



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

2011/2012

Carla Araújo Maia  
Anomalias Cromossómicas na  
Infertilidade Masculina

março, 2012

FMUP



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Carla Araújo Maia  
Anomalias Cromossómicas na  
Infertilidade Masculina

**Mestrado Integrado em Medicina**

**Área: Genética Médica**

**Trabalho efetuado sob a Orientação de:  
Professor Doutor Alberto Barros**

**Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:  
Arquivos de Medicina**

março, 2012

**FMUP**

Eu, Carla Araújo Maia, abaixo assinado, nº mecanográfico 060801200, estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/03/2012

Assinatura: Carla Araújo Maia

Nome: Carla Araújo Maia

Endereço eletrónico: med06200@med.up.pt Telefone ou Telemóvel: 969175458

Número do Bilhete de Identidade: 13360574

Título da **Dissertação/Monografia** (cortar o que não interessa):

Anomalias Cromossómicas na Infertilidade  
Masculina

Orientador:

Professor Doutor Alberto Manuel Barros da Silva

Ano de conclusão: 2012

Designação da área do projeto:

Genética Médica

É autorizada a reprodução integral desta **Dissertação/Monografia** (cortar o que não interessar) para efeitos de investigação e de divulgação pedagógica, em programas e projetos coordenados pela FMUP.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/03/2012

Assinatura: Carla Araújo Maia

## **Anomalias Cromossómicas na Infertilidade Masculina**

Carla Maia \*

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Hospital de S.João. Porto

\*Aluna do 6º ano da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

### **Correspondência**

Carla Araújo Maia

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Alameda Prof. Hernâni Monteiro

4200-319 Porto PORTUGAL

Contacto telefónico: 969175458

Correio Eletrónico: [med06200@med.up.pt](mailto:med06200@med.up.pt)

### **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Alberto Barros, pela atenção, disponibilidade e espírito crítico ao longo da orientação deste trabalho.

### **Contagem de palavras**

Resumo: 207

Abstract: 196

Texto Principal: 4979

## **Resumo**

A infertilidade, definida pela incapacidade de conceber um filho após um ano de relações sexuais regulares não protegidas, afeta um em cada seis casais em idade reprodutiva, nos países ocidentais.

Em cerca de metade dos casais que recorrem ao médico por este problema, existe um fator masculino de infertilidade, que está frequentemente relacionado com alterações cromossômicas.

No que diz respeito às anomalias cromossômicas numéricas, o Síndrome de Klinefelter e os homens XYY são as alterações mais comumente associadas a infertilidade masculina.

Por sua vez, as translocações recíprocas e Robertsonianas, seguidas pelas inversões cromossômicas e os pequenos cromossomas marcadores supranumerários, são as alterações cromossômicas estruturais mais frequentes nos homens inférteis.

Há menos de duas décadas atrás, os casais em que o homem sofria de azoospermia ou oligozoospermia severa não conseguiam ter filhos. Com o advento da microinjeção intracitoplasmática do espermatozoide (ICSI), a concepção de um filho biológico tornou-se possível para muitos destes casos.

Todavia, a utilização da ICSI ultrapassa as barreiras da seleção natural que impedem a fertilização do oócito por espermatozoides anormais, o que pode trazer sérias consequências para a descendência.

No futuro, a espermatogênese *in vitro* poderá vir a tratar algumas das formas mais graves de infertilidade masculina, constituindo uma oportunidade para muitos homens atualmente estéreis.

**Palavras-chave:** anomalias cromossômicas, infertilidade masculina, técnicas de reprodução assistida.

## **Abstract**

Infertility is defined by the incapacity to conceive after one year of regular unprotected intercourse, and affects one in six couples in the reproductive age, in the western countries.

In about half of couples who seek for medical help, there is a male infertility factor, which is frequently related with chromosomal abnormalities.

In what concerns to numerical chromosomal abnormalities, Klinefelter's Syndrome and men XYY are the abnormalities more commonly associated with male infertility.

On the other hand, reciprocal and Robertsonian translocations, followed by chromosomal inversions and small supernumerary marker chromosomes, are the most frequent structural chromosomal abnormalities in infertile men.

Less than two decades ago, the couples whose male partner suffered from azoospermia or severe oligozoospermia couldn't conceive a child. With the advent of intracytoplasmic sperm microinjection (ICSI), the conception of a biological son has become possible for many of these cases.

However, the utilization of ICSI overcomes the barriers of natural selection which impede the oocyte fertilization by abnormal spermatozoa, and that can bring serious consequences for the descent.

In the future, *in vitro* spermatogenesis will be treating some of the most severe forms of male infertility, constituting an opportunity for many men actually sterile.

**Key Words:** chromosome aberrations, male infertility, assisted reproductive techniques.

## Índice

Lista de siglas.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	8
Anomalias Cromossômicas e Infertilidade Masculina.....	9
Anomalias Cromossômicas Numéricas.....	9
Síndrome de Klinefelter.....	9
Homens 47,XYY.....	11
Anomalias Cromossômicas Estruturais.....	12
Translocações Recíprocas.....	12
Translocações Recíprocas Autossomas-Gonossomas.....	13
Translocações Robertsonianas.....	15
Efeito Intercromossômico.....	16
Inversões.....	16
Inversões Pericêntricas.....	17
Inversões Paracêntricas.....	17
Pequenos Cromossomas Marcadores Supranumerários.....	18
Reprodução Medicamente Assistida.....	19
Espermatogênese <i>in vitro</i> – <i>perspetivas futuras</i> .....	20
Conclusão.....	23

Referências Bibliográficas.....24

## **Lista de siglas**

DGPI	Diagnóstico genético pré-implantação
DPN	Diagnóstico pré – natal
FSH	Hormona folículo – estimulante
ICSI	Microinjeção intracitoplasmática do espermatozoide
RMA	Reprodução medicamente assistida
TESE	Extração de espermatozoides testiculares

## Introdução

A saúde sexual e reprodutiva é um aspeto essencial para o indivíduo, o casal e a família, assim como para o desenvolvimento social e económico das sociedades (1). Na sociedade ocidental, a parentalidade é encarada por ambos os sexos como um dos mais importantes papéis na idade adulta (2). O advento dos anticoncetivos orais, assim como o desenvolvimento das técnicas de reprodução medicamente assistida, contribuiu para o surgimento da ilusão de que o Homem pode ter os seus próprios filhos se e quando quiser. Esta crença, aliada ao facto dos filhos representarem atualmente um capital emocional, em vez do significado económico que outrora detinham, reflete-se no aumento do impacto psicológico, emocional e relacional gerado pela infertilidade (2).

A infertilidade, definida como a incapacidade de conceber após um ano de relações sexuais regulares não protegidas (3), afeta um em cada seis casais em idade procriativa, nos países ocidentais (2).

Em cerca de metade dos casais inférteis, a infertilidade é atribuída ao fator masculino (4). A incidência de anomalias cromossómicas como fator causal de infertilidade masculina varia entre 2 e 8% (5).

No Homem, como em todos os mamíferos, os gâmetas portadores de anomalias cromossómicas poderão ter menos probabilidades de fertilização, através de mecanismos de seleção natural (6). Todavia, o desenvolvimento de técnicas de reprodução medicamente assistida, como a fertilização *in vitro* (FIV) e a microinjeção intracitoplasmática do espermatozoide (ICSI), permite a reprodução em muitas situações de infertilidade em que pode existir um risco aumentado de transmissão de alterações genéticas à descendência (7).

Este trabalho tem como objetivos a pesquisa, análise e síntese de bibliografia subordinada ao tema, com vista à elaboração de uma revisão bibliográfica em que se analisarão as anomalias cromossómicas com maior relevância na infertilidade masculina. Abordar-se-ão também as soluções que a medicina disponibiliza a estes doentes, assim como eventuais perspetivas futuras em relação a novos tratamentos.

## **Material e Métodos**

A elaboração desta monografia baseou-se numa pesquisa bibliográfica realizada na base de dados Pubmed no dia 10 de outubro de 2011, utilizando a expressão “*male infertility genetics*”. Os resultados foram limitados aos artigos elaborados nos últimos dez anos, sobre indivíduos do sexo masculino, e escritos em Inglês.

Esta pesquisa inicial disponibilizou 3216 artigos, dos quais foram selecionados 207, pela leitura do título. Destes, foram excluídos 172, pela leitura do abstract.

