre os vários grupos consideradas estatisticamente muito significativas ($P<0,01$) ou altamente significativas ($P<0,001$). A média de espermatozóides morfologicamente normais quando o número é inferior a 1 milhão de espermatozóides/ml é de 10,1%, valor que corresponde a uma teratozoospermia grave e cuja diferença é altamente significativa em relação aos grupos restantes, nomeadamente à média do grupo 4 - 35,6% - que está próxima do valor "normal". O quadro II-5 permite-nos considerar grupos com diferenças muito significativas entre 1/2 e o 3/4 e altamente significativas entre os 1 ou 2 / 3 ou 4; deste modo, é possível estabelecer 2 grupos bem distintos: quando o número de espermatozóides é inferior a 10 milhões/ml e o outro em que a concentração é igual ou superior a este número, sendo nestes casos as médias da motilidade de, respectivamente, 14,2% e 26,3%. As médias das provas de hipo-osmolaridade - quadro II-6 - são também muito diferentes consoante os grupos ($P<0,001$), verificando-se que quando o número de espermatozóides é inferior a 10 milhões/ml o valor da média é anormal - 58,7%. Nos casos de oligozoospermia muito grave o estudo da reactividade dos espermatozóides num meio hipo-osmótico não foi realizado devido ao reduzido número de células disponíveis para a leitura microscópica; todavia, o elevado coeficiente de correlação entre as duas variáveis ($r=0,156$, $P<0,000001$)

permite admitir como muito possível que a percentagem de espermatozóides reactivos no grupo 1 seja significativamente inferior aos 58,7%.

Do ponto de vista da MORFOLOGIA os grupos foram assim estabelecidos:

		% de formas normais
grupo 1	-------	< 10
grupo 2	-------	≥ 10 < 20
grupo 3	-------	≥ 20 < 40
grupo 4	-------	≥ 40

QUADRO II-8

	1	2	3	4
Número	n= 60	n= 45	n=138	n=104
	m= 14,2	m= 26,6	m= 47,9	m= 90,6
x10^6/ml	s= 23,38	s= 31,78	s= 56,23	s= 88,20

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	2,346	103	< 0,001
1|3	4,491	196	< 0,001
1|4	6,583	162	< 0,001
2|3	2,420	181	< 0,001
2|4	4,731	147	< 0,001
3|4	4,585	240	< 0,001
1+2|3+4	6,237	345	< 0,001

QUADRO II-9

	1	2	3	4
Motilid. (%)	n= 58 m= 11,3 s= 5,19	n= 43 m= 14,6 s= 5,01	n=136 m= 23,5 s= 4,35	n=102 m= 33,8 s= 5,74

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	3,231	99	< 0,01
1|3	16,866	192	<< 0,001
1|4	24,670	158	<< 0,001
2|3	11,242	177	<< 0,001
2|4	19,056	143	<< 0,001
3|4	15,748	236	<< 0,001
1+2|3+4	19,237	337	<< 0,001

QUADRO II-10

	1	2	3	4
Prova Hipo-osm. (%)	n= 28 m= 58,1 s= 7,28	n= 40 m= 58,8 s= 5,30	n=122 m= 69,4 s= 2,41	n=102 m= 75,3 s= 2,50

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	0,435	66	> 0,05
1|3	14,139	148	<< 0,001
1|4	20,033	128	<< 0,001
2|3	17,326	160	<< 0,001
2|4	25,160	140	<< 0,001
3|4	17,995	222	<< 0,001
1+2|3+4	21,861	290	<< 0,001

QUADRO II-11

	1	2	3	4
Vitalid. (%)	n= 39 m= 64,7 s= 1,27	n= 42 m= 68,5 s= 5,02	n=132 m= 75,3 s= 3,68	n=102 m= 79,6 s= 2,15

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	4,630	79	< 0,001
1|3	17,698	169	<< 0,001
1|4	40,795	139	<< 0,001
2|3	9,483	172	<< 0,001
2|4	18,671	142	<< 0,001
3|4	10,618	232	<< 0,001
1+2|3+4	21,031	313	<< 0,001

Embora as médias da concentração dos espermatozóides sejam significativamente diferentes e progressivamente maiores à medida que aumenta a percentagem de formas morfologicamente normais - quadro II-8 - é de salientar os elevados desvios padrão de todos os grupos, três deles até superiores à média, traduzindo uma grande variabilidade do número de espermatozóides, qualquer que seja o grau de teratozoospermia. No quadro II-9 observam-se diferenças muito significativas ($P<0,01$) e altamente significativas ($P<0,001$) entre os grupos 1/2 e 1, 2 ou 3 / 3 ou 4 respectivamente, o que permite considerar os 20% de espermatozóides morfologicamente normais como o valor abaixo do qual há uma astenozoospermia grave (média dos grupos 1 e 2 = 12,7% de espermatozóides rápidos e muito rápidos) e a partir do qual a astenozoospermia é moderada. De acordo com a análise do quadro II-10 os mesmos 20% são a barreira entre uma prova de hipo-osmolaridade normal e anormal (média dos grupos 1+2 = 58,5% e dos grupos 3+4 = 72,1%) não se registando uma diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) nos resultados da referida prova nos grupos 1 e 2.

De acordo com a MOTILIDADE foram considerados os 4 grupos seguintes:

		% de Ez rápidos+muito rápidos
grupo 1	-------	< 10
grupo 2	-------	≥ 10 < 20
grupo 3	-------	≥ 20 < 40
grupo 4	-------	≥ 40

QUADRO II-12

	1	2	3	4
Número	n= 70	n= 72	n=115	n= 76
	m= 35,5	m= 57,4	m= 63,6	m= 59,0
x10^6/ml	s= 55,48	s= 72,34	s= 60,01	s= 48,99

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	2,020	140	< 0,05
1|3	3,176	183	< 0,05
1|4	2,725	144	< 0,05
2|3	0,634	185	> 0,05
2|4	0,165	146	> 0,05
3|4	0,548	189	> 0,05
1+2|3+4	2,284	331	< 0,05

QUADRO II-13

	1	2	3	4
Morfolog. (%)	n= 67 m= 18,1 s= 5,69	n= 69 m= 26,7 s= 6,00	n=112 m= 27,9 s= 5,90	n= 74 m= 43,5 s= 3,45

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	8,548	134	<< 0,001
1|3	10,908	177	<< 0,001
1|4	32,353	139	<< 0,001
2|3	1,355	179	> 0,05
2|4	20,673	141	<< 0,001
3|4	20,466	184	<< 0,001
1+2|3+4	12,282	320	<< 0,001

QUADRO II-14

	1	2	3	4
Prova Hipo-osm. (%)	n= 54 m= 59,8 s= 5,79	n= 59 m= 67,0 s= 2,87	n=105 m= 68,9 s= 3,54	n= 73 m= 76,1 s= 1,93

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	8,544	111	<< 0,001
1|3	12,378	157	<< 0,001
1|4	22,540	125	<< 0,001
2|3	3,575	162	< 0,001
2|4	21,761	130	<< 0,001
3|4	15,798	176	<< 0,001
1+2|3+4	13,584	289	<< 0,001

QUADRO II-15

	1	2	3	4
Vitalid. (%)	n= 62 m= 64,1 s= 6,97	n= 69 m= 73,8 s= 2,28	n=107 m= 76,0 s= 2,36	n= 73 m= 81,1 s= 2,24

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	11,007	129	<< 0,001
1|3	16,160	167	<< 0,001
1|4	19,732	133	<< 0,001
2|3	5,929	174	< 0,001
2|4	19,166	140	<< 0,001
3|4	14,640	178	<< 0,001
1+2|3+4	14,649	309	<< 0,001

O quadro II-12 mostra-nos uma grande variabilidade da concentração dos espermatozóides (elevados desvios padrão) em qualquer dos grupos considerados e uma não regularidade na subida da média em função do aumento da motilidade, o que justifica a ausência de correlação estatisticamente significativa entre a motilidade e o número (quadro II-3). Para além das diferenças não significativas ($P>0,05$) encontradas no quadro II-12 é de realçar que mesmo nos casos de astenozoospermia muito grave a média do número de espermatozóides é de 35,5 milhões/ml, embora com um desvio padrão superior à média. Isto significa que a não correlação entre as variáveis motilidade/número se deve à grande variabilidade da concentração dos espermatozóides qualquer que seja a motilidade ao contrário da regularidade observada na subida da média da motilidade à medida que aumenta o número de espermatozóides/ml ($P<0,01$ e $P<<0,001$) - quadro II-5. O quadro II-13 permite registar uma grande homogeneidade nas médias da morfologia quando a motilidade é ≥ 10 $<40\%$ (grupos 2 e 3, $P>0,05$) enquanto que a média do grupo 1 (18,1%) corresponde a uma teratozoospermia grave e a do grupo 4 a um valor "normal" (43,5%). No quadro II-14 as diferenças entre todos os grupos são altamente significativas, tendo a prova de hipo-osmolaridade uma média anormal (59,8%) apenas quando a motilidade é inferior a 10%.

O estudo da vitalidade - quadro II-7, 11 e 15 - mostra diferenças altamente significativas entre todos os grupos qualquer que seja a variável em análise,embora

todas as médias correspondam a valores "normais" mesmo que se refiram a oligo, terato ou astenozoospermias muito graves.

Após o cálculo dos coeficientes de correlação entre os parâmetros prognósticos relevantes - número, morfologia e motilidade dos espermatozóides, prova de hipo-osmolaridade - e observada a sua proporcionalidade directa, à excepção da motilidade/número, foi investigada a eventual existência de valores que constituam a zona de separação mais significativa entre cada par de variáveis, isto é, valores a partir dos quais a associação das duas variáveis é máxima, o que foi determinado pelo cálculo da separação que dá o qui-quadrado mais alto - quadros II-16 a II-21.

QUADRO II-16

		MOTILIDADE (%)		
		≤10	>10	
Número (x10^6/ml)	≤44	48	19	67
	>44	131	122	253
		179	141	320

Qui-quadrado= 7,963

QUADRO II-17

		MOTILIDADE (%)		
		≤ 5	> 5	
Hipo-osmol (%)	≤40	10	27	37
	>40	6	246	252
		16	273	289

Qui-quadrado= 32,908

QUADRO II-18

		MOTILIDADE (%)		
		≤25	>25	
Morfologia (%)	≤20	74	88	162
	>20	31	127	158
		105	215	320

Qui-quadrado= 23,470

QUADRO II-19

		NÚMERO (x10^6/ml)		
		≤22	>22	
Hipo-osmol (%)	≤20	3	95	98
	>20	0	191	191
		3	286	289

Qui-quadrado= 3,304

QUADRO II-20

		NÚMERO (x10^6/ml)		
		≤44	>44	
Morfologia (%)	≤20	87	92	179
	>20	18	123	141
		105	215	320

Qui-quadrado= 44,339

QUADRO II-21

		P. HIPO-OSMOL. (%)		
		≤20	>20	
Morfologia (%)	≤25	3	0	3
	>25	102	184	286
		105	184	289

Qui-quadrado= 2,895

Os quadros II-19 e 21 revelam um qui-quadrado não significativo (apenas o são os valores do qui-quadrado iguais ou superiores a 3,841) pois dada a dispersão dos valores a separação não é significativa. O mesmo não se observa nos quadros II-16, 17, 18 e 20 onde se registam os valores das diferentes variáveis correspondentes à separação com maior significado estatístico.

A análise dos quadros II-22 a II-27 permite observar que, para todos os parâmetros (número, morfologia e motilidade) e para qualquer dos grupos estabelecidos com base nos critérios anteriores, as médias da frutose e do ácido citrico encontram-se dentro dos limites da normalidade e não se registam diferenças estatisticamente significativas (P>0,05).

QUADRO II-22

	NÚMERO			
	1	2	3	4
Frutose	n= 15	n= 27	n= 33	n=166
	m= 17,7	m= 17,3	m= 18,0	m= 17,8
(mMol/l)	s= 5,60	s= 6,86	s= 4,88	s= 5,13

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	0,199	40	> 0,05
1|3	0,167	46	> 0,05
1|4	0,068	179	> 0,05
2|3	0,447	58	> 0,05
2|4	0,454	191	> 0,05
3|4	0,176	197	> 0,05
1+2|3+4	0,431	239	> 0,05

QUADRO II-23

	NÚMERO			
	1	2	3	4
Ácido Cítrico (mMol/l)	n= 15 m= 29,4 s= 6,95	n= 28 m= 26,4 s= 6,68	n= 33 m= 25,2 s= 7,03	n=164 m= 27,1 s= 5,76

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	1,393	41	> 0,05
1|3	1,910	46	> 0,05
1|4	1,451	177	> 0,05
2|3	0,648	59	> 0,05
2|4	0,603	190	> 0,05
3|4	1,639	195	> 0,05
1+2|3+4	0,616	238	> 0,05

QUADRO II-24

MORFOLOGIA

	1	2	3	4
Frutose	n= 33	n= 26	n=101	n= 81
	m= 17,8	m= 16,9	m= 18,1	m= 18,1
(mMol/l)	s= 4,46	s= 5,97	s= 4,43	s= 5,70

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	0,701	57	> 0,05
1|3	0,335	132	> 0,05
1|4	0,219	112	> 0,05
2|3	1,190	125	> 0,05
2|4	0,920	105	> 0,05
3|4	0,074	180	> 0,05
1+2|3+4	0,916	239	> 0,05

QUADRO II-25

	MORFOLOGIA			
	1	2	3	4
Ácido Cítrico (mMol/l)	n= 32 m= 28,1 s= 6,13	n= 27 m= 26,8 s= 8,60	n=101 m= 26,6 s= 5,46	n= 81 m= 26,9 s= 6,03

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	0,673	57	> 0,05
1|3	1,275	131	> 0,05
1|4	0,905	111	> 0,05
2|3	0,120	126	> 0,05
2|4	0,100	106	> 0,05
3|4	0,366	180	> 0,05
1+2|3+4	0,788	239	> 0,05

QUADRO II-26

MOTILIDADE

	1	2	3	4
Frutose	n= 46	n= 51	n= 89	n= 55
	m= 18,3	m= 17,8	m= 17,4	m= 19,1
(mMol/l)	s= 4,96	s= 5,40	s= 5,01	s= 5,09

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	0,508	95	> 0,05
1|3	1,049	133	> 0,05
1|4	0,764	99	> 0,05
2|3	0,458	138	> 0,05
2|4	1,280	104	> 0,05
3|4	1,988	142	> 0,05
1+2|3+4	0,019	239	> 0,05

QUADRO II-27

MOTILIDADE

	1	2	3	4
Ácido Cítrico (mMol/l)	n= 45 m= 27,7 s= 5,66	n= 51 m= 26,2 s= 5,36	n= 89 m= 27,7 s= 6,88	n= 55 m= 25,9 s= 5,87

Relação entre os grupos	t - Student	graus de liberdade	P
1|2	1,326	94	> 0,05
1|3	0,010	132	> 0,05
1|4	1,551	98	> 0,05
2|3	1,346	138	> 0,05
2|4	0,280	104	> 0,05
3|4	1,623	142	> 0,05
1+2|3+4	0,139	238	> 0,05

A realização da prova de sobrevivência dos espermatozóides em 78 amostras de esperma, escolhidas ao acaso entre as que não tinham leucócitos ou imagens de aglutinação, revelou diferenças estatisticamente muito

significativas ($P<0,01$) entre todos os parâmetros nos 2 grupos considerados: anormal (sobrevivência dos espermatozóides igual ou inferior a 15%) e normal (sobrevivência superior a 15%) - quadro II-28. Este quadro mostra-nos uma grande variabilidade do número e da morfologia em qualquer dos grupos (elevados desvios padrão), ao contrário da motilidade, cujos valores são muito homogéneos em todos eles, o que significará que a motilidade é o parâmetro que se relaciona mais regularmente com a sobrevivência dos espermatozóides. Um outro dado relevante é a média anormal da prova de hipo-osmolaridade (59,4%) nos casos em que a sobrevivência dos Ez também é anormal, o que não acontece com a média normal e significativamente muito diferente da reacção à hipo-osmolaridade (72,2%) quando a prova de sobrevivência é normal.