Foram também incluídos 16 artigos encontrados na bibliografia de artigos obtidos na pesquisa inicial.

Com vista à elaboração do último capítulo – “Espermatogénese in vitro – perspectivas futuras”, procedeu-se à realização de uma pesquisa bibliográfica na base de dados Pubmed, no dia 5 de março de 2012, utilizando a expressão “*spermatogenesis in vitro*”. Os resultados foram limitados aos artigos elaborados nos últimos 5 anos, sobre indivíduos do sexo masculino, e escritos em inglês. Esta pesquisa disponibilizou 120 resultados, dos quais foram selecionados 5, pela leitura do título. Foram também incluídos 2 artigos encontrados na bibliografia dos artigos selecionados.

Incluíram-se ao todo 58 referências bibliográficas neste trabalho.

## **Anomalias Cromossômicas e Infertilidade Masculina**

A possível associação entre anomalias cromossômicas e infertilidade masculina tornou-se pela primeira vez evidente após um estudo de cariótipo realizado em 6982 homens subférteis. Neste estudo, verificou-se que as anomalias cromossômicas estavam presentes em 5,3% dos homens inférteis, em contraposição com uma prevalência de 0,6% na população geral [referenciado em (8)].

As anomalias cromossômicas podem ser numéricas ou estruturais (7).

### **Anomalias Cromossômicas Numéricas**

As anomalias cromossômicas numéricas subdividem-se em poliploidias e aneuploidias (7).

As poliploidias, que consistem na multiplicação de todo o material genético (3n, 4n, por exemplo) são, em regra, incompatíveis com a vida (7).

As aneuploidias consistem na perda ou ganho de um ou mais cromossomas (7), e a sua incidência está aumentada nos homens inférteis (9). O Síndrome de Klinefelter constitui a aneuploidia mais frequentemente diagnosticada nos homens inférteis, à qual se segue o cariótipo XYY (5).

#### *Síndrome de Klinefelter*

O Síndrome de Klinefelter é uma aneuploidia dos cromossomas sexuais que se caracteriza pela presença de pelo menos um cromossoma X extra, em adição ao cariótipo masculino normal, 46,XY (10). Foi descrito pela primeira vez em 1942, por Harry F. Klinefelter, como uma tríade de ginecomastia, hipogonadismo hipergonadotrófico e infertilidade (11).

Ocorre em 1/1000 indivíduos do sexo masculino (3), e constitui a causa genética mais frequente de infertilidade masculina (12).

O cariótipo mais frequentemente encontrado nestes doentes é 47,XXY, que ocorre em cerca de 80% dos casos de Síndrome de Klinefelter; os restantes 20% dizem respeito a aneuploidias mais complexas (48,XXXYY, 48,XXYY ou 49,XXXYY), ou mosaicismo 46,XY/47,XXY [referenciado em (13)]. Estas anomalias cromossômicas originam-se por não disjunção, durante as divisões meióticas da gametogénese ou nas primeiras divisões mitóticas do embrião (12). No cariótipo 47,XXY, o cromossoma extra é herdado do pai em 50% dos casos [referenciado em (12)], ao contrário do que

acontece nas trissomias autossômicas, em que apenas 10% dos casos resultam de não disjunções paternas (12).

O fenótipo é muito variável, mas a rarefação pilosa, ginecomastia e diminuição do volume testicular são características comuns (13). A análise histológica do tecido gonadal destes pacientes revela geralmente ausência de células germinativas, fibrose e hialinização dos túbulos seminíferos e hiperplasia das células de Leydig (11). Desconhece-se o mecanismo exato pelo qual ocorre a degeneração das células germinativas (13), mas pensa-se que deverá ser despoletada pela presença do cromossoma X extra [referenciado em (13)].

Nos cerca de 10% de indivíduos com Síndrome de Klinefelter que apresentam mosaicismo 46, XY/47, XXY podem existir espermatozoides no ejaculado, pelo que estão reportados casos de paternidade espontânea [referenciado em (13)].

Por outro lado, os homens com Síndrome de Klinefelter não mosaico apresentam azoospermia, o que tradicionalmente restringia as suas expectativas de paternidade à adoção ou inseminação com espermatozoides de dador (13). Todavia, uma revisão sistemática levada a cabo por Fullerton *et al*, em 2009, revelou que a taxa de sucesso de extração cirúrgica de espermatozoides [por extração de espermatozoides testiculares (TESE) ou TESE com microdissecção] é, em média, de 44% (13). Assim, apesar da probabilidade de concepção espontânea ser praticamente nula, as técnicas de reprodução medicamente assistida podem proporcionar a estes pacientes a possibilidade de um filho biológico (13). Em todo o mundo, já nasceram mais de 60 crianças filhas de homens com Síndrome de Klinefelter [referenciado em (14)].

Todavia, há referência a um maior número de aneuploidias somáticas e sexuais nos espermatozoides destes indivíduos, mesmo nos casos de mosaicismo (15). Assim, discute-se a indicação do diagnóstico genético pré-implantação (DGPI) e/ou diagnóstico pré-natal (DPN), sempre que se obtêm embriões ou gestações a partir dos espermatozoides destes doentes (16).

Recentemente, Paduch *et al* demonstraram que era possível a criopreservação de esperma em dois rapazes com Síndrome de Klinefelter na puberdade precoce que ainda tinham um número adequado de espermatozoides no ejaculado. Estes achados suportam a hipótese de que a falência espermatogénica destes doentes ocorre no início da puberdade, e que pelo menos alguns indivíduos têm ciclos

completos de espermatogénese. Todavia, os autores recomendam que por enquanto a preservação de fertilidade nestes doentes seja reservada para os grandes centros académicos, pois ainda persistem muitas questões éticas, legais e logísticas, que se prendem com o facto de se submeter uma criança a um procedimento cirúrgico cujos benefícios ainda não estão comprovados (17).

Os elevados níveis de hormona folículo-estimulante (FSH) nos homens com Síndrome de Klinefelter estimulam a atividade da aromatase CYP19, o que aumenta a produção de estradiol (17). Níveis elevados de estradiol têm um efeito deletério nas divisões espermatogónicas, mas não está comprovado que o hiperestrogenismo seja causa direta da depleção de células germinativas nestes indivíduos [referenciado em (17)]. Paduch *et al* têm em curso no seu centro estudos prospetivos para avaliar a utilidade dos inibidores da aromatase no tratamento destes doentes; os resultados preliminares demonstram um efeito benéfico na preservação do volume testicular (17).

#### *Homens 47,XYY*

O cariótipo 47,XYY é uma aneuploidia dos cromossomas sexuais que ocorre por não disjunção paterna do cromossoma Y, sobretudo durante a meiose II, e está presente em 1/1000 dos recém-nascidos do sexo masculino (3). A maioria dos indivíduos com cariótipo XYY são fenotipicamente normais, embora mais altos do que a população geral. Todavia, podem apresentar comportamentos antissociais, diminuição do QI, aumento da incidência de leucemias e perturbações da espermatogénese (18). Assim, apesar da maioria ser fértil, verifica-se que a prevalência desta aneuploidia é superior nas populações de homens inférteis (19).

Gabriel Robez *et al* formularam a hipótese de que as células germinativas dos homens XYY férteis perdem um cromossoma Y antes de entrarem em meiose [referenciado em (20)]. Por outro lado, estudos meióticos realizados em homens XYY inférteis revelaram que a oligozoospermia severa se associa frequentemente à persistência do cromossoma Y nos espermatócitos em fase de paquíteno (21). Em concordância, Edgar Chan Wong *et al*, baseados nos seus estudos, sugeriram que a infertilidade nestes pacientes é dependente da constituição cromossómica das suas células germinativas (22).

A maioria dos estudos efetuados em espermatozoides de homens XYY revela um aumento moderado de aneuploidias sexuais (5). Todavia, não existe evidência de um risco aumentado de aneuploidias na descendência (5).

### **Anomalias Cromossômicas Estruturais**

As translocações recíprocas e robertsonianas, assim como as inversões paracêntricas e os cromossomas marcadores, são anomalias cromossômicas estruturais encontradas frequentemente em homens inférteis (8).

#### *Translocações Recíprocas*

As translocações recíprocas consistem na troca mútua de segmentos cromossômicos entre dois cromossomas (5). A. Ferlin *et al*, resumindo os resultados de estudos em homens inférteis oligo e azoospermicos, encontraram uma incidência de translocações recíprocas sete vezes mais elevada do que em séries de recém nascidos (5). Todavia, o espermograma dos indivíduos portadores de translocações recíprocas apresenta resultados muito variáveis, desde a normozoospermia à azoospermia, o que é provavelmente função dos cromossomas envolvidos na translocação e dos locais de quebra dentro dos mesmos (23).

Para que possam alinhar as suas regiões homólogas durante a sinapse, na primeira divisão meiótica, os cromossomas envolvidos em translocações recíprocas adotam uma estrutura quadrivalente (23). O sucesso ou a falência do processo meiótico está dependente das características deste quadrivalente, que determinam o seu comportamento meiótico (24).

Estudos meióticos realizados por Oliver-Bonet *et al* em homens inférteis portadores de rearranjos cromossômicos revelaram a ocorrência de vários graus de assinapse nas zonas aderentes aos pontos de quebra (24). Verificou-se também que, por vezes, estas zonas interagem com o *sexual body*, uma estrutura cromatínica sub-nuclear formada pelo bivalente sexual, visível apenas na fase de paquíteno (24). Gabriel-Robez *et al*, em 1986, já haviam sugerido que esta interação seria a causa da falência do processo espermatogénico destes pacientes [referenciado em (25)].

Por sua vez, M. Oliver-Bonet *et al* sugeriram que o bloqueio do processo meiótico é provocado pelas regiões de assinapse, quer através da ativação de *checkpoints* na fase de paquíteno, que eliminam as

células com anomalias de emparelhamento, quer pela sua associação ao *sexual body* (25). A associação ao *sexual body* permite que as regiões assinápticas não sejam detetadas pelo *checkpoint* da fase de paquíteno, pelo que as células prosseguem na meiose (24). Todavia, esta ligação será provavelmente detetada durante a metafase I, por um *checkpoint* que deteta anomalias no alinhamento dos bivalentes no fuso mitótico (24), (25). Deste modo, mesmo as células que sobrevivem ao primeiro *checkpoint*, através da associação ao *sexual body*, são eliminadas mais tarde (25).

M. Oliver-Bonet *et al* concluíram que a posição dos locais de quebra e a ocorrência ou não de recombinação nos cromossomas envolvidos no rearranjo são os fatores que mais influenciam a fertilidade dos portadores destes rearranjos, na medida em que são estes que determinam se os braços do quadrivalente se mantêm coesos, para que não se formem configurações abertas, com zonas assinápticas (24).

#### *Translocações Recíprocas Autosomas-Gonossomas*

As translocações que envolvem um autossoma e um gonossoma (translocações Y-autossoma ou X-autossoma) são mais propensas a causar infertilidade, pelo facto dos cromossomas resultantes interferirem com o normal emparelhamento dos gonossomas e dos autossomas, inibindo a segregação dos cromossomas homólogos [referenciado em (26)].

As *translocações Y-autossoma* têm uma incidência de cerca de 1/2000 na população geral [referenciado em (26)]. As mais comuns ocorrem entre a região heterocromática do braço longo do cromossoma Y e um autossoma acrocêntrico, e geralmente não afetam a fertilidade dos seus portadores [referenciado em (27)]. Por outro lado, as translocações entre a região eucromática do cromossoma Y e os autossomas não acrocêntricos, mais raras, estão frequentemente associadas a azoospermia [referenciado em (28)].

Durante a profase I da meiose masculina, os cromossomas sexuais emparelham, formando uma condensação denominada vesícula sexual (26). Além disso, sofrem uma série de alterações características neste estadió, que incluem heterocromatização da vesícula sexual, retardamento da replicação cromatínica e inatividade transcripcional [referenciado em (28)]. As alterações decorrentes das translocações Y-autossoma podem ser explicadas pela introdução de um segmento autossómico no compartimento da vesícula sexual. O “arrastamento” do segmento autossómico para a vesícula sexual

favorece a assinapse. Os segmentos desemparelhados adquirem uma aparência hipercondensada, semelhante à dos cromossomas sexuais, o que sugere a inativação autossômica por um efeito de propagação (29). F. Sun *et al* sugeriram que este silenciamento de genes autossômicos essenciais contribuía para a azoospermia observada num indivíduo portador de uma translocação (Y;1) (28). Além disso, os seus estudos refutaram também a hipótese da existência de vários checkpoints meióticos que detetam zonas assinápticas e anomalias na recombinação, determinando o bloqueio da meiose e degeneração das células germinativas [referenciado em (28)].

Ocasionalmente, algumas células germinativas escapam a este bloqueio e progridem até ao estadio de espermátide [referenciado em (30)]. Assim, apesar da maioria dos pacientes com este tipo de translocação ser infértil, a ICSI geralmente permite que concebam um filho biológico, mesmo na presença de anomalias severas do espermograma (30).

Embora sejam necessários mais estudos, os dados existentes sugerem uma elevada prevalência de espermatozoides cromossomicamente desequilibrados nos portadores inférteis de translocações Y-autossoma. Consequentemente, existe um risco potencialmente aumentado de transmissão de anomalias cromossômicas à descendência, pelo que se aconselha o DGPI ou DPN sempre que a fertilização é alcançada através de técnicas de micromanipulação (30).

As *translocações X-autossoma* são raramente reportadas em homens (31), ocorrendo geralmente *de novo* ou por transmissão materna [referenciado em (32)]. Os indivíduos do sexo masculino portadores deste rearranjo são em regra azoospérmicos, embora existam alguns relatos de oligozoospermia severa [referenciado em (33)].

As translocações X-autossoma causam bloqueio da meiose masculina, o que leva à azoospermia. Este bloqueio pode ser explicado por perturbações na inativação do cromossoma X durante a meiose masculina. Outros autores, por sua vez, sugeriram que a espermatogénese é bloqueada devido ao silenciamento transcripcional do segmento translocado para o cromossoma X, pela propagação da inativação [referenciado em (31)]. Em alguns casos, a espermatogénese prossegue até à formação de espermátides alongadas, mas este processo é muito pouco eficiente, pelo que só se formam algumas destas células (32).

Com o advento da ICSI, mesmo os indivíduos com oligozoospermia severa ou sem espermatozoides no ejaculado podem conceber um filho [referenciado em (32)]. S. Ma *et al* relataram o terceiro caso de paternidade em portadores de translocações X-autossoma, num indivíduo portador de uma translocação (X;20). A fertilização foi alcançada através de ICSI, tendo nascido uma menina que herdou a translocação (32).

O risco de transmissão de aneuploidias à descendência parece ter uma distribuição similar ao que acontece nas translocações autossoma-autossoma, ou seja, dependerá do autossoma envolvido, da dimensão do segmento translocado, da configuração adotada na fase de paquíteno e do tipo de segregação [referenciado em (32)].

#### *Translocações Robertsonianas*

As translocações robertsonianas constituem a anomalia cromossômica estrutural mais frequente na espécie humana (5). Caracterizam-se pela fusão dos braços longos de dois cromossomas acrocêntricos (19). Os braços curtos, que também se fundem, são geralmente perdidos (19), o que resulta num cariótipo com 45 cromossomas (34). As combinações mais frequentes ocorrem entre os cromossomas 13 e 14 (5).

A quantidade de espermatozoides no ejaculado destes pacientes varia de normal a azoospermia (9).

Os portadores de translocações Robertsonianas podem apresentar anomalias não só na concentração, morfologia e motilidade do espermatozoide, como também na sua constituição cromossômica (29).

Os cromossomas envolvidos no rearranjo organizam-se numa estrutura trivalente (30). Assim, os gametas resultantes podem ter um cariótipo normal, ou cromossomicamente equilibrado, mas também podem apresentar um braço longo extra ou em déficit, em relação aos cromossomas envolvidos na translocação (29).

E. Anton *et al* analisaram o ejaculado de sete pacientes inférteis portadores de t(13;14), tendo verificado que a maioria dos espermatozoides apresentava produtos de segregação alterna, o que permitia percentagens de gametas cromossomicamente equilibrados superiores a 80% (35). Por sua vez, B Baccetti *et al* encontraram uma elevada frequência de imaturidade, apoptose e necrose nos espermatozoides de portadores inférteis de translocações Robertsonianas (34). Estes achados suportam a hipótese da existência de um processo seletivo que elimina as células germinativas não equilibradas

(36). Eaker *et al*, através de estudos realizados em ratos portadores de translocações cromossômicas, sugeriram a existência de um *checkpoint* meiótico que elimina as células germinativas com alterações cromossômicas (37). Este *checkpoint* seria ativado pela presença de anomalias no alinhamento cromossômico, durante a metafase I (37). Todavia, este processo não é totalmente eficiente, o que faz com que estes indivíduos apresentem percentagens de gâmetas aneuploides superiores às da população geral, o que reduz a sua capacidade reprodutiva (37).