QUADRO II-28

	≤ 15%	> 15%
Número x10^6/ml	n= 30 m= 24,0 s= 26,38	n= 48 m= 60,5 s= 50,72
Morfologia (%)	n= 30 m= 19,1 s= 16,19	n= 48 m= 31,2 s= 18,25
Motilidade (%)	n= 30 m= 14,0 s= 3,86	n= 48 m= 24,6 s= 2,58
Prova Hipo-osmol (%)	n= 24 m= 59,4 s= 22,60	n= 46 m= 72,2 s= 11,01

	t - Student	graus de liberdade	P
Número	3,646	76	< 0,01
Morfologia	2,971	76	< 0,01
Motilidade	3,272	76	< 0,01
Hipo-osmolaridade	3,212	68	< 0,01

III. ESTUDO CITOGENÉTICO

Material e métodos

O cariótipo de linfócitos foi efectuado a 404 homens, com idades entre os 24 e os 43 anos (média ± desvio padrão = 31,2 ± 4,8), com infertilidade conjugal mínima de 1 ano e até então sem qualquer diagnóstico quanto à etiologia de eventuais alterações da espermatogénese.

Os indivíduos foram divididos em 3 grupos, baseados nos resultados do estudo do esperma: o grupo das azoospermias (que incluiu 66 homens com ausência total de espermatozóides no ejaculado), o grupo das oligozoospermias (estudados 137 indivíduos com número de espermatozóides inferior a 10 milhões por ml) e um grupo de 201 homens com uma concentração espermática igual ou superior a 10 milhões por ml. A selecção foi realizada estritamente de acordo com o número de espermatozóides por ml, isto é, independentemente dos outros parâmetros avaliados no esperma.

O estudo cromossómico fundamentou-se na utilização, por rotina, da técnica de bandas G (Seabright, 1971), usando-se outras técnicas complementares quando surgia qualquer dúvida no diagnóstico ou se identificava algum polimorfismo ou qualquer anomalia cromossómica de estrutura - bandas R (Dutrillaux et Covic, 1974), bandas C (Sumner, 1972), técnica NOR (Bloom et Goodpasture, 1976), bandas G de alta resolução (Dutrillaux et Viegas-Pequignot, 1981) e bandas R de alta resolução (Yunis, 1976).

O estudo de meioses no esperma (Templado et al. 1980, 1986) realizou-se a 21 indivíduos que apresentavam espermatócitos I no ejaculado. Após liquefação à temperatura ambiente adiciona-se ao esperma 0,25 ml de uma solução de colquicina 1 mcg/ml. Depois de 30 minutos a 37°C acrescentar uma solução de KCl 0,075 M (1:1). Incubar a 37°C mais 30 minutos. Colocar a amostra num tubo de centrífuga e deixar sedimentar 30 minutos à temperatura ambiente. Transferir o sobrenadante para outro tubo de centrífuga e centrifugar durante 10 minutos a 800 rpm. Fixar o sedimento em 2 ml de metanol : ácido acético (3:1) durante 30 minutos a 4°C. Centrifugar diversas vezes até a amostra ter um aspecto límpido, estender as lâminas e corar com soluto de Giemsa a 10%.

Resultados

O cariótipo de linfócitos realizado aos 404 indivíduos referidos revelou anomalias cromossómicas e/ou polimorfismos em 42 (10,4%), com a distribuição que mostra o quadro III-1.

QUADRO III-1

Cariótipos em 404 homens inférteis

	%
Normal	89,6
Anomalias cromossómicas:	
- de número	3,2
- de estrutura	3,0
Polimorfismos cromossómicos	4,2

Os cariótipos 47,XXY (9:404) e 47,XXY/48,XXXY (1:404) - síndrome de Klinefelter - correspondem a 2,5% do total enquanto 0,7% (3:404) se referem ao cariótipo 47,XYY - síndrome do metamacho. As anomalias cromossómicas de estrutura mais frequentemente encontradas foram as translocações robertsoneanas - 1,7% (7:404), tendo as translocações recíprocas e as inversões pericêntricas as frequências respectivas de 0,5% (2:404) e 0,7% (3:404). O polimorfismo cromossómico presente em maior número é a variação morfológica da zona de heterocromatina constitutiva do braço longo do cromossoma 9, 9 qh+ - 3,2% (13:404), apresentando cada um dos outros polimorfismos identificados (1 qh+, micro y - fig. III-1, Y q+, 15 s+) a frequência de 0,2% (1:404).

Fig. III-1 Cromossomas em metafase, corados pela técnica de bandas C - ausência de heterocromatina constitutiva no braço longo do cromossoma Y (seta).

As diferentes frequências de anomalias e polimorfismos cromossómicos observadas nos 3 grupos considerados - quadros III-2 e 3 - mostram a associação entre a frequência das anomalias cromossómicas e a concentração dos espermatozóides, sendo a incidência das cromossomopatias tanto maior quanto menor é o número de espermatozóides por ml: 2,0 , 8,0 e 15,1% nos grupos III, II e I, respectivamente.

QUADRO III-2

Nº de espermatozóides e frequência de anomalias e polimorfismos cromossómicos (404 homens inférteis)

GRUPO	Número de Ez/ml	Anom. cromossómicas		Polimorfismos	
		Nº	%	Nº	%
I	0	10	15,1	6	9,1
II	< 10 x 10^6	11	8,0	7	5,1
III	≥ 10 x 10^6	4	2,0	4	2,0

QUADRO III-3

Cariótipos diagnosticados nos grupos I, II e III

		Nº observado	%
GRUPO I	Normal	50	75,8
	47,XXY	9	13,6
	47,XXY/48,XXXY	1	1,5
	46,XY, 9 qh+	5	7,6
	46,X, micro Y	1	1,5
GRUPO II	Normal	119	86,8
	46,XY, t(6;22)	1	0,7
	45,XY, t(13;14)	4	2,9
	45,XY, t(13;21)	1	0,7
	47,XYY	3	2,2
	46,XY, inv per (1)	1	0,7
	46,XY, inv per (9)	1	0,7
	46,XY, 9 qh+	5	3,6
	46,XY, 1 qh+	1	0,7
	46,XYq+	1	0,7
GRUPO III	Normal	193	96,0
	46,XY, t(8;13)	1	0,5
	45,XY, t(13;14)	2	1,0
	46,XY, inv per (Y)	1	0,5
	46,XY, 9 qh+	3	1,5
	46,XY, 15 s+	1	0,5

O quadro III-4 mostra, para além das frequências dos cariótipos diagnosticados, os intervalos de valores que cada um dos tipos pode apresentar e que foram calculados a partir dos dados observados, para limites de confiança de 95%.

QUADRO III-4

Cariótipos observados: frequências e intervalos de valores

		%	l. confiança 95%
	Normal	75,8	63,94-84,64
GRUPO	47,XXY	13,6	7,25-24,18
	47,XXY/48,XXXY	1,5	0,26- 8,31
I	46,XY, 9 qh+	7,6	3,23-16,77
	46,X, micro Y	1,5	0,26- 8,31
	Normal	86,8	79,34-91,08
	46,XY, t(6;22)	0,7	0,12- 4,10
	45,XY, t(13;14)	2,9	1,11- 7,34
GRUPO	45,XY, t(13;21)	0,7	0,12- 4,10
	47,XYY	2,2	0,73- 6,31
II	46,XY, inv per (1)	0,7	0,12- 4,10
	46,XY, inv per (9)	0,7	0,12- 4,10
	46,XY, 9 qh+	3,6	1,53- 8,33
	46,XY, 1 qh+	0,7	0,12- 4,10
	46,XYq+	0,7	0,12- 4,10
	Normal	96,0	92,25-98,00
	46,XY, t(8;13)	0,5	0,09- 2,84
GRUPO	45,XY, t(13;14)	1,0	0,27- 3,64
	46,XY, inv per (Y)	0,5	0,09- 2,84
III	46,XY, 9 qh+	1,5	0,50- 4,38
	46,XY, 15 s+	0,5	0,09- 2,84

O cálculo do qui-quadrado para a distribuição dos resultados nos 3 grupos proporciona um valor de P= 1 x 10^-8, pelo que as diferenças observadas são altissimamente significativas. Porque a determinação anteriormente citada é muito influenciada pela elevada frequência de anomalias cromossómicas nos azoospérmicos, foram considerados apenas os grupos II e III, cuja diferença é ainda muito significativa (P<0,005) - quadro III-5.

QUADRO III-5

		Número de EZ/ml		
		I	II	III
		0	< 10^6	≥ 10^6	
Cariótipo	normal	50	119	193	362
	anormal	16	18	8	42
	total	66	137	201	404
Grupos I, II e III	qui-quadrado=36,698			P= 1x10^-8
Grupos II e III	qui-quadrado= 8,377			P< 0,005

Os polimorfismos cromossómicos correspondem a 4,2% dos cariótipos realizados (17/404), sendo o aumento da zona de heterocromatina constitutiva localizada no braço longo do cromossoma 9, em q12 - 9qh+ - o mais frequentemente diagnosticado - 76,5% do total dos polimorfismos (13/17) -

e o único presente simultaneamente no grupo dos azoospérmicos, oligozoospérmicos e normozoospérmicos; os limites de confiança das frequências do 9 qh+ nestes grupos, a 95%, são respectivamente 3,23-16,77%, 1,53-8,33% e 0,50-4,38%. A sobreposição destes limites de confiança permite concluir que não há diferenças significativas nas frequências dos polimorfismos nos 3 grupos.

As anomalias cromossómicas presentes nas oligozoospermias (grupo II) e nos indivíduos com uma concentração espermática igual ou superior a 10 milhões Ez/ml (grupo III) representam 4,4% (15/338), valor 7 a 8 vezes superior ao da população geral. Considerando separadamente a frequência das cromossomopatias no grupo II - 8,0% (11/137) - e no grupo III - 2,0% (4/201) - verifica-se que nestes grupos as frequências são, respectivamente, 11-16 e 3-4 vezes superiores às observadas na população geral, sendo esta diferença significativa (qui-quadrado= 5,655, P< 0,02).

A incidência de translocações recíprocas entre autossomas observada no nosso estudo atinge 2,2% (9/404), correspondendo 1,7% a translocações robertsoneanas e 0,5% a translocações recíprocas. No quadro III-6 apontam-se as frequências das translocações robertsoneanas (T ROB) e das translocações recíprocas (T REC) em função da concentração espermática. Em ambos os grupos as translocações robertsoneanas são mais frequentes que as translocações

recíprocas: 5 vezes no grupo II e 2 vezes no grupo III. Os limites de confiança destas frequências sobrepõem-se pelo que as diferenças não são significativas (quadro III-6).

QUADRO III-6

Translocações robertsoneanas e translocações recíprocas
frequências e intervalos de valores

	T ROB %	limites confiança 95%	T REC %	limites confiança 95%
Nº Ez < 10^6 / ml	3,6	1,5 - 8,3	0,7	0,12- 4,10
Nº Ez ≥ 10^6 / ml	1,0	0,27- 3,64	0,5	0,09- 2,84

A frequência das inversões pericêntricas não é significativamente diferente da encontrada na população geral, o que acontece não apenas quando se considera a totalidade dos homens estudados como também nos oligozoospérmicos - os limites de confiança de 95% nestes dois grupos são, respectivamente, 0,3-1,8% e 1,0-5,2%. Na inversão pericêntrica do cromossoma 1 as bandas G e R mostraram um braço curto em posição invertida com o centrómero localizado na parte terminal do cromossoma, tendo as bandas C demonstrado dois blocos de heterocromatina, o que sugere que as roturas foram em 1p36.3 e 1q12 (fig III-2). O estudo familiar (fig. III-3) revelou a mesma

inversão pericêntrica em dois irmãos - ambos com oligozoospermia muito grave (200.000 Ez imóveis por ml) - e na mãe do probando, inv(1) (p36.3q12), mostrando que o cromossoma com a inversão foi herdado sem que houvesse recombinação meiótica no segmento invertido.

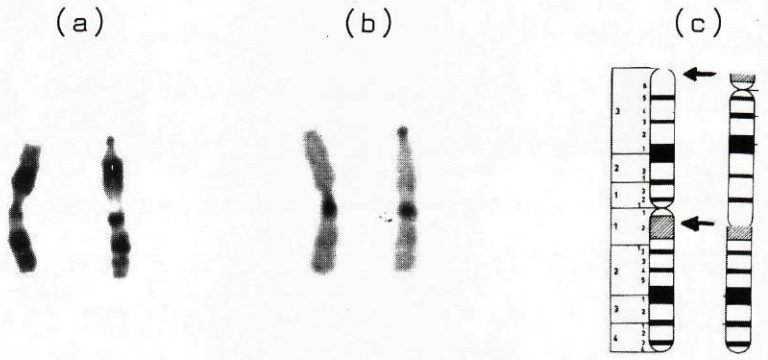
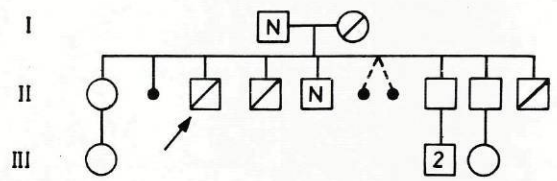


Fig. III-2 Inversão pericêntrica do cromossoma 1. (a) Bandas G. (b) Bandas C. (c) Diagrama com os pontos de rotura propostos (setas).