Assim, tendo em conta as alterações morfológicas e genéticas presentes nos espermatozoides dos portadores inférteis de translocações Robertsonianas, B Baccetti *et al* consideram aconselhável uma análise ultraestrutural e cromossômica detalhada do espermatozoides destes pacientes, sempre que se recorre à ICSI (34).

#### *Efeito Intercromossômico*

W. Vegetti *et al*, num estudo que englobou 32 pacientes inférteis e 13 controlos com espermogramas dentro dos parâmetros considerados normais, encontraram uma frequência aumentada de espermatozoides diploides e aneuploidias para os cromossomas 13, 18, 21, X e Y nos portadores de translocações cromossômicas (recíprocas e Robertsonianas), em relação aos controlos (38). Estes achados suportam a hipótese da existência de um efeito intercromossômico, ou seja, um distúrbio do emparelhamento e segregação de cromossomas não envolvidos nos rearranjos estruturais. Este efeito foi descrito pela primeira vez em 1963, por Lejeune, que verificou uma prevalência aumentada de translocações recíprocas equilibradas nos pais de crianças com Trissomia 21 [referenciado em (39)]. Por este motivo, os autores sugerem a necessidade de aconselhamento genético a todos os casais em que o indivíduo do sexo masculino é portador de um rearranjo cromossômico (38).

#### *Inversões*

As inversões ocorrem quando um segmento cromossômico, resultante da ocorrência de dois pontos de quebra dentro do mesmo cromossoma, é reparado em posição inversa. Não há perda de material genético, mas o emparelhamento dos cromossomas homólogos durante a meiose é afetado (19).

### *Inversões Pericêntricas*

Quando os dois pontos de quebra se situam em lados opostos do centrômero, forma-se uma inversão pericêntrica (40). Trata-se de um rearranjo comum, com uma incidência de 0,012% nos recém-nascidos (41).

A maioria dos portadores de inversões pericêntricas tem um fenótipo normal, e geralmente não tem problemas de fertilidade (40). Todavia, as inversões pericêntricas são 13 vezes mais frequentes nos homens inférteis [referenciado em (41)].

A infertilidade ocorre quando estes rearranjos perturbam a espermatogênese, levando à formação de gametas cromossomicamente desequilibrados (40). Durante a meiose, o emparelhamento do cromossoma homólogo e do cromossoma que contém a inversão ocorre através da formação de uma ansa de inversão. Se ocorrer um número ímpar de recombinações genéticas dentro da ansa, forma-se um gameta que contém o cromossoma normal, um gameta que contém o cromossoma invertido, e dois gametas estruturalmente desequilibrados, ambos com deleções e duplicações que incluem as regiões distais à inversão (duplicação q/deleção p e deleção q/duplicação p, respectivamente) (41).

### *Inversões Paracêntricas*

Quando ambos os pontos de quebra se situam no mesmo braço do cromossoma, estamos perante uma inversão paracêntrica (19). Estima-se que a sua incidência seja entre 0,09-0,49/1000 [referenciado em (42)].

Neste caso, se ocorrer um número ímpar de fenómenos de *crossing-over* dentro da ansa de inversão, metade dos gametas serão normais, um quarto serão acêntricos e um quarto serão dicêntricos (19). Os cromossomas acêntricos são geralmente perdidos em divisões celulares subsequentes, enquanto os dicêntricos tendem a quebrar, pois são atraídos para pólos opostos da célula. Logo, os gametas destes indivíduos podem apresentar várias duplicações ou deficiências (42).

Apenas dois indivíduos portadores deste rearranjo foram estudados através da cariotipagem dos espermatozoides [referenciado em (19)]. Nenhum dos sujeitos apresentava cromossomas recombinantes nos espermatozoides, o que pode ser explicado pela não formação da ansa de inversão, ou pela inibição do *crossing-over* dentro da ansa (19).

Apesar de alguns investigadores terem sugerido que as inversões paracêntricas no homem são geralmente inofensivas [referenciado em (42)], a frequência de abortamentos espontâneos pode estar aumentada nestes indivíduos [referenciado em (42)], afetando assim a sua fertilidade.

Apenas as inversões com comprimento superior a 100Mbp cursam com aumento significativo do número de gâmetas recombinantes, pelo que o risco genético dos portadores de inversões (peri ou paracêntricas) parece ser proporcional ao tamanho do segmento invertido. Assim, o DGPI poderá ser dispensável nos indivíduos com inversões inferiores a 100Mbp, mas são necessários mais estudos para confirmar esta hipótese (43).

#### *Pequenos Cromossomas Marcadores Supranumerários*

Os pequenos cromossomas marcadores supranumerários consistem em fragmentos cromossômicos cêntricos adicionais, demasiado pequenos para serem identificados ou caracterizados com clareza unicamente pelo bandeamento citogenético (são em geral da mesma dimensão ou menores que um cromossoma 20) (44). Cerca de 39% dos casos são herdados geneticamente, enquanto os restantes 61% ocorrem *de novo* (44).

A prevalência de cromossomas marcadores em grupos de indivíduos inférteis ronda os 0,125%, superior aos 0,044% encontrados na população geral (45). Os pequenos cromossomas marcadores supranumerários são preferencialmente herdados por via materna (45), o que também poderá sugerir que os homens portadores desta aneuploidia são subférteis, ou então que o cromossoma marcador é excluído durante a espermatogénese (46).

Desconhece-se ainda a razão pela qual a presença de pequenos cromossomas marcadores supranumerários afeta a fertilidade masculina. Na maioria dos casos, não existe nenhuma alteração específica no espermograma destes doentes, pelo que os diagnósticos mais frequentes são “infertilidade idiopática/problemas de fertilidade”, ou “parceira com abortamentos de repetição”, o que também dificulta a correlação entre os cromossomas marcadores e infertilidade (45).

Um estudo efetuado em dois homens com esta anomalia demonstrou uma frequência aumentada de aneuploidias nos espermatozoides [referenciado em (46)], o que poderá ser consequência do emparelhamento do cromossoma marcador com outro/s cromossoma/s de dimensões semelhantes, afetando a disjunção cromossômica (46).

## **Reprodução medicamente assistida**

Sempre que o cariótipo de um dos membros do casal revela uma anomalia autossômica, todos os casais que recorrerem à reprodução medicamente assistida (RMA) devem beneficiar de aconselhamento genético (16). O aconselhamento tem como objetivo fornecer informação objetiva ao casal, para que este tome uma decisão informada que reflita os seus valores, não os do seu conselheiro (2).

A ICSI é a abordagem mais eficaz nos casos de infertilidade masculina (47). Esta técnica, praticada desde 1992 (2), consiste na fertilização do oócito através da microinjeção de um único espermatozoide, possibilitando que homens com alterações espermáticas severas tenham filhos biológicos (47).

Todavia, a ICSI ultrapassa várias barreiras existentes no processo de fertilização natural, pelo que surgiram dúvidas acerca da possibilidade do aumento da transmissão de anomalias genéticas à descendência, incluindo perturbações da espermatogénese (48), (47). No entanto, dados obtidos a partir da avaliação de centenas de crianças a nível mundial e a Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia atestam que a incidência das anomalias congénitas mais comuns não é superior nas crianças fruto da ICSI, à exceção da hipospádias [referenciado em (48)]. Contudo, persistem ainda algumas reservas, que se prendem, por exemplo, com as alterações que carecem de uma avaliação a longo prazo, como os défices cognitivos (48). Assim, o efeito da ICSI no risco de malformações congénitas deve continuar a ser monitorizado (2).

O DGPI consiste, na maioria dos casos, na análise de uma ou duas células do embrião, ao terceiro dia do desenvolvimento. Esta técnica foi desenvolvida em 1989, com o intuito de evitar a transferência de embriões afetados, nos casos em que os progenitores tinham alterações genéticas significativas, como as anomalias cromossômicas. O DGPI permite que os embriões sejam selecionados antes do início da gravidez, evitando-se assim a necessidade de recorrer ao abortamento seletivo [referenciado em (2)]. Todavia, o recurso ao DGPI para excluir os embriões com anomalias genéticas significa uma redução cumulativa das probabilidades de conceção, pela diminuição do número de embriões disponíveis para transferência (49).

Em Portugal, segundo o Artigo 6º da Lei nº32/2006 de 26 de julho, que regula as técnicas de procriação medicamente assistida, poderão ser beneficiários destas técnicas “só as pessoas casadas que não se encontrem separadas judicialmente de pessoas e bens ou separadas de facto ou as que, sendo de sexo diferente, vivam em condições análogas às dos cônjuges há pelo menos dois anos”. Além disso, as mesmas “só podem ser utilizadas em benefício de quem tenha, pelo menos, 18 anos de idade e não se encontre interdito ou inabilitado por anomalia psíquica”.

### **Espermatogénese *in vitro* – perspectivas futuras**

Atualmente, a ICSI constitui o tratamento mais eficaz para a infertilidade masculina severa. Todavia, esta técnica carece da presença de espermatozoides totalmente desenvolvidos, pelo que não pode ser aplicada em homens afetados por bloqueios da maturação ou aplasia das células germinativas (50).

Assim, a reprodução de todo o ciclo espermatogénico *in vitro* poderá vir a ser útil no tratamento da infertilidade masculina (51).

Os gâmetas masculinos originam-se a partir de uma pequena população de espermatogónias estaminais que se localizam na periferia dos túbulos seminíferos, rodeadas pelas células de Sertoli (52), (53). Tal como qualquer célula estaminal, as espermatogónias estaminais têm a capacidade de se autorrenovarem, para manter a população de células estaminais, ou de se diferenciarem, para dar origem a células germinativas (53). Assim, o desenvolvimento de técnicas que permitam a cultura e imortalização de espermatogónias estaminais *in vitro* permitirá a produção de colónias que, após transplantação intratesticular, poderão ser capazes de repopular o epitélio germinativo dos homens azoospermicos com bloqueio da maturação das células germinativas (50).

M. Sousa *et al*, num estudo que avaliou o potencial de desenvolvimento de células espermatogénicas humanas cocultivadas com células de Sertoli, sugerem que a meiose e a espermatogénese podem ser retomadas *in vitro*, com a formação de espermatídeos com baixo potencial de fertilização mas taxas regulares de formação do blastocisto. Todavia, a maioria dos embriões formados não atingiu o estadió de mórula, e apresentava anomalias cromossómicas major. Segundo I. Georgiou *et al*, as anomalias verificadas nos embriões que resultaram deste estudo podem dever-se a deficiências do processo meiótico masculino *in vitro* ou à imaturidade do DNA dos espermatídeos gerados *in vitro* (54). Alguns

estudos sugerem uma progressão muito rápida da meiose e espermiogénese durante a cultura *in vitro* de espermátocitos primários [referenciado em (54)]. Assim, é possível que a ação de múltiplos mecanismos de *checkpoint* responsáveis pelo controlo das transformações morfogénicas e moleculares durante a espermatogénese *in vivo* não possa ocorrer durante a espermatogénese *in vitro* (54). Este distúrbio poderá resultar num maior número de gâmetas com anomalias do processo meiótico e/ou espermiogénese, quando o processo espermatogénico decorre *in vitro* (55), (51), (54). Além disso, a aceleração dos processos de maturação citoplasmática e nuclear que ocorre em gâmetas cultivados *in vitro* poderá causar distúrbios epigenéticos, resultando em anomalias da expressão génica, alterações fenotípicas e defeitos na capacidade do gâmeta em fertilizar o oócito e induzir o desenvolvimento embrionário normal (54).

Segundo I. Georgiou *et al*, a indução da meiose e espermiogénese num sistema de cultura *in vitro* constitui uma alternativa terapêutica interessante para homens positivos para espermatogónias/espermátocitos mas negativos para células haploides nos testículos (como acontece nos indivíduos com bloqueios da espermatogénese). Contudo, a aplicação deste tratamento poderá acarretar aumento do risco de transmissão de anomalias cromossómicas ou génicas à descendência (54).

Uma abordagem alternativa poderá envolver o desenvolvimento de gâmetas masculinos através da diferenciação de células estaminais embrionárias (56). Este mecanismo permitiria o tratamento de indivíduos com aplasia das células germinativas, uma condição que se caracteriza pela ausência de células germinativas nos testículos. O Síndrome de Klinefelter e os tratamentos antineoplásicos com quimioterapia ou radioterapia são duas condições que evoluem frequentemente com aplasia das células germinativas (50).

Estudos recentes demonstraram que as células estaminais embrionárias podem diferenciar-se em células germinativas, e mesmo em estádios pós-meióticos [referenciado em (56)]. Nayernia *et al* demonstraram (em ratos) que gâmetas masculinos produzidos *in vitro* através de células estaminais são funcionais e capazes de originar descendência viável. No entanto, os descendentes revelaram-se ora menores ora maiores do que os controlos, e morreram prematuramente (5 dias a 5 meses após o nascimento). Os autores sugerem que estas alterações fenotípicas encontradas na descendência se

devem a anomalias nos padrões de metilação dos gâmetas formados a partir de células estaminais. Assim, concluem que a diferenciação de gâmetas a partir de células estaminais poderá interferir com mecanismos epigenéticos essenciais na gametogénese (52).

As espermatogónias estaminais e a sua subsequente cultura *in vitro* serão, segundo Q. V. Neri *et al*, o futuro da medicina reprodutiva, constituindo uma oportunidade para muitos homens atualmente estéries (50).

## **Conclusão**

A infertilidade, assim como o risco reprodutivo genético, tem vindo a aumentar. As alterações do estilo de vida, assim como os fatores ambientais a que estamos expostos nas sociedades atuais detêm provavelmente um papel importante neste fenómeno (57).

Cerca de 15 a 20% dos homens ocidentais têm problemas de fertilidade. As aneuploidias dos cromossomas sexuais e as translocações são as anomalias cromossómicas mais comumente associadas com oligozoospermia ou azoospermia severa (2).

Desde o nascimento do primeiro bebé concebido através da FIV, em 1978, já nasceram cerca de um milhão de crianças em todo o mundo fruto das técnicas de RMA (2). Ainda assim, estas constituem um campo em constante desenvolvimento, em que muitas vezes as tecnologias são introduzidas sem que se conheça a fundo os seus riscos a longo prazo (57). A avaliação genética global dos casais que recorrem à RMA, assim como a colaboração entre especialistas de fertilidade e geneticistas, são medidas essenciais para minorar os riscos genéticos associados à aplicação das técnicas de RMA (48).

Com os avanços extraordinários que se alcançaram no campo da infertilidade masculina nas últimas décadas (14), estão reunidas as condições para uma melhor compreensão da patologia reprodutiva masculina, o que permitirá o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a infertilidade masculina (58).

## Referências bibliográficas

1. Strategy to accelerate progress towards the attainment of international development goals and targets related to reproductive health. *Reprod Health Matters* 2005;13:11-8.
2. Soini S, Ibarreta D, Anastasiadou V, et al. The interface between assisted reproductive technologies and genetics: technical, social, ethical and legal issues. *Eur J Hum Genet* 2006;14:588-645.
3. Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction* 2003;126:13-25.
4. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J* 2009;50:336-47.
5. Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol* 2006;22:133-41.
6. Clementini E, Palka C, Iezzi I, Stuppia L, Guanciali-Franchi P, Tiboni GM. Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2005;20:437-42.
7. Hargreave TB. Genetic basis of male fertility. *Br Med Bull* 2000;56:650-71.
8. Huynh T, Mollard R, Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Update* 2002;8:183-98.
9. Maduro MR, Lo KC, Chuang WW, Lamb DJ. Genes and male infertility: what can go wrong? *J Androl* 2003;24:485-93.
10. Visootsak J, Graham JM, Jr. Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. *Orphanet J Rare Dis* 2006;1:42.
11. Denschlag D, Tempfer C, Kunze M, Wolff G, Keck C. Assisted reproductive techniques in patients with Klinefelter syndrome: a critical review. *Fertil Steril* 2004;82:775-9.
12. Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. Klinefelter's syndrome. *Lancet* 2004;364:273-83.