Portadores da inversão per (1)
Cariótipo normal
Gravidez gemelar
Probando

Fig. III-3 Árvore genealógica.

A realização do cariótipo aos progenitores em 5 das 7 translocações robertsoneanas diagnosticadas mostrou que em 2 casos as translocações surgiram "de novo", sendo transmitidas pela mãe em dois e pelo pai em um. Estes dados, juntamente com os da inv per (1) anteriormente descrita, demonstram a repercussão variável das anomalias cromossómicas de estrutura na aptidão biológica. O quadro III-7 permite observar que a esmagadora maioria das anomalias cromossómicas diagnosticadas se acompanham de oligo-asteno-teratozoospermia (11/14) enquanto em dois casos há apenas asteno-teratozoospermia - t(13;14) e t(8;13) - e numa translocação robertsoneana 13;14 há normalidade em todos os parâmetros avaliados no esperma.

QUADRO III-7

Anomalias cromossómicas nas normo e oligozoospermias

	N	OT	OAT
45,XY, t(13;14)	1	1	4
45,XY, t(13;21)			1
46,XY, t(8;13)		1	
46,XY, t(6;22)			1
46,XY, inv per (1)			1
46,XY, inv per (9)			1
47,XYY			3

N : número, morfologia e motilidade normais;
OT : oligo-teratozoospermia;
OAT: oligo-asteno-teratozoospermia

Os valores médios da morfologia e da motilidade (rápida + muito rápida) dos espermatozóides observados nos doentes com cromossomopatias (quadro III-7) são, respectivamente, 15,8 e 16,3%. Estes valores, nitidamente diferentes em relação às médias na totalidade da população masculina infértil estudada (426 indivíduos) - morfologia 31,6%; motilidade 26,4% (quadro II-1) - são, todavia, sobreponíveis às médias da morfologia (16,9%) e da motilidade (14,2%) de todos os oligozoospérmicos (106

indivíduos) - quadros II-4 e 5. Em face destes resultados não é possível aceitar, por si só, a teratozoospermia e/ou astenozoospermia como indicadores da existência de anomalias cromossómicas.

O estudo da meiose no esperma foi realizado nos casos em que a avaliação deste sugerisse a exequibilidade de observar figuras meióticas no ejaculado, isto é, quando estão presentes espermatócitos I, e depois de ser excluída uma causa inflamatória ou infecciosa. O estudo de 21 indivíduos inférteis - 13 com oligo-asteno-teratozoospermia, 5 com asteno-teratozoospermia e 3 com número, morfologia e motilidade normais - permitiu a observação de figuras meióticas em 13 casos, todos sem alterações aparentes, com excepção de um que mostrou imagens de diacinese com dessinapse em alguns bivalentes (dessinapse individual parcial); nos 8 casos restantes não se observaram figuras em diacinese/metafase I (5) ou a qualidade destas não permitiu a leitura (3). A dessinapse individual parcial (fig. III-4) observou-se num indivíduo com cariótipo 46,XY e oligo-asteno-teratozoospermia muito grave - número de Ez/ml: 1,4 milhões; motilidade nula: 96,8%; Ez morfologicamente normais: 0% - e com 40 espermatócitos I, 60 espermatócitos II e 280 espermátides por 100 espermatozóides. A interpretação deste resultado é discutível, até porque as anomalias meióticas podem representar mais uma consequência citológica da acção nefasta de qualquer factor sobre a espermatogénese do que a causa do seu bloqueio.

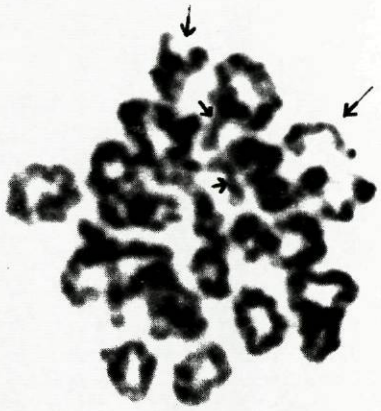


Fig. III-4 Dessinapse individual parcial.
Dessinapse de alguns bivalentes (setas).

IV. DISCUSSÃO

A incongruência entre a necessidade de um só espermatozóide para possibilitar a origem de um novo ser - após fecundação de um oócito - e a observação de que uma capacidade reprodutiva normal exige a ejaculação de milhões de espermatozóides, diferentes no seu genótipo e com uma grande heterogeneidade, nomeadamente morfológica e cinética, constitui uma das interrogações sem resposta definitiva na biologia da reprodução. A diversidade estrutural e funcional do esperma, bem como a variação considerável que se pode observar num mesmo indivíduo, de um ejaculado para outro, conduzem ao fulcro das questões sobre a infertilidade masculina: será possível classificar um esperma como fecundante?

Em 1951 MacLeod e Hold demonstraram que a concentração, morfologia e motilidade dos espermatozóides eram consistentemente melhores nos homens férteis que nos inférteis. Desde então estas características foram, em geral, admitidas como relevantes factores prognósticos da fertilidade masculina, mas a sua importância individual ou global e inter-relação raras vezes se analisaram e, quando o foram, com conclusões contraditórias. Zaini et al. (1985) afirmam que a correlação qualidade do esperma/fertilidade apenas é inteiramente explicada pela concentração dos espermatozóides e que a morfologia não é importante no prognóstico da fertilidade nos homens inférteis com um número de espermatozóides superior a 5 milhões/ml, enquanto a motilidade poderá ser relevante do ponto de vista

prognóstico apenas quando o número é inferior a 20 milhões/ml. Para Aitken et al. (1983) há uma boa correlação com a infertilidade quando qualquer dos parâmetros - concentração ou motilidade dos espermatozóides - está muito reduzido. Quando aumenta a percentagem de formas morfologicamente anormais, mas a concentração e a motilidade se encontram dentro dos limites da normalidade, é difícil concluir se esta anormalidade morfológica é um factor significativo na etiologia da infertilidade conjugal (Lunenfeld et al. 1983). Shalgi et al. (1985) concluem que dos parâmetros avaliados (número, morfologia e motilidade) apenas a morfologia pode ser correlacionada com a capacidade de penetração dos espermatozóides nos oócitos de Hamster e, consequentemente, com o seu potencial fecundante.

O carácter de independência ou inter-relação entre os vários parâmetros avaliados no esperma tem sido aparentemente subvalorizado se atendermos à exiguidade da sua referência na literatura. Hargreave e Elton (1983) encontraram uma correlação altamente significativa apenas entre a concentração e a motilidade dos espermatozóides ($P<0,001$) enquanto Poland et al. (1985) só observaram correlação entre a vitalidade e a percentagem de espermatozóides móveis ($P<0,01$), afirmando ser notável a ausência de correlação entre os restantes parâmetros. Os coeficientes de correlação que determinámos - quadros II-2, 3 - mostram um valor sem significado entre o número e a motilidade mas altissimamente significativo ($P<0,000001$) entre:

- número e morfologia (correlação mais elevada)

- número e prova de hipo-osmolaridade

- morfologia e motilidade

- morfologia e prova de hipo-osmolaridade

- motilidade e prova de hipo-osmolaridade

A grande variação observada no número de espermatozóides, independentemente da motilidade normal ou astenozoospermia muito grave, associada à subida irregular da média desse mesmo número em função do aumento da motilidade - quadro II-12 -, explica a ausência de correlação ($P>0,05$) entre estas características do esperma. Todavia, a regular subida da média da motilidade, com diferenças significativas entre os diferentes grupos ($P<0,01$ e $P<<0,001$), à medida que aumenta a concentração de espermatozóides - quadro II-5 -, corresponderá a uma relação unilateral entre número/motilidade, isto é, os factores responsáveis pelas anomalias de número são suficientemente nocivos, estrutural e funcionalmente, para provocar alterações globais (do número, morfologia e motilidade), enquanto as astenozoospermias não acompanhadas de oligo-zoospermias poderão ser consequência da actuação quantitativamente menos marcada dos mesmos factores, ou de outros mais benévolos, conferindo a esta situação um prognóstico menos desfavorável.

A análise dos quadros II-4 a II-15, particularmente das médias das variáveis em comparação - número, morfologia e motilidade dos espermatozóides, prova de hipo-osmolaridade - e do significado estatístico das diferenças entre os grupos, possibilita concluir a existência de proporcionalidade directa entre as referidas variáveis (à excepção da motilidade/número) e estabelecer 3 grupos de pior prognóstico:

1. Número de espermatozóides inferior a 10 milhões/ml.

   Neste grupo, as médias da morfologia, motilidade e prova de hipo-osmolaridade são, respectivamente, 16,9%, 14,2% e 58,7%, valores correspondentes a terato e astenozoospermias graves e a hipo-osmolaridade anormal. A situação é bem distinta quando o número é igual ou superior a 10 milhões/ml, em que as referidas médias são, pela mesma ordem, 33,7%, 26,3% e 71,1%.

2. Percentagem de espermatozóides morfologicamente normais inferior a 20%.

   A esta teratozoospermia grave corresponde também uma astenozoospermia grave (12,7% de Ez rápidos e muito rápidos) e uma prova de hipo-osmolaridade anormal (58,5%), ao contrário dos grupos em que a morfologia normal é igual ou superior a 20% (média da motilidade: 27,9%; média da hipo-osmolaridade: 72,1%).

3. Motilidade (rápida + muito rápida) inferior a 10%.

Nestes casos observou-se uma teratozoospermia grave (média: 18,1%) e uma média anormal da prova de hipo-osmolaridade (59,8%). Nos grupos em que a motilidade é igual ou superior a 10% estas médias são, respectivamente, 32,1% e 70,6%.

O estudo da vitalidade - quadros II-7, 11 e 15 - revelou médias normais em todos os grupos, mesmo nos que se referem a oligo, terato ou astenozoospermias muito graves. Assim, podemos concluir que a vitalidade tem reduzido significado prognóstico na avaliação da capacidade fecundante de um indivíduo, ideia reforçada pelos resultados de Martin e Taylor (1982) que não observaram correlação significativa entre a vitalidade e a penetração dos espermatozóides nos oócitos do Hamster. É de referir também que, em todas as variáveis e para todos os grupos, as médias da vitalidade são sempre superiores às médias da prova de hipo-osmolaridade do grupo correspondente, o que está de acordo com o conceito de que o estudo da vitalidade avalia apenas a integridade estrutural da membrana do espermatozóide, enquanto a prova de hipo-osmolaridade também proporciona uma indicação da sua integridade fisiológica (Schrader et al. 1986). De acordo com estes autores, desde que a membrana se encontre intacta, o corante supra-vital não entra na célula mesmo que a membrana esteja

fisiologicamente inactiva e o espermatozóide inviável; pelo contrário, a prova de hipo-osmolaridade aparentemente determina a capacidade da membrana transferir fluidos, isto é, uma actividade fisiológica.

A interpretação dos resultados da frutose e do ácido cítrico no estudo das alterações do número, morfologia e motilidade dos espermatozóides tem sido excepcional: a diminuição rápida da motilidade está frequentemente associada com uma disfunção prostática (Eliasson, 1982); os níveis da frutose e do ácido cítrico parecem aumentar com a concentração dos espermatozóides, o que contrasta com a observação de Schirren (1961) que refere diminuição do nível da frutose no plasma seminal quando aumenta o número de espermatozóides (Scheriff, 1983). Deste modo pareceu-nos importante calcular os valores da frutose e do ácido cítrico nos diversos grupos dos parâmetros número, morfologia e motilidade e determinar o significado estatístico das diferenças - quadros II-22 a II-27. A análise destes quadros permite observar que, para todos os parâmetros e para qualquer dos grupos, as médias se encontram dentro dos limites da normalidade e não há diferenças significativas ($P>0,05$). Assim, podemos concluir que o doseamento da frutose e do ácido cítrico é irrelevante do ponto de vista diagnóstico e prognóstico na avaliação das oligo e/ou terato e/ou astenozoospermias.

Uma questão indiscutivelmente importante é a perspectiva prognóstica que a análise do esperma possibilita. Todavia, está muito distante a obtenção de

consenso sobre os parâmetros que melhor caracterizam a capacidade fecundante dos espermatozóides. A fertilização "in vitro" (FIV) tem sido utilizada com uma frequência crescente nos casos de infertilidade de causa masculina, pelo que diversos autores têm tentado estabelecer uma correlação entre os resultados da FIV e os parâmetros espermáticos, nomeadamente número, morfologia e motilidade (quadro IV-1).

QUADRO IV-1

Valorização dos parâmetros espermáticos no prognóstico da capacidade fecundante dos espermatozóides

	Número	Morfologia	Motilidade
Aitken et al. (1982)	-	+	+
Edwards et al. (1983)	-	-	+
Mahadevan et al. (1984)	-	+	+
Shalgi et al. (1985)	-	+	-
Zaini et al. (1985)	+	-	-
Alper et al. (1985)	+	-	+
Hirsch et al. (1986)	+	-	+
Rogers et al. (1986)	-	-	-
Talbert et al. (1987)	-	-	-

A correlação altissimamente significativa ($P<0,000001$) que obtivemos entre o número/morfologia e a motilidade/morfologia, bem como a proporcionalidade directa observada na inter-relação entre o número, morfologia e motilidade dos espermatozóides, leva-nos a concluir que estes três parâmetros devem ser considerados globalmente importantes como indicadores prognósticos da capacidade fecundante de determinado esperma e que a sua alteração corresponde a uma exteriorização de anomalias fundamentais dos espermatozóides que dificultam ou impedem a fecundação. Nesta perspectiva, o aparecimento isolado de oligo, terato ou astenozoospermia corresponderá à expressão parcial dessas anomalias estruturais ou funcionais, ainda desconhecidas. Esta interpretação é reforçada pelos resultados desanimadores da FIV nos casos de infertilidade de causa masculina e levanta interrogações adicionais à inocuidade e eficácia da fecundação de oócitos humanos por micro-injecção de um espermatozóide, apresentada por Laws-King et al. (1987).

A insuficiente e controversa indicação prognóstica proporcionada pelos parâmetros clássicos da avaliação espermática conduziu ao desenvolvimento de técnicas capazes de estudar o poder fecundante dos espermatozóides. A prova de hipo-osmolaridade, descrita por Jeyendran et al. (1984), aparentemente analisa a capacidade da membrana celular do espermatozóide em transferir fluidos. A alteração da actividade fisiológica da membrana pode significar que esta não seja capaz de sofrer as mudanças que ocorrem durante a capacitação e a reacção acrossómica, imprescindíveis para a

fecundação. A capacidade da membrana em transferir fluidos é apenas uma das suas muitas propriedades fisiológicas; todavia, baseados na alta correlação entre a prova de hipo-osmolaridade e os resultados da prova de fertilização dos oócitos do Hamster (Jeyendran et al. 1984) e da fertilização "in vitro" dos oócitos humanos (Van der Ven et al. 1986), Schrader et al. (1986) defendem que a capacidade da membrana do espermatozóide para transportar fluidos reflecte outras actividades fisiológicas relacionadas com o poder fecundante dos espermatozóides.

Van der Ven et al. (1986) observaram que todos os espermas que fecundaram "in vitro" os oócitos humanos tinham uma percentagem de espermatozóides reactivos igual ou superior a 60%, enquanto nenhuma das amostras de esperma com reactividade inferior a 60% fecundou qualquer oócito.

Os resultados de Van der Ven et al. não demonstram, todavia, que uma prova de hipo-osmolaridade normal signifique necessariamente que esse esperma é fértil pois outros factores - para além da estabilidade e actividade da membrana - controlam a capacidade fecundante dos espermatozóides; na realidade, nesse ensaio, 11,7% dos espermas com prova de hipo-osmolaridade normal não fecundaram oócitos humanos. Estes falsos positivos são interpretados do seguinte modo: a membrana plasmática da cauda do espermatozóide parece estar menos firmemente ligada às estruturas internas do que a membrana que envolve a cabeça, e assim a entrada de água no espaço intracelular proporciona maior expansão da região da cauda, provocando o

enrolamento dos microtúbulos eventualmente tão acentuado que pode reduzir 3 a 4 vezes o comprimento da cauda do espermatozóide (Schrader et al. 1986). Assim, do ponto de vista diagnóstico, o que é estudado é a cauda (o seu enrolamento ou encurtamento), embora os resultados sejam muito provavelmente indicadores da integridade funcional das membranas da cabeça e da cauda. Porém, é concebível que num pequeno número de casos essa integridade esteja presente na cauda mas não na cabeça, o que justifica os resultados falso positivos, pois a membrana da cabeça é a mais comprometida na capacitação, reacção acrossómica e ligação do espermatozóide à zona pelúcida (Van der Ven et al. 1986).

O coeficiente de correlação muito significativo ($P<0,01$) entre a prova de hipo-osmolaridade e os resultados da fertilização "in vitro", bem como a correlação observada entre a referida prova e a motilidade ($P<0,01$) e a morfologia dos espermatozóides ($P<0,02$) - não foi estatisticamente significativa a correlação entre a hipo-osmolaridade e a concentração dos espermatozóides (Van der Ven et al. 1986) -, leva-nos a concluir pela necessidade da análise combinada destes vários parâmetros quando se pretende definir o prognóstico da capacidade fecundante de um esperma. Esta conclusão é reforçada pelos nossos resultados - quadro II-3 -, que registam coeficientes de correlação parciais altissimamente significativos ($P<0,000001$) entre a prova de hipo-osmolaridade e a motilidade ($r=0,298$), a morfologia ($r=0,228$) e o número de espermatozóides ($r=0,156$). A associação entre todas estas

variáveis faz-se também de uma forma directamente proporcional - quadros II-6, 10 e 14 - sendo a média das provas de hipo-osmolaridade anormal (número de espermatozóides reactivos inferior a 60%) quando:

- concentração de espermatozóides < 10 x 10^6
- morfologia < 20%
- motilidade < 10%

Esta inter-relação legitima que se considere a possibilidade de a reacção dos espermatozóides à hipo-osmolaridade ser uma manifestação local - na cauda - da integridade global dos seus componentes anatómicos fundamentais e da sua capacidade funcional.

A análise da prova de sobrevivência dos espermatozóides (quadro II-28) permite-nos verificar - para além das diferenças muito significativas ($P<0,01$) que apresentam a concentração, morfologia, motilidade e reacção à hipo-osmolaridade em função da sobrevivência dos espermatozóides (normal ou anormal) -, uma grande variabilidade do número e da morfologia em qualquer dos grupos, traduzido pelos elevados desvios padrão. O mesmo não acontece com a motilidade, que apresenta grande homogeneidade em cada um dos grupos, a indicar que é o parâmetro que se relaciona mais regularmente com a sobrevivência dos espermatozóides. Este facto, associado à observação de que o maior coeficiente de correlação parcial, tendo como referência a prova de hipo-osmolaridade acontece com a motilidade, possibilita-nos colocar a motilidade no

topo da hierarquia dos parâmetros tradicionais, globalmente importantes na definição prognóstica da capacidade fecundante de um esperma.

O estudo da integridade funcional da membrana dos espermatozóides e o da sua sobrevivência, valorizados por diferentes autores, não foram ainda, todavia, inter--relacionados. O quadro II-28 mostra-nos que a prova de hipo-osmolaridade tem valor médio anormal (59,4%) quando a sobrevivência dos espermatozóides também é anormal, enquanto a média da reacção dos espermatozóides à hipo-osmolaridade é normal (72,2%) e significativamente muito diferente quando a prova de sobrevivência é normal. Esta associação e o paralelismo de resultados entre estas duas provas que têm um objectivo comum, levam-nos a defender a inclusão da prova de hipo-osmolaridade no protocolo de estudo do esperma, mesmo de rotina, dadas as suas características de simplicidade e economia técnicas, assim como pela demonstração de constituir uma valiosa informação adicional aos parâmetros tradicionais estudados no esperma.

Apesar de no presente não dispormos de nenhum "teste de fertilidade" com resultados inquestionáveis, a combinação de um correcto e rigoroso protocolo de análise dos parâmetros tradicionais avaliados no esperma - número, morfologia e motilidade - com a prova de hipo-osmolaridade possui um relevante valor prognóstico na avaliação da capacidade fecundante de um esperma, quer em situações de não-intervenção médica quer nos casos em que se perspectiva o uso de técnicas de fertilização medicamente ajudada. Este

valor prognóstico tem, todavia, um carácter relativo pois mesmo a avaliação do poder fecundante dos oócitos humanos pela fertilização "in vitro" - de utilização limitada por razões técnicas e éticas evidentes - não garante que a fecundação se processe "in vivo".

Os êxitos e fracassos reprodutivos da espécie humana estão também intimamente ligados à constituição cromossómica dos espermatozóides, cuja anormalidade pode surgir apenas no decurso da mitose/meiose espermatogénica ou ter já origem no cariótipo somático representado nas espermatogónias e que se repercute no espermatozóide. Estas possibilidades etiopatogénicas resultam em incapacidade fecundante ou inviabilidade embrionária precoce, sendo uma forma mais radical de infertilidade a ausência de espermatogénese que acompanha, em especial, o síndrome de Klinefelter.

A realização do cariótipo de linfócitos aos 404 homens inférteis permitiu diagnosticar anomalias cromossómicas e/ou polimorfismos em 42 (10,4%) - quadro III-1, correspondendo 3,2% a aneuploidias (síndrome de Klinefelter: 2,5%; síndrome do metamacho: 0,7%); 3,0% a anomalias de estrutura (translocações robertsoneanas: 1,7%; translocações recíprocas: 0,5%; inversões pericêntricas: 0,7%) e 4,2% a polimorfismos cromossómicos (9qh+: 3,2%; 1qh+, micro Y, Yq+ e 15s+: cada um com a frequência de 0,2%).

A comparação destes valores, sobretudo a frequência global da variação cromossómica (10,4%), com os citados na literatura - por exemplo Kjessler (6,6%), Koulischer e Schoysman (10%), Hendry et al. (14%) - é, em rigor, difícil e porventura mesmo desprovida de significado; isto deve-se aos diferentes critérios de selecção dos homens inférteis para o estudo cromossómico, que individualiza cada amostra, e também à diversidade de concepção diagnóstica e valorização clínica dos polimorfismos cromossómicos, que conduz ou não à sua inclusão nos resultados.

Os 3 grupos considerados na população masculina infértil (grupo I: azoospérmicos; grupo II: oligozoospérmicos; grupo III: concentração espermática igual ou superior a 10 milhões/ml) apresentam distintas frequências de anomalias e polimorfismos cromossómicos, aparecendo a falta de homogeneidade destas frequências associada à concentração dos espermatozóides. A análise dos quadros III-2 e 3 permite concluir esta íntima relação: a incidência das cromossomopatias aumenta à medida que diminui o número de espermatozóides por ml - valores de 2,0; 8,0 e 15,1% nos grupos III, II e I, respectivamente. Esta diferença entre os 3 grupos é altissimamente significativa ($P=1 \times 10^{-8}$), sendo ainda muito significativa quando consideramos apenas os grupos II e III ($P<0,005$), caso em que é afastada a influência do elevado número de anomalias cromossómicas presentes nos azoospérmicos. Estes resultados não divergem muito dos obtidos por Retief et al. (1984) e Bourrouillou et al. (1985) que, pela ordem referida,

observaram anomalias cromossómicas em 14,1 e 15,4% dos azoospérmicos e em 5,1 e 6,9% dos oligozoospérmicos; pelo contrário, Abyholm e Stray-Pedersen (1981) diagnosticaram cromossomopatias em 12,6 e 6,7% dos azoospérmicos e oligozoospérmicos, respectivamente, mas as diferenças não eram significativas.

O significado discordante destas conclusões conduz-nos a uma das questões fundamentais que é saber se o elemento masculino de um casal infértil deve ser sempre estudado do ponto de vista citogenético ou se, para realizar esta investigação, se justifica - até por óbvias razões económicas - obedecer a indicadores como os fornecidos pelo espermograma. Um dos possíveis parâmetros indicadores é o número de espermatozóides por ml: zero é motivo indiscutível para realizar o cariótipo, dada a elevada incidência do síndrome de Klinefelter. Todavia, numa afirmação aparentemente paradoxal, a azoospermia é a situação em que a falta do estudo cromossómico tem menos importância, pois nestes casos não fazer o diagnóstico de uma anomalia cromossómica só importa para a interpretação etiopatogénica da esterilidade, não tendo qualquer outra consequência no processo reprodutivo. Já não é assim quando a concentração de espermatozóides é normal ou mesmo nas oligozoospermias, em que a identificação de uma cromossomopatia é extremamente importante, não apenas quanto à etiopatogenia, mas - e sobretudo - no aconselhamento genético.

Na população com azoospermia, 24,2% dos indivíduos têm variações cromossómicas, correspondendo 15,1% a aneuploidias e 9,1% a polimorfismos cromossómicos (9qh+ e micro Y). As aneuploidias - 62,5% dos cariótipos variantes - dizem respeito ao síndrome de Klinefelter, 90% com a constituição cromossómica mais frequente - 47,XXY - e 10% na forma de mosaicismo - 47,XXY/48,XXXY.

O cariótipo 46,X, micro Y justifica alguns comentários. De facto, é discutível considerar o micro Y um polimorfismo cromossómico por parecer corresponder à perda da heterocromatina constitutiva do braço longo do cromossoma Y - porque não identificar esta alteração morfológica como deleção e, consequentemente, anomalia cromossómica? Contudo, não é fácil estabelecer uma relação causa/efeito com a azoospermia, não apenas pela falta de significado estatístico (um único caso), mas também porque esta variação morfológica do cromossoma Y não abrange a zona identificada com os factores da espermatogénese - Yq11 (Tiepolo e Zuffardi, 1976; Yunis et al. 1977). Tho et al. (1987) estudaram 10 indivíduos azoospérmicos, com cariótipo normal e paragem da maturação espermática, e tentaram - sem o conseguir - identificar uma mutação molecular em Yq11, para as sequências de DNA definidas pelas sondas pAS1, 4B-2 e pS4; assim, depois de aventarem a hipótese de que alterações moleculares afectando a espermatogénese podem englobar sequências não definidas pelas sondas de DNA utilizadas, acabam por afirmar ser bastante provável que as alterações da espermatogénese nos homens eugonádicos possam ter uma causa genética heterogénea.

A possibilidade, que já referimos ser muito discutida e controversa, de os polimorfismos cromossómicos influírem na aptidão biológica (nomeadamente na meiose, causando bloqueio total ou parcial da divisão celular ou favorecendo a não-disjunção cromossómica), constitui motivo para considerar relevantes estas variações morfológicas e, portanto, analisar a sua incidência nos 3 grupos. Os polimorfismos correspondem a 4,2% dos cariótipos realizados, sendo o 9qh+ o mais diagnosticado - 76,5% do total dos polimorfismos - e o único presente ao mesmo tempo em todos os grupos. A sobreposição dos limites de confiança das frequências do 9qh+ - quadro III-4 - permite concluir que, na nossa amostra, não há diferenças significativas nas frequências dos polimorfismos nos 3 grupos. Em função destes resultados é possível afirmar que, se os polimorfismos cromossómicos têm alguma influência no processo reprodutivo, não será na produção de espermatozóides mas eventualmente a outros níveis, como o da formação aneuplóide de gâmetas por interferência na separação anafásica dos cromossomas.

A frequência global das anomalias cromossómicas presentes nos indivíduos inférteis com espermatozóides no ejaculado (grupos II e III) é de 4,4%; a incidência destas anomalias na população geral é de 0,5 a 0,7% (Jacobs et al. 1974; Hamerton et al. 1975; Hook e Hamerton, 1977), isto é, 7 a 8 vezes menor. A observação de uma diferença significativa ($P<0,02$) entre as frequências das cromossomopatias no grupo II (8,0%) e no grupo III (2,0%) - respectivamente, 11-16 e 3-4 vezes superiores às da

população geral - reforça a conclusão de existir uma inequívoca relação, directamente proporcional, entre a intensidade da lesão que atinge a produção espermática, traduzida no número de espermatozóides presentes no ejaculado, e a incidência de anomalias cromossómicas.

As translocações recíprocas entre autossomas observadas no nosso estudo atingem os 2,2%, mostrando outros trabalhos valores de 1,5% (Tiepolo et al. 1981; Dutrillaux et al. 1982) e 1,1% (Micic et al. 1984). As frequências globais das translocações robertsoneanas e das translocações recíprocas são, respectivamente, 1,73% (7/404) e 0,5% (2/404), as quais, pela ordem indicada, são 23 e 7 vezes superiores às da população geral.