13. Fullerton G, Hamilton M, Maheshwari A. Should non-mosaic Klinefelter syndrome men be labelled as infertile in 2009? *Hum Reprod* 2010;25:588-97.
14. Esteves SC, Agarwal A. Novel concepts in male infertility. *Int Braz J Urol* 2011;37:5-15.
15. Rives N, Joly G, Machy A, Simeon N, Leclerc P, Mace B. Assessment of sex chromosome aneuploidy in sperm nuclei from 47,XXY and 46,XY/47,XXY males: comparison with fertile and infertile males with normal karyotype. *Mol Hum Reprod* 2000;6:107-12.
16. Weidner W, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Pomerol JM, Ghosh C. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol* 2002;42:313-22.
17. Paduch DA, Bolyakov A, Cohen P, Travis A. Reproduction in men with Klinefelter syndrome: the past, the present, and the future. *Semin Reprod Med* 2009;27:137-48.
18. Maduro MR, Lamb DJ. Understanding new genetics of male infertility. *J Urol* 2002;168:2197-205.
19. Martin RH. Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update* 2008;14:379-90.
20. Milazzo JP, Rives N, Mousset-Simeon N, Mace B. Chromosome constitution and apoptosis of immature germ cells present in sperm of two 47,XYY infertile males. *Hum Reprod* 2006;21:1749-58.
21. Solari AJ, Rey Valzacchi G. The prevalence of a YY synaptonemal complex over XY synapsis in an XYY man with exclusive XYY spermatocytes. *Chromosome Res* 1997;5:467-74.
22. Wong EC, Ferguson KA, Chow V, Ma S. Sperm aneuploidy and meiotic sex chromosome configurations in an infertile XYY male. *Hum Reprod* 2008;23:374-8.
23. Ferguson KA, Chow V, Ma S. Silencing of unpaired meiotic chromosomes and altered recombination patterns in an azoospermic carrier of a t(8;13) reciprocal translocation. *Hum Reprod* 2008;23:988-95.
24. Oliver-Bonet M, Ko E, Martin RH. Male infertility in reciprocal translocation carriers: the sex body affair. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:343-6.
25. Oliver-Bonet M, Benet J, Sun F, et al. Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Hum Reprod* 2005;20:683-8.

26. Pinho MJ, Neves R, Costa P, et al. Unique t(Y;1)(q12;q12) reciprocal translocation with loss of the heterochromatic region of chromosome 1 in a male with azoospermia due to meiotic arrest: a case report. *Hum Reprod* 2005;20:689-96.
27. Alves C, Carvalho F, Cremades N, Sousa M, Barros A. Unique (Y;13) translocation in a male with oligozoospermia: cytogenetic and molecular studies. *Eur J Hum Genet* 2002;10:467-74.
28. Sun F, Oliver-Bonet M, Turek PJ, Ko E, Martin RH. Meiotic studies in an azoospermic human translocation (Y;1) carrier. *Mol Hum Reprod* 2005;11:361-4.
29. Delobel B, Djilati R, Gabriel-Robez O, et al. Y-autosome translocation and infertility: usefulness of molecular, cytogenetic and meiotic studies. *Hum Genet* 1998;102:98-102.
30. Buonadonna AL, Cariola F, Caroppo E, et al. Molecular and cytogenetic characterization of an azoospermic male with a de-novo Y;14 translocation and alternate centromere inactivation. *Hum Reprod* 2002;17:564-9.
31. Karaer K, Ergun MA, Weise A, et al. The case of an infertile male with an uncommon reciprocal X-autosomal translocation: how does this affect male fertility? *Genet Couns* 2010;21:397-404.
32. Ma S, Yuen BH, Penaherrera M, Koehn D, Ness L, Robinson W. ICSI and the transmission of X-autosomal translocation: a three-generation evaluation of X;20 translocation: case report. *Hum Reprod* 2003;18:1377-82.
33. Ishikawa T, Kondo Y, Yamaguchi K, et al. An unusual reciprocal X-autosome translocation in an infertile azoospermic man. *Fertil Steril* 2007;88:705 e15-7.
34. Baccetti B, Collodel G, Marzella R, et al. Ultrastructural studies of spermatozoa from infertile males with Robertsonian translocations and 18, X, Y aneuploidies. *Hum Reprod* 2005;20:2295-300.
35. Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod* 2004;19:1345-51.
36. Brugnon F, Janny L, Communal Y, et al. Apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm from Robertsonian translocation carrier patients. *Hum Reprod* 2010;25:1631-42.
37. Eaker S, Pyle A, Cobb J, Handel MA. Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci* 2001;114:2953-65.

38. Vegetti W, Van Assche E, Frias A, et al. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 2000;15:351-65.
39. Vozdova M, Oracova E, Horinova V, Rubes J. Sperm fluorescence in situ hybridization study of meiotic segregation and an interchromosomal effect in carriers of t(11;18). *Hum Reprod* 2008;23:581-8.
40. Chantot-Bastaraud S, Ravel C, Berthaut I, et al. Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Mol Hum Reprod* 2007;13:55-9.
41. Morel F, Laudier B, Guerif F, et al. Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2007;22:136-41.
42. Martin RH. Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a paracentric inversion of chromosome 14 (q24.1q32.1). *Am J Hum Genet* 1999;64:1480-4.
43. Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J. Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil Steril* 2006;85:661-6.
44. Liehr T, Claussen U, Starke H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res* 2004;107:55-67.
45. Manvelyan M, Riegel M, Santos M, et al. Thirty-two new cases with small supernumerary marker chromosomes detected in connection with fertility problems: detailed molecular cytogenetic characterization and review of the literature. *Int J Mol Med* 2008;21:705-14.
46. Wang W, Hu Y, Zhu H, Li J, Zhu R, Wang YP. A case of an infertile male with a small supernumerary marker chromosome negative for M-FISH and containing only heterochromatin. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:291-5.
47. Tang SS, Gao H, Robinson WP, Ho Yuen B, Ma S. An association between sex chromosomal aneuploidy in sperm and an abortus with 45,X of paternal origin: possible transmission of chromosomal abnormalities through ICSI. *Hum Reprod* 2004;19:147-51.
48. Georgiou I, Syrrou M, Pardalidis N, et al. Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian J Androl* 2006;8:643-73.

49. Heng BC. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) should be judiciously indicated for male-factor subfertility and ICSI patients. *J Androl* 2006;27:708-9.
50. Neri QV, Takeuchi T, Rosenwaks Z, Palermo GD. Treatment options for impaired spermatogenesis: germ cell transplantation and stem-cell based therapy. *Minerva Ginecol* 2009;61:253-9.
51. Sousa M, Cremades N, Alves C, Silva J, Barros A. Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli cells. *Hum Reprod* 2002;17:161-72.
52. Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, et al. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell* 2006;11:125-32.
53. Goossens E, Tournaye H. Is there a clinical future for spermatogonial stem cells? *Curr Stem Cell Res Ther* 2007;2:189-95.
54. Georgiou I, Pardalidis N, Giannakis D, et al. In vitro spermatogenesis as a method to bypass pre-meiotic or post-meiotic barriers blocking the spermatogenetic process: genetic and epigenetic implications in assisted reproductive technology. *Andrologia* 2007;39:159-76.
55. Cremades N, Sousa M, Bernabeu R, Barros A. Developmental potential of elongating and elongated spermatids obtained after in-vitro maturation of isolated round spermatids. *Hum Reprod* 2001;16:1938-44.
56. Maggiulli R, Neri QV, Monahan D, et al. What to do when ICSI fails. *Syst Biol Reprod Med* 2010;56:376-87.
57. The need for interaction between assisted reproduction technology and genetics. Recommendations of the European Societies of Human Genetics and Human Reproduction and Embryology. *Eur J Hum Genet* 2006;14:509-11.
58. Cram DS, O'Bryan MK, de Kretser DM. Male infertility genetics--the future. *J Androl* 2001;22:738-46.

# Anexo

# Instruções aos Autores

Estas instruções seguem os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (disponível em URL: [www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

**Os ARQUIVOS DE MEDICINA publicam investigação original nas diferentes áreas da medicina, favorecendo investigação de qualidade, particularmente a que descreva a realidade nacional.**

Os manuscritos são avaliados inicialmente por membros do corpo editorial e a publicação daqueles que forem considerados adequados fica dependente do parecer técnico de pelo menos dois revisores externos. A revisão é feita anonimamente, podendo os revisores propor, por escrito, alterações de conteúdo ou de forma ao(s) autor(es), condicionando a publicação do artigo à sua efectivação.