As translocações robertsoneanas são, no total, 3,5 vezes mais frequentes que as translocações recíprocas: 5 vezes no grupo II (3,6/0,7%) e 2 vezes no grupo III (1,0/0,5%). Estas diferenças não são significativas porque há sobreposição dos limites de confiança das frequências - quadro III-6. Na literatura, não é concordante a frequência relativa destes dois tipos de translocação: Chandley (1979) refere que as translocações recíprocas ocorrem 5 vezes mais nos homens inférteis que na população geral, enquanto as robertsoneanas não apresentam aumento significativo; Retief et al. (1984) observaram a mesma frequência para ambas ao contrário de Bourrouillou et al. (1985) para quem as translocações robertsoneanas são 1,7 vezes mais frequentes que as recíprocas.

As inversões pericêntricas diagnosticadas não têm uma frequência significativamente diferente da encontrada na população geral - tanto no conjunto da amostra como nos oligozoospérmicos, não sendo significativa a diferença das frequências nestes dois grupos. A inversão pericêntrica do cromossoma 1 observada em 3 homens com oligozoospermia muito grave, com a mesma anomalia cromossómica transmitida pela mãe (que constituiu a primeira descrição na literatura mundial de uma inv per (1) envolvendo todo o braço curto - inv (1) (p36.3q12) - e associada com infertilidade (Barros et al. 1986)), pode ser interpretada como mais uma indicação da maior susceptibilidade da espermatogénese às anomalias cromossómicas de estrutura em equilíbrio quando comparada com a oogénese; os abortamentos precoces podem ter sido devidos a desequilíbrios cromossómicos resultantes de uma "aneussomia de recombinação". A variação do efeito de uma determinada anomalia cromossómica de estrutura na aptidão biológica observa-se não apenas entre sexos diferentes mas também no mesmo sexo, como o demontra o facto de uma das translocações robertsoneanas diagnosticadas ter sido de transmissão paterna. Isto significa que a identificação de uma anomalia cromossómica de estrutura num indivíduo do sexo masculino, sobretudo numa fase pré-reprodutiva em que não é possível a avaliação do esperma, deve implicar uma informação prognóstica prudente, não dando a perspectiva errada de uma inevitável infertilidade.

A maioria dos indivíduos com síndrome do metamacho são férteis e têm filhos cromossomicamente normais (De Grouchy e Turleau, 1984; Chandley, 1985; Benet e Martin, 1988). No entanto, os três 47,XYY observados têm uma lesão grave da espermatogénese (número de Ez/ml: 7 milhões, 300 mil, 200 mil) fazendo todos parte do grupo das oligozoospermias; neste grupo, a sua frequência é de 2,2% (limites de confiança de 95%: 0,73-6,31%) valor cerca de 17 vezes superior ao encontrado na população geral. Skakkebaek et al. (1973) observaram indivíduos 47,XYY com canalículos seminíferos variando entre a ausência de linha germinativa, bloqueio em espermatócito I e espermatogénese completa. Deste modo, as nossas observações corroboram a variabilidade das alterações espermáticas neste síndrome e é possível que a gravidade das oligozoospermias esteja relacionada com a hipótese de Burgoyne (1979): a ausência de emparelhamento de um cromossoma Y - "univalência Y" - conduz à morte dos espermatócitos I; por outro lado, devido às referências contraditórias da incidência relativa do síndrome na população geral e nos homens inférteis, é de destacar a frequência de 2,2%, tão significativamente superior à da população geral, que obriga a considerar o cariótipo 47,XYY um importante factor etiopatogénico na infertilidade masculina de causa cromossómica.

As consequências deletérias das anomalias cromossómicas na espermatogénese, sobretudo as verificadas nos parâmetros classicamente avaliados no esperma - concentração, morfologia e motilidade de espermatozóides - conduz à hipótese de o estudo do esperma poder constituir um

indicador fiável da existência de cromossomopatias. Abramsson et al. (1982) afirmam que a concentração e a morfologia dos espermatozóides são informativos e estão relacionados com a ocorrência de cariótipos anormais, sugerindo que não se realize o cariótipo quando esses parâmetros são normais. A esmagadora maioria das anomalias cromossómicas diagnosticadas na nossa amostra acompanham-se de oligo-asteno-teratozoospermia (11/14) enquanto em 2 casos há apenas asteno-teratozoospermia - t(13;14) e t(8;13) - e numa translocação robertsoneana 13;14 há normalidade em todos os parâmetros avaliados no esperma (quadro III-7). Os valores médios da morfologia e da motilidade (rápida + muito rápida) dos espermatozóides observados nos doentes com cromossomopatias são, respectivamente, 15,8 e 16,3%. Estes valores, nitidamente diferentes em relação às médias encontradas na totalidade da população masculina infértil estudada - morfologia: 31,6%; motilidade: 26,4% - são, todavia, sobreponíveis às médias da morfologia (16,9%) e da motilidade (14,2%) de todos os oligozoospérmicos. Como consequência, o diagnóstico de teratozoospermia e/ou astenozoospermia não é o desejado e importante indicador da existência de uma cromossomopatia. Se a diferença da incidência de anomalias cromossómicas - 8,0% nos oligozoospérmicos e 2,0% nos indivíduos com um número de Ez igual ou superior a 10 milhões/ml -, permite esperar com maior probabilidade uma anomalia cromossómica nas oligozoospermias, por outro lado demonstra que o homem infértil, embora normozoospérmico, tem uma probabilidade 3-4 vezes superior à esperada na população geral de possuir uma cromossomopatia.

Assim, defendemos o conceito de que a indiscutível indicação para realizar o estudo cromossómico é a infertilidade e não qualquer dos parâmetros definidos no esperma. Isto implica que na avaliação do homem infértil o cariótipo e o estudo do esperma devem ser simultâneos, não dependendo a realização daquele do resultado do segundo. A convicção desta perspectiva mantém-se apesar do conhecimento da posição de outros autores, como Retief et al. (1984) e Bourrouillou et al. (1985), que propõem como critério de selecção para o estudo cromossómico a existência de azoospermia ou oligozoospermia, o que permitirá a significativa redução da quantidade de cariótipos a realizar e o aumento considerável do número relativo de anomalias cromossómicas diagnosticadas. A obediência ao referido critério ter-nos-ia conduzido ao estudo cromossómico de apenas cerca de 30% dos indivíduos (soma das oligo e azoospermias) e a uma incidência de anomalias cromossómicas de 9,9% (20/203), valor cerca de 16 vezes superior ao da população geral; todavia, deixariam de ser identificadas cromossomopatias exactamente no grupo de homens inférteis onde, por razões de ordem clínica, tem mais interesse fazê-lo. De facto, a maior capacidade reprodutiva destes indivíduos em relação aos oligo e azoospérmicos implica que não só seja pelo menos tão importante do ponto de vista de interpretação etiopatogénica da infertilidade o diagnóstico de uma anomalia cromossómica como, na prática clínica e em consequência da maior fecundidade esperada, nos normozoospérmicos este diagnóstico é ainda mais importante por proporcionar a indiscutível indicação de diagnóstico

pré-natal (DPN) no caso de gravidez. O DPN tem aqui uma inequívoca justificação pelos desequilíbrios cromossómicos que podem estar presentes nos embriões, consequência directa das anomalias cromossómicas de estrutura (e das segregações meióticas 3:1 e adjacentes I e II) ou resultantes da interferência que estas anomalias exercerão sobre a meiose, favorecendo a segregação anormal de cromossomas não envolvidos na anomalia estrutural - efeito intercromossómico (Dutrillaux e Lejeune, 1970; Lindenbaum et al. 1985).

A incidência de anomalias meióticas nos homens inférteis é variável conforme os diversos autores - 1,4% (Chandley et al. 1976), 2,2% (Micic et al. 1981), 4,3% (Egozcue et al. 1983), devendo-se as diferenças sobretudo à interpretação do que deve ser considerado anomalia da meiose. Os dois primeiros valores correspondem a estudos realizados após biópsia testicular, enquanto o último inclui alterações encontradas no tecido testicular (4,8% de dessinapses) e no esperma (2,3% de dessinapses).

A expectativa inicial de estudar a meiose no tecido testicular - que, em geral, permite observar um maior número de figuras meióticas assim como possibilita uma melhor qualidade das mesmas - não se concretizou, porque os andrologistas não valorizam esta técnica na avaliação da infertilidade masculina e pela resistência por parte dos doentes. Esta atitude é compreensível e, porventura, justificada pelos elementos existentes: Egozcue et al. (1983) não observaram associação significativa entre oligo e/ou asteno e/ou teratozoospermia e anomalias meióticas, e

Skakkebaek (1981) afirma que os resultados disponíveis não permitem concluir que as anomalias da meiose nos indivíduos com cariótipo normal têm papel de relevo na etiopatogenia da infertilidade masculina. A ambiguidade na valorização etiopatogénica e prognóstica destas anomalias não legitima, na nossa perspectiva, a indicação da biópsia testicular como um meio fundamental de estudar a infertilidade, até pelo seu carácter invasivo e pelos riscos que envolve. Em termos éticos, esta investigação não seria aprovada.

A interpretação da dessinapse individual parcial observada é discutível, de acordo com o que referimos, para além de que as anomalias meióticas podem representar mais uma consequência citológica da alteração da espermatogénese pelos múltiplos factores possíveis do que a causa do seu bloqueio. No entanto, constitui, no mínimo, um possível co-factor etiopatogénico para a infertilidade e o eventual insucesso terapêutico, impondo também a necessidade de aconselhamento genético com indicação do estudo cromossómico pré-natal; de facto, embora seja teoricamente mais provável que as células com dessinapse sofram um bloqueio no decurso da espermatogénese, não chegando a espermatozóide, não é de excluir a total divisão e maturação celulares, resultando num produto de concepção cromossomicamente anormal. Deste modo, o estudo da meiose no esperma é um meio auxiliar de diagnóstico defensável, atendendo às informações que pode fornecer e pela sua inocuidade, embora seja necessário ter presente as limitações inerentes à ausência muito frequente

de espermatócitos I no ejaculado e à qualidade das figuras meióticas que muitas vezes tornam problemática a interpretação.

Para além das razões citadas para a realização sistemática do cariótipo nos casais inférteis, neste caso do elemento masculino, este estudo tem também ampla justificação pelo facto de o diagnóstico de uma anomalia cromossómica tornar muito mais criteriosa a aplicação de qualquer terapêutica favorecedora da fecundação, principalmente as técnicas de fertilização medicamente ajudada - inseminação artificial, transferência gamética intra-tubárica e fertilização "in vitro" -, não só pela sua inutilidade muito mais provável como, no caso de êxito, pelo maior risco de determinadas anomalias cromossómicas. Deste modo, compete ao médico explicar ao casal com toda a clareza, compreensão e tacto, a etiopatogenia e possibilidades (ou impossibilidades) terapêuticas da situação, permitindo-lhe uma atitude esclarecida e consciente, perante a sua infertilidade, a qual pode mesmo não incluir qualquer intervenção médica mas uma outra solução, de grande importância individual e social - a adopção.

Esta atitude será, em alguns casos, porventura a mais sensata e válida - até na perspectiva biológica: é que a infertilidade não deverá ser encarada invariavelmente como objecto de combate, pois pode constituir a única expressão do esoterismo que reveste muitas vezes os mecanismos de selecção natural.

V. CONCLUSÕES

1 - O espermograma permanece a pedra angular na investigação da infertilidade masculina. Todavia, apesar de fundamental, é simultaneamente impreciso pois, mesmo constituído pelo estudo de todos os parâmetros, não permite afirmar ou negar, em absoluto, a possibilidade de fecundação.

2 - Há uma correlação altissimamente significativa ($P<0,000001$) entre: número e morfologia, número e prova de hipo-osmolaridade, morfologia e motilidade, morfologia e prova de hipo-osmolaridade, motilidade e prova de hipo-osmolaridade.

3 - A inter-relação entre o número, morfologia, motilidade e prova de hipo-osmolaridade é directamente proporcional, com excepção da motilidade/número.

4 - A alteração das variáveis anteriormente referidas representa a exteriorização de anomalias fundamentais dos espermatozóides que dificultam ou impedem a fecundação; nesta perspectiva, o aparecimento isolado de oligo, terato ou astenozoospermia corresponderá à expressão parcial dessas anomalias estruturais ou funcionais, ainda desconhecidas.

5 - Os doentes com capacidade reprodutiva de pior prognóstico são os que apresentam:

a. número de espermatozóides inferior a 10 milhões/ml

b. percentagem de Ez morfologicamente normais inferior a 20%

c. motilidade, rápida e muito rápida, inferior a 10%.

6 - O estudo da vitalidade tem reduzido significado prognóstico na avaliação da capacidade fecundante de um indivíduo.

7 - O doseamento da frutose e ácido cítrico é irrelevante do ponto de vista diagnóstico e prognóstico na avaliação das oligo, terato e/ou astenozoospermias.

8 - A análise da prova de sobrevivência dos espermatozóides mostra diferenças muito significativas ($P<0,01$) do número, morfologia, motilidade e reacção à hipo-osmolaridade em função da sobrevivência normal ou anormal.

9 - A grande homogeneidade da motilidade nos grupos de sobrevivência normal e anormal, significa que é o parâmetro mais regularmente relacionado com a sobrevivência dos espermatozóides. Este facto, bem como a observação de que o maior coeficiente de correlação parcial tendo como referência a prova de hipo-osmolaridade acontece com a motilidade, possibilita-nos colocar esta no topo da hierarquia dos parâmetros tradicionais, globalmente importantes na definição da função espermática.

10- A associação e o paralelismo de resultados entre as provas de hipo-osmolaridade e de sobrevivência dos Ez, que têm um objectivo comum, leva-nos a defender a inclusão da prova de hipo-osmolaridade no protocolo de estudo do esperma, mesmo de rotina, dado o valor da informação que proporciona e as suas características de simplicidade e economia técnicas.

11- Apesar de no presente não haver nenhum "teste de fertilidade" com resultados indiscutíveis, a combinação de um correcto e rigoroso protocolo de análise dos parâmetros tradicionais avaliados no esperma - número, morfologia e motilidade - com a prova de

hipo-osmolaridade possui um relevante valor prognóstico da capacidade fecundante de um esperma.

12- A frequência de anomalias e/ou polimorfismos cromossómicos observados na amostra de homens inférteis (404) foi de 10,4%, com a distribuição seguinte: síndrome de Klinefelter - 2,5%; síndrome do metamacho - 0,7%; translocações robertsoneanas - 1,7%; translocações recíprocas - 0,5%; inversões pericêntricas - 0,7%; polimorfismos - 4,2%.