Todos os artigos solicitados serão submetidos a avaliação externa e seguirão o mesmo processo editorial dos artigos de investigação original.

Apesar dos editores e dos revisores desenvolverem os esforços necessários para assegurar a qualidade técnica e científica dos manuscritos publicados, a responsabilidade final do conteúdo das publicações é dos autores.

Todos os artigos publicados passam a ser propriedade dos ARQUIVOS DE MEDICINA. Uma vez aceites, os manuscritos não podem ser publicados numa forma semelhante noutros locais, em nenhuma língua, sem o consentimento dos ARQUIVOS DE MEDICINA.

Apenas serão avaliados manuscritos contendo material original que não estejam ainda publicados, na íntegra ou em parte (incluindo tabelas e figuras), e que não estejam a ser submetidos para publicação noutros locais. Esta restrição não se aplica a notas de imprensa ou a resumos publicados no âmbito de reuniões científicas. Quando existem publicações semelhantes à que é submetida ou quando existirem dúvidas relativamente ao cumprimento dos critérios acima mencionados estas devem ser anexadas ao manuscrito em submissão.

Antes de submeter um manuscrito aos ARQUIVOS DE MEDICINA os autores têm que assegurar todas as autorizações necessárias para a publicação do material submetido.

De acordo com uma avaliação efectuada sobre o material apresentado à revista os editores dos ARQUIVOS DE MEDICINA prevêm publicar aproximadamente 30% dos manuscritos submetidos, sendo que cerca de 25% serão provavelmente rejeitados pelos editores no primeiro mês após a recepção sem avaliação externa.

## TIPOLOGIA DOS ARTIGOS PUBLICADOS NOS ARQUIVOS DE MEDICINA

### Artigos de investigação original

Resultados de investigação original, qualitativa ou quantitativa.

O texto deve ser limitado a 2000 palavras, excluindo referências e tabelas, e organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 4 tabelas e/ou figuras (total) e até 15 referências.

Todos os artigos de investigação original devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

### Publicações breves

Resultados preliminares ou achados novos podem ser objecto de publicações breves.

O texto deve ser limitado a 1000 palavras, excluindo referências e tabelas, e organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

As publicações breves devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

### Artigos de revisão

Artigos de revisão sobre temas das diferentes áreas da medicina e dirigidos aos profissionais de saúde, particularmente com impacto na sua prática.

Os ARQUIVOS DE MEDICINA publicam essencialmente artigos de revisão solicitados pelos editores. Contudo, também serão avaliados artigos de revisão submetidos sem solicitação prévia, preferencialmente revisões quantitativas (Meta-análise).

O texto deve ser limitado a 5000 palavras, excluindo referências e tabelas, e apresentar um máximo de 5 tabelas e/ou figuras (total). As revisões quantitativas devem ser organizadas em introdução, métodos, resultados e discussão.

As revisões devem apresentar resumos não estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada, devendo ser estruturados no caso das revisões quantitativas.

### Comentários

Comentários, ensaios, análises críticas ou declarações de posição acerca de tópicos de interesse na área da saúde, designadamente políticas de saúde e educação médica.

O texto deve ser limitado a 900 palavras, excluindo referências e tabelas, e incluir no máximo uma tabela ou figura e até 5 referências.

Os comentários não devem apresentar resumos.

### Casos clínicos

Os ARQUIVOS DE MEDICINA transcrevem casos publicamente apresentados trimestralmente pelos médicos do Hospital de S. João numa selecção acordada com o corpo editorial da revista. No entanto é bem vinda a descrição de casos clínicos verdadeiramente exemplares, profundamente estudados e discutidos. O texto deve ser limitado a 1200 palavras, excluindo referências e tabelas, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

Os casos clínicos devem apresentar resumos não estruturados em português e em inglês, com um máximo de 120 palavras cada.

### Séries de casos

Descrições de séries de casos, tanto numa perspectiva de tratamento estatístico como de reflexão sobre uma experiência particular de diagnóstico, tratamento ou prognóstico.

O texto deve ser limitado a 1200 palavras, excluindo referências e tabelas, organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

As séries de casos devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

### Cartas ao editor

Comentários sucintos a artigos publicados nos ARQUIVOS DE MEDICINA ou relatando de forma muito objectiva os resultados de observação clínica ou investigação original que não justifiquem um tratamento mais elaborado.

O texto deve ser limitado a 400 palavras, excluindo referências e tabelas, e incluir no máximo uma tabela ou figura e até 5 referências.

As cartas ao editor não devem apresentar resumos.

### Revisões de livros ou software

Revisões críticas de livros, software ou sítios da internet.

O texto deve ser limitado a 600 palavras, sem tabelas nem figuras, com um máximo de 3 referências, incluindo a do objecto da revisão.

As revisões de livros ou software não devem apresentar resumos.

## FORMATAÇÃO DOS MANUSCRITOS

A formatação dos artigos submetidos para publicação nos ARQUIVOS DE MEDICINA deve seguir os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals".

Todo o manuscrito, incluindo referências, tabelas e legendas de figuras, deve ser redigido a dois espaços, com letra a 11 pontos, e justificado à esquerda.

Aconselha-se a utilização das letras Times, Times New Roman, Courier, Helvetica, Arial, e Symbol para caracteres especiais.

Devem ser numeradas todas as páginas, incluindo a página do título.

Devem ser apresentadas margens com 2,5 cm em todo o manuscrito. Devem ser inseridas quebras de página entre cada secção.

Não devem ser inseridos cabeçalhos nem rodapés.

Deve ser evitada a utilização não técnica de termos estatísticos como aleatório, normal, significativo, correlação e amostra.

Apenas será efectuada a reprodução de citações, tabelas ou ilustrações de fontes sujeitas a direitos de autor com citação completa da fonte e com autorizações do detentor dos direitos de autor.

#### Unidades de medida

Devem ser utilizadas as unidades de medida do Sistema Internacional (SI), mas os editores podem solicitar a apresentação de outras unidades não pertencentes ao SI.

#### Abreviaturas

Devem ser evitados acrónimos e abreviaturas, especialmente no título e nos resumos. Quando for necessária a sua utilização devem ser definidos na primeira vez que são mencionados no texto e também nos resumos e em cada tabela e figura, excepto no caso das unidades de medida.

#### Nomes de medicamentos

Deve ser utilizada a Designação Comum Internacional (DCI) de fármacos em vez de nomes comerciais de medicamentos. Quando forem utilizadas marcas registadas na investigação, pode ser mencionado o nome do medicamento e o nome do laboratório entre parêntesis.

#### Página do título

Na primeira página do manuscrito deve constar:

- 1) o título (conciso e descritivo);
- 2) um título abreviado (com um máximo de 40 caracteres, incluindo espaços);
- 3) os nomes dos autores, incluindo o primeiro nome (não incluir graus académicos ou títulos honoríficos);
- 4) a filiação institucional de cada autor no momento em que o trabalho foi realizado;
- 5) o nome e contactos do autor que deverá receber a correspondência, incluindo endereço, telefone, fax e e-mail;
- 6) os agradecimentos, incluindo fontes de financiamento, bolsas de estudo e colaboradores que não cumpram critérios para autoria;
- 7) contagens de palavras separadamente para cada um dos resumos e para o texto principal (não incluindo referências, tabelas ou figuras).

#### Autoria

Como referido nos "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", a autoria requer uma contribuição substancial para:

- 1) concepção e desenho do estudo, ou obtenção dos dados, ou análise e interpretação dos dados;
- 2) redacção do manuscrito ou revisão crítica do seu conteúdo intelectual;
- 3) aprovação final da versão submetida para publicação.

A obtenção de financiamento, a recolha de dados ou a supervisão geral do grupo de trabalho, por si só, não justificam autoria.

É necessário especificar na carta de apresentação o contributo de cada autor para o trabalho. Esta informação será publicada.

Exemplo: José Silva concebeu o estudo e supervisionou todos os aspectos da sua implementação. António Silva colaborou na concepção do estudo e efectuou a análise dos dados. Manuel Silva efectuou a recolha de dados e colaborou na sua análise. Todos os autores contribuíram para a interpretação dos resultados e revisão dos rascunhos do manuscrito.

Nos manuscritos assinados por mais de 6 autores (3 autores no caso das cartas ao editor), tem que ser explicitada a razão de uma autoria tão alargada.