13- A incidência das cromossomopatias aumenta à medida que diminui o número de espermatozóides por ml - valores de 2,0 , 8,0 e 15,1% para, respectivamente, as normo, oligo e azoospermias. A conclusão de haver uma relação directamente proporcional é reforçada pela observação de uma diferença significativa ($P<0,02$) entre as frequências das cromossomopatias nos grupos II e III.

14- A frequência das anomalias cromossómicas nos indivíduos inférteis com espermatozóides no ejaculado (grupos II e III) é de 4,4%, sendo de 8,0% para o grupo II e de 2,0% para o III, percentagens que são, respectivamente, 7-8, 11-16 e 3-4 vezes superiores às da população geral.

15- As frequências globais das translocações robertsoneanas (1,73%) e das translocações recíprocas (0,5%) são, pela ordem indicada, 23 e 7 vezes superiores às da população geral.

16- As translocações robertsoneanas são, no total, 3,5 vezes mais frequentes que as translocações recíprocas, diferenças que, contudo, não são significativas devido à sobreposição dos limites de confiança das frequências.

17- As inversões pericêntricas diagnosticadas não têm uma frequência significativamente diferente da encontrada na população geral.

18- A variação do efeito de uma determinada anomalia cromossómica de estrutura na aptidão biológica observa-se não apenas entre sexos diferentes mas também no mesmo sexo.

19- Os 3 casos de síndrome do metamacho observados acompanham-se de oligozoospermia grave (1) e muito grave (2), tendo no grupo II a frequência de 2,2%. Este valor, muito superior ao da população geral (cerca de 17 vezes), obriga a considerar o cariótipo 47,XYY um factor etiopatogénico importante na infertilidade masculina de causa cromossómica.

20- A ausência de diferenças significativas nas frequências dos polimorfismos nos 3 grupos permite afirmar que, se estas variações cromossómicas têm alguma influência no processo reprodutivo, não será na produção de espermatozóides mas eventualmente a outros níveis, como o da formação aneuplóide de gâmetas por interferência na separação anafásica dos cromossomas.

21- Os valores médios da morfologia (15,8%) e da motilidade (16,3%) dos espermatozóides observados nos doentes com cromossomopatias são sobreponíveis às médias da morfologia (16,9%) e da motilidade (14,2%) de todos os oligozoospérmicos, pelo que o diagnóstico de terato e/ou astenozoospermia não é indicador da existência de uma cromossomopatia.

22- O homem infértil normozoospérmico tem uma probabilidade 3-4 vezes superior à da população geral de possuir uma anomalia cromossómica.

23- Dos dois factos anteriores pode deduzir-se que a indicação indiscutível para realizar o estudo cromossómico é a infertilidade e não qualquer dos parâmetros definidos no espermograma.

24- Na avaliação da infertilidade masculina o cariótipo e o espermograma devem ser estudados em simultâneo, não devendo depender a realização de um do resultado do outro.

25- A realização do cariótipo também nas normozoospermias fundamenta-se no interesse em diagnosticar uma cromossomopatia em indivíduos com maior fecundidade esperada que os oligo e azoospérmicos. Em relação a estes grupos, o cariótipo também é importante para a interpretação etiopatogénica da infertilidade mas mais ainda na perspectiva do aconselhamento genético.

26- A infertilidade de um casal pode significar a actuação, possivelmente útil, da selecção natural, pelo que as tentativas terapêuticas, sobretudo as de fertilização medicamente ajudada, devem ser exaustiva e cuidadosamente analisadas.

FINIS OPUS

LAUS DEO

BIBLIOGRAFIA

1 - Abeliovich D, Potashnik G, Dar H, Lugasi N, Rave D. Chromosomal rearrangements in three infertile men. Andrologia 18: 147, 1986.

2 - Abramsson L, Beckman G, Duchek M, Nordenson I. Chromosomal aberrations and male infertility. The J. Urology 128: 52, 1982.

3 - Abyholm T, Stray-Pederson S. Hypospermiogenesis and chromosomal aberrations. A clinical study of azoospermic and oligozoospermic men with normal and abnormal karyotype. Int. J. Andrology 4: 546, 1981.

4 - Aitken R J, Best F S M, Richarson D W, Djahanbakhch O, Templeton A, Lees M M. An analysis of semen quality and sperm function in cases of oligozoospermia. Fert. Steril. 38: 705, 1982.

5 - Aitken R J, Warner P,Best F S M, Templeton A, Djahanbakhch O, Mortimer D, Lees M M. The predictability of subnormal penetrating capacity of sperm in cases of unexplained infertility. Int. J. Andrology 6: 212, 1983.

6 - Alexander N J. Male evaluation and semen analysis. Clin. Obst. Gynaecol. 25: 463, 1982.

7 - Alper M M, Lee G S, Seibel M M, Smith D, Oskowitz S P, Ransil B J, Taymor M L. The relationship of semen parameters to fertilization in patients participating in a program of in vitro fertilization. J. In Vitro Fert. Embryo Transfer 2: 217, 1985.

8 - Ausmanas M, Tureck R W, Blasco L, Kopf G S, Ribas J, Mastroianni L. The zona-free hamster egg penetration assay as a prognostic indicator in a human in vitro fertilization program. Fert. Steril. 43: 433, 1985.

9 - Ayodeji O, Baker H W G. Is there a specific abnormality of sperm morphology in men with varicoceles? Fert. Steril. 45: 839, 1986.

10 - Baghdassarian A, Bayard F, Borgaonkar D S, Arnold E A, Solez K, Migeon C J. Testicular function in XYY men. John Hopkins Med. J. 136: 15, 1975. Cit. em 3

11 - Balkan W, Martin R H. Segregation of chromosomes into the spermatozoa of a man heterozygous for 14;21 Robertsonian translocation. Am. J. Med. Genet. 16: 169, 1983.

12 - Balkan W, Martin R H. Chromossome segregation into the spermatozoa of two men heterozygous for different reciprocal translocations. Hum. Genet. 63: 345, 1983.

13 - Barros A. O espermograma: protocolos actuais no estudo da esterilidade. Jornal do Médico CXVI: 57, 1984.

14 - Barros A. Infertilidade masculina de causa genética. Trabalho de síntese integrado nas provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. Faculdade de Medicina do Porto,, Julho 1986.

15 - Barros A, Tavares M C. Citogenética e infertilidade: o cariótipo de linfócitos e de meioses no diagnóstico e prognóstico. Jornal do Médico CXX: 723, 1986.

16 - Barros A, Tavares M C, Gomes M P, Tavares M P. Familial inv(1) (p36.3q12) associated with sterility. J. Med. Genet. 23: 90, 1986.

17 - Barros A, Tavares M C, Gomes M P, Tavares M P. Pericentric inversion and sterility. J. Med. Genet. 24: 510, 1987.

18 - Benet J, Martin R H. Sperm chromosome complements in a 47,XYY man. Hum. Genet. 78: 313, 1988.

19 - Berger R E, Alexander E R, Holmes K K. Etiology, manifestations and therapy of acute epididymitis: prospective study of 50 cases. J. Urol. 121: 750, 1979.

20 - Bloom S E, Goodpasture C. An improved technique for silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. Hum. Genet. 34: 199, 1976.

21 - Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Interrelations among the characteristics of human semen and a new system for classification of male infertility. Fert. Steril. 41: 95, 1984.

22 - Boué A, Gallano P. A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnosis. Prenatal Diagnosis, spec. iss. 4: 45, 1984.

23 - Boué J, Taillemite J L, Hazael-Massieux P, Lèonard C, Boué A. Association of pericentric inversion of chromosome 9 and reproductive failure in ten unrelated families. Humangenetik 30: 217, 1975.

24 - Bourrouillou G, Dastugue N, Colombies P. Chromosome studies in 952 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. Hum. Genet. 71: 366, 1985.

25 - Brandriff B, Gordon L, Ashworth L, Watchmaker G, Carrano A, Wyrobek A. Chromosomal abnormalities in human sperm: comparisons among four healthy men. Hum. Genet. 66: 193, 1984.

26 - Brandriff B, Gordon L, Ashworth L, Watchmaker G, Moore I I D, Wyrobek A J, Carrano A. Chromosomes of human sperm: variability among normal individuals. Hum. Genet. 70: 18, 1985.

27 - Brassesco M. Estudio bioquímico del eyaculado. Publicação da Fundacion Puigvert, Barcelona, 1983.

28 - Brassesco M. Estudio físico y citomorfológico del eyaculado. Publicação da Fundacion Puigvert, Barcelona, 1983.

29 - Bronson R A, Cooper G, Rosenfeld D L. Ability of antibody-bound human sperm to penetrate zona-free hamster ova in vitro. Fert. Steril. 36: 778, 1981.

30 - Bronson R A, Cooper G, Rosenfeld D L. Sperm-specific isoantibodies and autoantibodies inhibit the binding of human sperm to human zona pellucida. Fert. Steril. 38: 724, 1982.

31 - Buchanan J D, Fairley K F, Barrie J U. Return of spermatogenesis after stopping cyclophosphamide therapy. Lancet 2: 156, 1975.

32 - Burgoyne P S. Evidence for an association between univalent Y chromosomes and spermatocyte loss in XYY mice and men. Cytogenet. Cell Genet. 23: 84, 1979.

33 - Burgoyne P S. The role of the sex chromosomes in mammalian germ cell differentiation. Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique 18: 317. Cit. em 76.

34 - Butler M. The role of surgery in sub-fertility. Irish J. Med. Sci. (Suppl.) 148: 17, 1979. Cit. em 9.

35 - Cacheiro N L A, Russel L B, Swartont M S. Translocations, the predominant cause of total sterility in sons of mice treated with mutagens. Genetics 76: 73. Cit em 177

36 - Canki N, Dutrillaux B. Two cases of familial paracentric inversion in man associated with sex chromosomes anomaly. 47,XXY, inv(5) (q21;q23) and 45,X inv(7) (q11.3;q22.3). Hum. Genet. 47: 261, 1979.

37 - Carothers A D, Buckton K E, Collyer S, De Mey R, Frackiewicz A, Piper J, Smith L. The effect of variant chromosomes on reproductive fitness in man. Clin. Genet. 21: 280, 1982.

38 - Centerwall W R, Merrel P R. Familial D/D translocation t(13q;14q) eight members in four generations. Clin. Genet. 7: 91, 1975.

39 - Chaganti R S K, Jhanwar S C, Ehrenbard L T, Kuorides I A, Williams J J. Genetically determined asynapsis, spermatogenic degeneration and infertility in men. Am. J. Hum. Genet. 32: 833, 1980.

40 - Chandley A C. Cytogenetics of infertile men. Em "Human semen and infertility regulation in men". Editado por E.S.E. Hafez, St. Louis, 1976.

41 - Chandley A C. The chromosomal basis of human infertility. British Medical Bulletin 35: 181. Cit. em

42 - Chandley A C. The origin of chromosomal aberrations in man and their potential for survival and reproduction in the adult human population. Ann. Génèt. 24: 1, 1981.

43 - Chandley A C. Infertility and recurrent abortion. Em "Principles and Practice of Medical Genetics". A E H Emery, D L Rimoin (eds.). Churchill Livingstone, London, 1983.

44 - Chandley A C. Chromosomes. Em "Male infertility". Hargreave T B (ed.). Springer, New York, 1985. Cit. em 76

45 - Chandley A C, Edmond P E, Christie S, Gowans L, Fletcher J, Frackiewicz A, Newton M. Cytogenetics and infertility in man. Results of a five year survey of men attending a subfertility clinic. I. Karyotype and seminal analysis. Annals of Human Genetics 39: 231, 1975.

46 - Chandley A C, Goetz P, Hargreave T B, Joseph A M, Speed R M. On the nature and extent of XY pairing at meiotic prophase in man. Cytogen. Cell Genet. 38: 241, 1984.

47 - Chandley A C, Maclean N, Edmond P, Fletcher J, Watson G S. Cytogenetics and infertility in man. II. Testicular histology and meiosis. Annals of Human Genetics 40: 165, 1976.

48 - Chandley A C, Seuânez H, Fletcher J M. Meiotic behavior of five human reciprocal translocations. Cytogenet. Cell Genet. 17: 98, 1976.

49 - Cicero T J, Bell R D, Robins E. Function of the male sex organs in heroin and methadone users, N. Eng. J. Med. 292: 882, 1975.

50 - Clark G N, Elliot P J, Smaila C. Detection of sperm antibodies in semen using the immunobead test. Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol. 7: 118, 1985.

51 - Clark G N, Stojanoff A, Canchi M N. Immunoglobulin class of sperm-bound antibodies in semen. Em "Immunology of Reproduction". Ed. Bratanov, Sofia, 1982. Cit em 61.

52 - Comhaire F H. Towards an objective evaluation of signs and symptoms in male infertility. Int. J. Andrology, Suppl. 7: 3, 1987.

53 - Comhaire F H. Analysis of factors suspected to be related with the pathogenesis of infertility. Int. J. Andrology, Suppl. 7: 10, 1987.

54 - Comhaire F H. Objective criteria for diagnostic categories in the simplified management of male infertility. Int. J. Andrology , 48, 1987.

55 - Court-Brown W M. Chromosome studies on the general population. Em "Human Population Cytogenetics". Amsterdam, North Holland Publishing Co., 1967. Cit. em 207.

56 - Croquette M F, Couturier J, Dutrillaux B, Turleau C, Grouchy J. Présence, chez un homme stérile, de deux inversions pèricentriques des chromosomes 9: inv(9) (p11 q1209), inv(9) (pter q1209). Ann. Génèt. 22: 1, 53, 1979.

57 - Curtis D J. Meiotic chromosomes in an infertile male with an unbalanced Y/13 translocation. Humangenetik 37: 249, 1977.

58 - David G, Jouannet P, Martin-Boyce A, Spira A, Schwartz D. Sperm counts in fertile and infertile men. Fert. Steril. 4: 453, 1979

59 - De Almeida M. Immunologie et hypofertilites masculines. 4éme Journée du Groupement de l'Ouest de Lutte Contre la Sterilité. Dinard, Setembro 1987.

60 - De Almeida M, Soumah A, Ducot B, Jouannet P. Facteurs immunologiques d'infertilité masculine. Facteurs de la fertilité humaine. Paris, INSERM Publ. 103: 141, 1981.

61 - De Almeida M, Soumah A, Jouannet P. Incidence of sperm--associated immunoglobulins in infertile men with suspected autoimmunity to sperm. Int. J. Andrology 9: 321, 1986.

62 - De Almeida M, Soumah A, Ducot B, Jouannet P. Facteurs immunologiques d'infertilité masculine. Em "Facteurs de la fertilité humaine". Eds. A. Spira, P. Jouannet: 141, 1981. Cit. em 124.

63 - Derrick F C, Dahlberg B. Male genital tract infections and sperm viability. Hafez E S E, ed. Human semen and fertility regulation in men. St. Louis, Mosby, 1976.

64 - Dikshit R K, Buch J G, Mansuri S M. Effect of tobacco consumption on semen quality of a population of hypofertile males. Fert. Steril. 48: 334, 1987.

65 - Dor J, Rudak E, Aitken R J. Antisperm antibodies: their effect on the process of fertilization studied in vitro. Fert. Steril. 35: 535, 1981.

66 - Dutrillaux B, Covic M. Etude des facteurs influençant la denaturation thermique ménagée. Exp. Cell Res. 85: 143, 1974.

67 - Dutrillaux B, Gueguen J. Anomalies méiotiques et gamétiques multiples dans un cas de stérilité masculine. Ann. Génèt. 14: 49, 1971.

68 - Dutrillaux B, Lejeune J. Etude de la descendance des individus porteurs d'une translocation t(Dq;Dq). Ann. Génèt. 13: 11, 1970.

69 - Dutrillaux B, Rotman J, Gueguen J.. Aspects of male infertility. Ed. Were White, R., U. S. A., Williams and wilkins, 89, 1982.

70 - Dutrillaux B, Viegas-Péquignot E. High resolution of R- and G- banding on the same preparation. Hum. Genet. 57: 93, 1981.

71 - Edwards R G, Fishel S B, Purdy J M. In vitro fertilization of human eggs: analysis of follicular growth, ovulation and fertilization. Em "Fertilization of Human Egg In Vitro". Ed. H M Beier, H R Lindner. Berlin, Springer-Verlag: 169, 1983.

72 - Egozgue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Morer-Fargas F, Marina S. Meiotic studies in 1100 infertile and sterile males. Hum. Genet. 65/2: 185, 1983.

73 - Eicher E M. X-autossome translocations in the mouse: total inactivation versus partial inactivation of the X-chromosome. Adv. Genet. 15: 175. Cit. em 97.

74 - Eliasson R. Clinical examination on infertile men. Em Hafez E S E, ed. Human semen and fertilty regulation in men. St. Louis, Mosby, 1976.

75 - Eliasson R. Analysis of semen. The testis. Raven Press. New York, 1981. Cit. em 123.

76 - Emery A E H, Rimoin D L. Principles and Practice of Medical Genetics. Churchill Livingstone, New York, 1983.

77 - Emperaire J C, Ruffie A, Andebert A J. Les dosages hormonaux et biochimiques chez l'homme infécond. Em "La part de l'homme et la part de la femme dans la stérilité du couple". Masson, 1987.

78 - Epstein C J, Travis B. Preimplantation lethality of monosomy for mouse chromosome 19. Nature 280: 144, 1979.

79 - Evans H J. Sperm morphology in cigarette smokers. Em "Indicators of Genotoxic Exposure". Banbury report 13: 543. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982. Cit em 135.

80 - Evans H J, Fletcher J, Torrance M, Hargreave T B. Sperm abnormalities and cigarette smoking. Lancet, i: 627, 1981.

81 - Evans J A, Canning N, Hunter A G W, Martsolf J T, Ray M, Thompson D R, Hamerton J L. A cytogenetic survey of 14069 newborn infants III. An analisis of the significance and cytologic behavior of the Robertsonian and reciprocal translocations. Cytogenet. Cell Genet. 10: 96, 1978.

82 - Feneux D, Ducot B, Jeulin C, Serres C, Spira A, Jouannet P. Caractéristiques du sperme des hommes féconds et inféconds. Similitudes et différences. Em "Recherches récentes sur l'epidémiologie de la fertilité". Masson: 33, 1986.

83 - Ferguson-Smith M A. Autosomal polymorphism. Em "Medical genetics today". Eds. D. I. Rimoin, R. N. Schimte. Birth defects: original article series. New York: The National Foundation, 1974. Cit. em 97.

84 - Ferguson-Smith M A, Lennox B, Mack W S, Stewart J S S. Klinefelter's syndrome. Frequency and testicular morphology in relation to nuclear sex. Lancet: 167, 1957.

85 - Fjallbrant B. Cervical mucus penetration by human spermatozoa treated with antispermatozoal antibodies from rabbit and men. Acta Obstet. Gynécol. Scand. 48: 71, 1969.

86 - Ford C E. Genetic activity of sex chromosomes in germinal cells. Philos. Trans. R. Soc. Lond. 259: 53. Cit. em 177.

87 - Forejt J, Gregorová S. Meiotic studies of translocations causing male sterility in the mouse: I autosomal reciprocal translocations. Cytogenet. Cell Genet. 19: 159, 1977.

88 - Forejt J. Meiotic studies of translocations causing male sterility in the mouse: II double heterozygotes for robertsonian translocations. Cytogenet. Cell Genet. 23: 163, 1979.

89 - Foss G L, Lewis F J W. A study of four cases with Klinefelter's syndrome showing motile spermatozoa in their ejaculate. J. Reprod. Fertil. 25: 401, 1971.

90 - Fowlkes D M, Macleod J, O'Leary W M. T-mycoplasmas and human infertility: correlation of infection with alterations in seminal parameters. Fert. Steril. 26: 1212, 1975.

91 - Freund M, Peterson R N. Semen evaluation and fertility regulation in men. Mosby, St-Louis: 344, 1976.

92 - Friberg J, Gnarpe H. Mycoplasmas in semen from fertile and infertile men. Andrologia 6: 45, 1974.

93 - Fryns J P, Kleczkowska A, Kubien E, Van den Berghe H. Excess of mental retardation and/or congenital malformation in reciprocal translocations in man. Hum. Genet. 72: 1, 1986.

94 - Fryns J P, Van den Berghe H. Possible excess of mental handicap and congenital malformations in autossomal reciprocal translocations. Ann. Génèt. 22: 125, 1979.

95 - Funderburk S J, Spence M A, Sparkes R S. Mental retardation associated with "balanced" chromosome rearrangements. Am. J. Hum. Genet. 29: 136, 1977.

96 - Genest P. Chromosome variants and abnormalities detected in 51 married couples with repeated spontaneous abortions. Clin. Genet. 16: 387, 1979.

97 - Ghosh P K, Singh I P. Morphologic variability of human chromosome: polymorphism of constitutive heterochromatin. Hum. Genet. 32: 149, 1976.

98 - Giraldo A, Silva E, Martinez J, Campos C, Guzman J. Pericentric inversion of chromosome 1 in three sterile brothers. Hum. Genet. 58: 226, 1981.

99 - Glezerman M, Rakowszky M, Lunenfeld B, Beer R, Goldman B. Varicocele in oligospermic patients: pathophysiology and results after ligation and division of the internal spermatic vein. J. Urology 115: 562, 1976.

100- Grabski J, Pusch H, Schrren C, Passarge E, Held K, Bartsch W, Wernicke I. Klinische, hormonale, histologische und chromosomale Untersuchungen beim Klinefelter syndrome. Andrologia 11: 182, 1979.

101- Grossgebauer K, Henning A, Hartmann D. Hautarzt 28: 299, 1977. Cit. em 6.

102- Grouchy J de, Turleau C. Clinical Atlas of Human Chromosomes. Wiley, New York, 1984. Cit. em 18.

103- Hamerton J L. Robertsonian translocations in man: evidence for prezygotic selection. Cytogenetics 7: 260, 1968.

104- Hamerton J L, Boué A, Cohen M M, De La Chapelle, Hsu L Y, Lindsten J, Mikkelsen M, Robinson A, Stengel--Rutkowski D, Webb T, Willey A, Worton R. Chromosome disease. Prenatal Diagnosis, spec. iss.: 11, 1980.

105- Hamerton J L, Canning N, Ray M, Smith S. A Cytogenetic survey of 14069 newborn infants. Clin. Genet. 8: 223, 1975.

106- Hamerton J L, Ray M, Abbot J, Williamson C H, Ducasse G C. Chromosome studies in a neonatal population. Canad. Med. Ass. J. 106: 776, 1972. Cit. em 113.

107- Hargreave T B, Elton R A. Is conventional sperm analysis of any use?. Brit. J. Urol. 55: 774, 1983.

108- Hembree W C, Zeidenberg P, Nahas G. Marihuana effects on human gonadal function. Nahas G, Poton W D M, I-H J, eds. New York: Springer Verlag, 1976. Cit em 6.

109- Hendry W F, Polani P E, Pugh R C B, Sommerville I F, Wallace D M. 200 infertile male: correlation of chromosome, histological, endocrine and clinical studies. Brit. J. Urology 47: 899, 1976.

110- Hinkes E, Plotkin D. Reversible drug-induced sterility in a patient with acute leukaemia. JAMA 223: 1490, 1973.

111- Hirsch I, Gibbons W E, Lipshultz L I, Rossavik K K, Young R L, Poindexter A N, Dodson M G, Findley W E. In vitro fertilization in couples with male factor infertility. Fert. Steril. 45: 659, 1986.

112- Hook E B, Hamerton J L. The frequency of chromosome abnormalities detected in consecutive newborn studies. Em "Population cytogenetics". Eds. Hook E B, Porter I H. Academic Press, New York: 63, 1977.

113- Hurley J E, Pathak S. Elimination of nucleolus organizers in a case of 13/14 robertsonian translocation. Hum. Genet. 35: 163, 1977.

114- Jacobs P A, Beatty R A, Gluecksohn-Waelsch S (eds.). Proceedings of the International Symposium on the Genetics of the Spermatozoon. Copenhagen, 1972. Cit. em 185.

115- Jacobs P A, Frackiewicz A, Law P, Hilditch C J, Morton N E. The effect of structural aberrations of the chromosomes on reproductive fitness in man. II. Results. Clin. Genet. 8: 169, 1975.

116- Jacobs P A, Melville M, Ratcliffe S. A cytogenetic survey of 11680 newborn infants. Ann. Hum. Genet. 37: 359, 1974.

117- Jagiello G. Reproduction in Down syndrome. Em "Trisomy 21 (Down Syndrome) - Research perspectives". De la Cruz F F, Gerald P S, eds. University Park Press, Baltimore: 151, 1981. Cit. em 121.

118- Jalbert P, Sele B, Jalbert H. Reciprocal translocations: a way to predict the mode of imbalanced segregation by pachytene-diagram drawing. A study of 151 human translocations. Hum. Genet. 55: 209, 1980.

119- Jennings M G, McGowan M P, Baker H W G. Immunoglobulins on human sperm: validation of a screening test for sperm autoimmunity. Clin. Reprod. Fertil. 3: 335, 1985.

120- Jeyendran R S, Van der Ven H H, Perez-Pelaez M, Crabo B G, Zaneveld L J D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fert. 70: 219, 1984.

121- Johannison R, Gropp A, Winking H, Coerdt W, Rehder H, Schwinger E. Down's syndrome in the male. Reproductive pathology and meiotic studies. Hum. Genet. 63: 132, 1983.

122- Joseph A, Thomas I M. A complex rearrangement involving three autosomes in a phenotypically normal male presenting with sterility. J. Med. Genet. 19: 375, 1982.

123- Jouannet P. Exploration du testicule exocrine. Em "Médicine de la Reproduction Masculine". Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1984.

124- Jouannet P, De Almeida M. Anticorps antispermatozoides et infertilité masculine. Rev. Practicien 33: 3133, 1983.

125- Junca A M, Mandelbaum J, Plachot M, Grouchy J. Evaluation de la fécondance du sperme humain par la fécondance "in vitro" interspecifique (homme--hamster). Ann. Génèt. 25: 92, 1982.

126- Kamada M, Daitoh T, Hasebe H, Irahara M, Yamano S, Mori T. Blocking of human fertilization in vitro by sera with sperm immobilizing antibodies. Am. J. Obstet. Gynaecol. 153: 328, 1985.

127- Kaizer P. Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics. Hum. Genet. 68: 1, 1984.

128- Kjessler B. Karyotype, meiosis and spermatogenesis in sample of men attending an infertility clinic. Basel, S. Karger, 1966. Cit. em 162.

129- Kolodny R C, Masters W H, Kolodner R M, Toro G. Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marihuana use. N. Eng. J. Med. 290: 872, 1974.

130- Koulischer L, Schoysman R. Chromosomes and human infertility. I. Mitotic and meiotic chromosome studies in 202 consecutive male pacients. Clin. Genet. 5: 116, 1974.

131- Kunze J, Maw G. A1 e C9 marker chromosomes in children with combined minor and major malformations. Lancet I: 273, 1975.

132- Kunze J, Tolksdorf M. Identification of chromosomal polymorphisms and aberrations identified by new cytogenetical methods. Z. Kinderheilk. 117: 29, 1974. Cit. em 97.

133- Kursh E D. What is the incidence of varicocele in a fertile population?. Fert. Steril. 48: 510, 1987.

134- Kuzan F B, Muller C H, Zarutskie P W, Dixon L L, Soules M R. Human sperm penetration assay as an indicator of sperm function in human in vitro fertilization. Fert. Steril. 48: 282, 1987.

135- Lahdetie J, Husgafvel-Pursiainen K. Cigarette smoking - a possible genotoxic hazard to male germ cells? Int. J. Androl. 10: 431, 1987.

136- Laws-King A, Trounson A, Sathnanthan H, Kola I. Fertilization of human oocytes by microinjeccion of a single spermatozoon under the zona pellucida. Fert. Steril. 48: 637, 1987.

137- Léonard C, Bisson J P, David G. Male sterility associated with familial translocation heterozygoty: t(8;15) (q22;p11). Arch. Androl. 2: 269, Cit. em

138- Lifchytz E, Lindsley D L. The role of X-chromosome inactivation during spermatogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 69: 182. Cit. em 177.

139- Lindenbaum R H, Bobrow M. Reciprocal translocations in man. 3:1 meiotic disjunction resulting in 47 or 45 chromosome offspring. J. Med. Genet. 12: 29, 1985.

140- Lindenbaum R H, Hultèn M, Mcdermott A, Seabright M. The prevalence of translocations in parents of children with regular trisomy 21: a possible interchromosomal effect? J. Med. Genet. 22: 24, 1985.

141- Lindsley D L, Edington C W, Halle J von. Sex-linked recessive lethals in drosophilla, whose expression is suppressed by the Y-chromosome. Genetics 45: 1649, 1980. Cit. em 147.

142- London S N, Haney A F, Weiberg J B. Macrophages and infertility: enhancement of human macrophage--mediated sperm killing by antisperm antibodies. Fert. Steril. 43: 274, 1985.

143- Lubs H A, Ruddle F H. Application of quantitative Karyotype to chromosome variation in 4400 consecutive newborns. Em "Human population cytogenetics". P A Jacobs, W C Price, P Law eds. Edimburgh Univ. Press, 1970. Cit. em 97.

144- Lunenfeld B. Infertilité masculine. Mèdicine de la reproduction masculine. Flammarion Mèdicine--Sciences. Paris. 385, 1984

145- Macleod J. Seminal cytologie in the presence of varicocele. Fert. Steril. 16: 735, 1965.

146- Macleod J, Gold R Z. The male factor in fertility and infertility. II. Spermatozoon counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriage. J. Urol. 63: 436, 1951. Cit. em 160.

147- Madan K. Balanced structural changes involving the human X: effect on sexual phenotype. Hum. Genet. 63: 216, 1983.

148- Mahadevan M M, Trounson A O. The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. Fert. Steril. 42: 400, 1984.

149- Mandelbaum J, Junca A M, Plachot M, Salat-Baroux J, Cohen J J. Tests of fertilizing capacity. Improvement of deficient semen. "Human in vitro fertilization; actual problems and prospects". Elsevier Science eds. 109, 1984.

150- Mandelbaum J, Plachot M, Junca A M. Comment apprécier le pouvoir fècondant du sperm avant FIV? Em "La part de l'homme et la part de la femme dans la sterilité du couple". Masson: 187, 1987.

151- Mann T, Lutwak-Mann C. Male reproductive function and semen. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, 1981.

152- Mardh P A, Ripa T, Svensson L, Westron L. Chlamydia Trachomatis infection in patients with acute salpingitis. N. Engl. J. Med. 296: 1377, 1977.

153- Marmor D, Taillemite J-L, Akker J, Portnoi M-F, Porrier N, Joye N, Delafontaine D, Roux C. Semen analysis in subfertile balanced-translocation carriers. Fert. Steril. 34: 496, 1980.

154- Martin R H. Analysis of human sperm chromosome complement from a male heterozygous for reciprocal translocation t(11;22) (q23;q11). Clin. Genet. 25: 357, 1983.

155- Martin R H. Selection against chromosomally abnormal sperm - fact or fiction? Hum. Genet. 63: 406, 1983.

156- Martin R H, Balkan W, Burns K, Rademaker A W, Linn C C, Rudd N L. The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa. Hum. Genet. 63: 305, 1983.

157- Martin R H, Taylor J P. Relationship and accuracy of zona-free hamster ova assay in assessment of male fertility. British J. Obst. Gynaecol. 89: 951, 1982.

158- Martin R H, Rademaker A W, Hildebrand K, Long-Simpson L, Peterson D, Yamamoto J. Variation in the frequency and type of sperm chromosomal abnormalities among normal men. Hum. Genet. 77: 108, 1987.

159- Mattei M G, Mattei J F, Ayme S, Giraud F. X-autosome translocations: cytogenetic characteristics and their consequences. Hum. Genet. 63: 295, 1982.

160- Meistrich M L, Brown C C. Estimation of the increased risk of human infertility from alterations in semen characteristics. Fert. Steril. 40: 220, 1983.

161- Mendelson J H, Mello N K. Biologic concomitants of alcoholism. N. Engl. J. Med. 301: 912, 1979.

162- Micic M, Micic S, Diklic V. Chromosomal constitution of infertile men. Clin. Genet. 25: 33, 1984.

163- Micic M, Micic S, Ilic V. Histological and meiotic evaluation of infertile men. Andrologia 13: 499, 1981.

164- Monden Y, Koshiyama K, Matsumoto K. Influence of major surgical stress on plasma testosterone, plasma LH and urinary steroids. Acta Endocrinol. 69: 542, 1972.

165- Nielsen J, Friedrich U, Hreidarsson A B, Noel B, Quack B, Mottet J. Brilliantly fluorescing enlarged short arms D or G. Lancet 1: 1049, 1974.

166- Nielsen J, Rasmussen K. Y-autosomal translocations. Clin. Genet. 9: 609, 1976.

167- Panidis D, Brozos G, Margaritis G, Vlassis G, Makedos G, Papaloucas A. The contribution of sperm morphology to the diagnostic approach of varicocele. Acta Endocrinol. (Copenh.) Suppl. 265: 20, 1984. Cit. em 9.

168- Paulson J D, Polakoski K L. Isolation of a spermatozoal immobilization factor from Escherichia coli filtrates. Fert. Steril. 28: 182, 1977.

169- Pearson P L, Ellis J D, Evans H J. A gross reduction in chiasma formation during meiotic prophase and a defective DNA repair mechanism associated with a case of human male infertility. Cytogenet. 9: 460, 1970. Cit. em 193

170- Pinatel M C. La lecture du spermatogramme. Em "La part de l'homme et la part de la femme dans la sterilité du couple", Masson: 17, 1987.

171- Poland M L, Moghissi K S, Giblin P T, Ager J W, Olson J M. Variation of semen measure within normal men. Fert. Steril. 44: 396, 1985.

172- Purohit V, Singh H H, Ahluwalia B S. Evidence that the effects of methadone and marihuana on male reproductive organs are mediated at different sites in rats. Biol. Reprod. 20: 1039, 1979. Cit. em 6.

173- Ratcliffe S G, Stewart A L, Melville M M, Jacobs P A, Keavy A J. Chromosome studies on 3500 newborn male infants. Lancet i: 121, 1970.

174- Rehewy M S E, Hafez E S E, Thomas A, Brown W J. Aerobic and anaerobic bacterial flora in semen from fertile and infertile groups of men. Arch. Androl. 2: 263, 1979.

175- Retief A E, Van Zyl J A, Menkveld R, Fox M F, Kotze G M, Brusnicky J. Chromosome studies in 496 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. Hum. Genet. 66: 162, 1984.

176- Rieger R, Michaelis A, Green M M. A glossary of Genetics and cytogenetics. Springer-Verlag, Berlim, 1968.

177- Rivera H, Alvarez-Arratia M C, Moller M, Cantu J M. Familial inv(1) (p3500 q21.3) associated with azoospermia. Hum. Genet. 66: 165, 1984.

178- Robinson D, Rock J. Intrascrotal hyperthermia induced by scrotal insulation: effect on spermatogenesis. Obstet. Gynaecol. 29: 217, 1967.

179- Robinson D, Rock J, Menkin M F. Control of human spermatogenesis by induced changes in intrascrotal temperature. JAMA 204: 290, 1968.

180- Rodriguez-Rigau L J, Smith K D, Steinberg E. Varicocele and the morphology of spermatozoa. Fert. Steril. 35: 54, 1981.

181- Rogers B J, Bastias C, Krivacka T, Thompson T, Buck A, Freeman M, Wentz A C. Inability of semen parameters to predict fertilization success in IVF. Fert. Steril. 295, Suppl. 1986.

182- Rosenman A, Wahrman J, Richler C, Voss R, Persitz A, Goldman B. Meiotic association between the XY chromosomes and unpaired autossomal elements as a cause of human male sterility. Cytogenet. Cell Genet. 39: 19, 1985.

183- Rudak E, Jacobs P A, Yamagimachi R. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. Nature 274: 911, 1978.

184- Sachot J L, Ratajczak A. Traitement des varicoceles 4ème Journée du Groupement de l'Ouest de Lutte contre la Sterilité. Dinard, Setembro 1987.

185- Salisbury G W, Hart R G, Lodge J R. The spermatozoan genome and fertility. Am. J. Obstet. Gynaecol. 128: 3, 342, 1977.

186- Schirren C. Fertilitatsstorungen des Mannes. Diagnostic, Biochemie des Spermaplasmas, Hormontherapie. Stuttgart. F. Enke. Cit. em 192.

187- Schoenfeld C, Amelar R D, Dubin L. Clinical experience with sperm antibody testing. Fert. Steril. 27: 1199, 1976.

188- Schrader S M, Platek S F, Zaneveld L J D, Perez-Pelaez M, Jeyendran R S. Sperm viability: a comparison of analytical methods. Andrologia 18:530, 1986.

189- Schwartz D. Variations physiolologiques du sperm. La Revue du Praticien 33, 57: 3109, 1983.

190- Seabright M. A rapid banding for human chromosomes. Lancet ii: 971, 1971.

191- Shalgi R, Dor J, Rudak E, Luski A, Goldman B, Maschiach S, Nebel L. Penetration of sperm from teratospermic men into zona-free hamster eggs. Int. J. Andrology 8: 285, 1985.

192- Sheriff D S. Setting standards of male fertility. I. Semen analysis in 1500 patients - a report. Andrologia 15: 687, 1983.

193- Simpson J L. Disorders of Sexual Differentiation. Etiology and clinical delineation. Academic Press, New York, 1976.

194- Skakkebaek N. Cytogenetics in male hypogonadism. Burger H, Kretser D de (eds.). The testis. Raven Press, New York, 401, 1981. Cit em 72.

195- Skakkebaek N E, Zenthen E, Nielsen J, Yde H. Abnormal spermatogenesis in XYY males: a report on four cases ascertained through a population study. Fertil. Steril. 24: 390, 1973.

196- Smith A, Fraser I S, Elliott G. An infertile male with balanced Y;19 translocation. Review of Y:autosome translocations. Ann. Génèt. 22: 4, 189, 1979.

197- Sonta S, Fukui K, Yamamura H. Selective elimination of chromosomally unbalanced zygotes at the two-cell stage in the chinese hamster. Cytogenet. Cell Genet. 38: 5, 1984.

198- Stearns P E, Droulard K E, Sahhar F H. Studies bearing on fertility of male and female mongoloids. Am. J. Ment. Defic. 65: 37, 1960.

199- Steeno O, Knops J, Declerck L, Adimoelja A, Van der Voorde H. Prevention of fertility disorders by detection and treatment of varicocele at school and college age. Andrologia 8: 47, 1976.

200- Steinberger E. Interpretation of the semen analysis in the light of the couple's fertility potential. Am. Soc. Androl. Course: Basic and Clinical Aspects of Human Semen. Los Angeles, CA: 57, 1984. Cit em 215.

201- Sumner A T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res. 75: 304, 1972.

202- Talbert L M, Hammond M G, Halme J, O'Rand M, Fryer J G, Ekstrom R D. Semen parameters and fertilization of human oocytes in vitro: multivariable analysis. Fert. Steril. 48: 270, 1987.

203- Teague N S, Boyarsky S, Glenn J F. Interference of human spermatozoa mobility by Escherichia coli. Fert. Steril. 22: 281, 1971.

204- Templado C, Vidal F, Marina S, Pomerol J M, Egozcue J. A new meiotic mutation, desynapsis of individual bivalente. Hum. Genet. 59: 345, 1981.

205- Templado C, Vidal F, Navarro J, Egozcue J. Improved technique for the study of meiosis in ejaculate: results of the first 50 consecutive cases. Hum. Genet. 72: 275, 1986.

206- Tho S P T, Behzadian A, Byrd J R, Tischfield J A, McDonough P G. Use of deoxyribonucleic acid probes to test for Yq11 deletions in males with spermatogenic arrest. Fert. Steril. 48: 858, 1987.

207- Tho S P T, Byrd J, McDonough P. Chromosome polymorphism in 110 couples with reproductive failure and subsequent pregnancy outcome. Fert. Steril. 38: 6, 688, 1982.

208- Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. Hum. Genet. 34: 119, 1976.

209- Tiepolo L, Zuffardi O, Fraccaro M, Giarola A. Chromosome abnormalities in male infertility. Proceedings of International Symposium on oligozoospermia. L'Aquila (Italy), 1980. Cit. em 76.

210- Tiepolo L, Zuffardi O, Fraccaro M, Giarola A. Oligozoospermia: recent progress in andrology. Ed. G. Frajese et al. Raven Press, 1981. Cit em 162.

211- Tjoa W S, Smolensky M M, Hsi B P, Steinberger E, Smith K D. Circannual rythm in human sperm count revealed by serially independent sampling. Fert. Steril. 38: 454, 1982.

212- Toth A, Gaál M, Sára G, Lázló J. Pericentric inversion of chromosome 1 in an azoospermic man. J. Med. Genet. 19: 303, 1982.

213- Tsenghi C, Metaxoton-Stavridaki C, Stratakibeneton M, Kalpini-Mavron A, Matsaniotis N. Chromosome studies in couples with repeated spontaneous abortions. Obst. Gynaecol. 47: 463, 1976.

214- Ulstein M, Capell P, Holmes K K, Paulsen C A. Nonsymptomatic genital tract infection and male infertility. Hafez E S E, ed. Human semen and fertility regulation in men. St. Louis, Mosby, 1976.

215- Van der Ven H H, Jeyendran R S, Al-Hasani S, Perez-Palaez M, Diedrich K, Zaneveld L J D. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. J. Androl. 7: 190, 1986.

216- Vogt H J, Heller W D, Borelli G. Sperm quality of healthy smokers, ex-smokers and never-smokers. Fert. Steril. 45: 106, 1986.

217- Zackai E H, Emmanuel B S. Site specific reciprocal translocation, t(11;22) (q23;q11) in several unrelated families with 3:1 meiotic disjunction. Am. J. Med. Genet. 7: 507, 1980.

218- Zaini A, Jennings M G, Baker H W G. Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men?. Int J. Andrology 8: 427, 1985.

219- Zenzes M T, Reed T E, Schubens P, Freund I. Sperm from some infertile men may consist of several populations. Fert. Steril. 48: 125, 1987.

220- WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. World Health Organization. Cambridge University Press, 1987.

221- Witkin S S, Toth A. Relationship between genital tract infections, sperm antibodies in seminal fluid and infertility. Fert. Steril. 40: 805, 1983.

222- Wolnisty C. Orchitis as a complication of infectious mononucleosis: report of a case. N. Engl. J. Med. 266: 88, 1962.

223- Yamada K, Nanko S, Hattori S, Isurugi K. Cytogenetic studies in a Y-to-X translocation observed in three members of one family, with evidence of infertility male carriers. Hum. Genet. 60: 85, 1982.

224- Yamagimachi R, Yamagimachi H, Rogers B J. The use of zona-free animal ova as a test systam for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol. Reprod. 15: 471, 1976.

225- Yunis E, Garcia-Conti F L, Torres-de Caballero O M, Giraldo A. Yq delection, aspermia, and short stature. Hum. Genet. 39: 117, 1877.

226- Yunis J J. High resolution of human chromosomes. Science 191: 1268, 1976.