É necessária a aprovação de todos os autores, por escrito, de quaisquer modificações da autoria do artigo após a sua submissão.

#### Agradecimentos

Devem ser mencionados na secção de agradecimentos os colaboradores que contribuíram substancialmente para o trabalho mas que não cumpram os critérios para autoria, especificando o seu contributo, bem como as fontes de financiamento, incluindo bolsas de estudo.

#### Resumos

Os resumos de artigos de investigação original, publicações breves, revisões quantitativas e séries de casos devem ser estruturados (introdução, métodos, resultados e conclusões) e apresentar conteúdo semelhante ao do manuscrito.

Os resumos de manuscritos não estruturados (revisões não quantitativas e casos clínicos) também não devem ser estruturados.

Nos resumos não devem ser utilizadas referências e as abreviaturas devem ser limitadas ao mínimo.

#### Palavras-chave

Devem ser indicadas até seis palavras-chave, em português e em inglês, nas páginas dos resumos, preferencialmente em concordância com o Medical Subject Headings (MeSH) utilizado no Index Medicus. Nos manuscritos que não apresentam resumos as palavras-chave devem ser apresentadas no final do manuscrito.

#### Introdução

Deve mencionar os objectivos do trabalho e a justificação para a sua realização.

Nesta secção apenas devem ser efectuadas as referências indispensáveis para justificar os objectivos do estudo.

#### Métodos

Nesta secção devem descrever-se:

- 1) a amostra em estudo;
- 2) a localização do estudo no tempo e no espaço;
- 3) os métodos de recolha de dados;
- 4) análise dos dados.

As considerações éticas devem ser efectuadas no final desta secção.

#### Análise dos dados

Os métodos estatísticos devem ser descritos com o detalhe suficiente para que possa ser possível reproduzir os resultados apresentados.

Sempre que possível deve ser quantificada a imprecisão das estimativas apresentadas, designadamente através da apresentação de intervalos de confiança. Deve evitar-se uma utilização excessiva de testes de hipóteses, com o uso de valores de p, que não fornecem informação quantitativa importante.

Deve ser mencionado o software utilizado na análise dos dados.

#### Considerações éticas e consentimento informado

Os autores devem assegurar que todas as investigações envolvendo seres humanos foram aprovadas por comissões de ética das instituições em que a investigação tenha sido desenvolvida, de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial ([www.wma.net](http://www.wma.net)).

Na secção de métodos do manuscrito deve ser mencionada esta aprovação e a obtenção de consentimento informado, quando aplicável.

#### Resultados

Os resultados devem ser apresentados, no texto, tabelas e figuras, seguindo uma sequência lógica.

Não deve ser fornecida informação em duplicado no texto e nas tabelas ou figuras, bastando descrever as principais observações referidas nas tabelas ou figuras.

Independentemente da limitação do número de figuras propostos para cada tipo de artigo, só devem ser apresentados gráficos quando da sua utilização resultarem claros benefícios para a compreensão dos resultados.

#### Apresentação de dados numéricos

A precisão numérica utilizada na apresentação dos resultados não deve ser superior à permitida pelos instrumentos de avaliação.

Para variáveis quantitativas as medidas apresentadas não deverão ter mais do que uma casa decimal do que os dados brutos.

As proporções devem ser apresentadas com apenas uma casa decimal e no caso de amostras pequenas não devem ser apresentadas casas decimais.

Os valores de estatísticas teste, como t ou  $\chi^2$ , e os coeficientes de correlação devem ser apresentados com um máximo de duas casas decimais.

Os valores de p devem ser apresentados com um ou dois algarismos significativos e nunca na forma de p=NS, p<0,05 ou p>0,05, na medida em que a informação contida no valor de P pode ser importante. Nos casos em

que o valor de  $p$  é muito pequeno (inferior a 0,0001), pode apresentar-se como  $p < 0,0001$ .

#### Tabelas e figuras

As tabelas devem surgir após as referências. As figuras devem surgir após as tabelas.

Devem ser mencionadas no texto todas as tabelas e figuras, numeradas (numeração árabe separadamente para tabelas e figuras) de acordo com a ordem em que são discutidas no texto.

Cada tabela ou figura deve ser acompanhada de um título e notas explicativas (ex. definições de abreviaturas) de modo a serem compreendidas e interpretadas sem recurso ao texto do manuscrito.

Para as notas explicativas das tabelas ou figuras devem ser utilizados os seguintes símbolos, nesta mesma sequência:

\*, †, ‡, §, ||, ¶, \*\*, ††, ‡‡.

Cada tabela ou figura deve ser apresentada em páginas separadas, juntamente com o título e as notas explicativas.

Nas tabelas devem ser utilizadas apenas linhas horizontais.

As figuras, incluindo gráficos, mapas, ilustrações, fotografias ou outros materiais devem ser criadas em computador ou produzidas profissionalmente.

As figuras devem incluir legendas.

Os símbolos, setas ou letras devem contrastar com o fundo de fotografias ou ilustrações.

A dimensão das figuras é habitualmente reduzida à largura de uma coluna, pelo que as figuras e o texto que as acompanha devem ser facilmente legíveis após redução.

Na primeira submissão do manuscrito não devem ser enviados originais de fotografias, ilustrações ou outros materiais como películas de raios-X. As figuras, criadas em computador ou convertidas em formato electrónico após digitalização devem ser inseridas no ficheiro do manuscrito.

Uma vez que a impressão final será a preto e branco ou em tons de cinzento, os gráficos não deverão ter cores. Gráficos a três dimensões apenas serão aceites em situações excepcionais.

A resolução de imagens a preto e branco deve ser de pelo menos 1200 dpi e a de imagens com tons de cinzento ou a cores deve ser de pelo menos 300 dpi.

As legendas, símbolos, setas ou letras devem ser inseridas no ficheiro da imagem das fotografias ou ilustrações.

Os custos da publicação das figuras a cores serão suportados pelos autores.

Em caso de aceitação do manuscrito, serão solicitadas as figuras nos formatos mais adequados para a produção da revista.

#### Discussão

Na discussão não deve ser repetida detalhadamente a informação fornecida na secção dos resultados, mas devem ser discutidas as limitações do estudo, a relação dos resultados obtidos com o observado noutras investigações e devem ser evidenciados os aspectos inovadores do estudo e as conclusões que deles resultam.

É importante que as conclusões estejam de acordo com os objectivos do estudo, mas devem ser evitadas afirmações e conclusões que não sejam completamente apoiadas pelos resultados da investigação em causa.

#### Referências

As referências devem ser listadas após o texto principal, numeradas consecutivamente de acordo com a ordem da sua citação. Os números das referências devem ser apresentados entre parentesis. Não deve ser utilizado software para numeração automática das referências.

Pode ser encontrada nos "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" uma descrição pormenorizada do formato dos diferentes tipos de referências, de que se acrescentam alguns exemplos:

##### 1. Artigo

• Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increase risk for pancreaticobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.

##### 2. Artigo com Organização como Autor

• The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996; 64:282-4.

##### 3. Artigo publicado em Volume com Suplemento

• Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 1:275-82.

##### 4. Artigo publicado em Número com Suplemento

payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23 (1 Suppl 2):89-97.

##### 5. Livro

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers;1996.

##### 6. Livro (Editor(s) como Autor(es))

Norman IJ, Redfern SJ, editores. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone;1996.

##### 7. Livro (Organização como Autor e Editor)

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute;1992.

##### 8. Capítulo de Livro

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

##### 9. Artigo em Formato Electrónico

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1 (1): [24 screens]. Disponível em: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

Devem ser utilizados os nomes abreviados das publicações, de acordo com o adoptado pelo Index Medicus. Uma lista de publicações pode ser obtida em <http://www.nlm.nih.gov>.

Deve ser evitada a citação de resumos e comunicações pessoais.

Os autores devem verificar se todas as referências estão de acordo com os documentos originais.

#### Anexos

Material muito extenso para a publicação com o manuscrito, designadamente tabelas muito extensas ou instrumentos de recolha de dados, poderá ser solicitado aos autores para que seja fornecido a pedido dos interessados.

#### Conflitos de interesse

Os autores de qualquer manuscrito submetido devem revelar no momento da submissão a existência de conflitos de interesse ou declarar a sua inexistência.

Essa informação será mantida confidencial durante a revisão do manuscrito pelos avaliadores externos e não influenciará a decisão editorial mas será publicada se o artigo for aceite.

#### Autorizações

Antes de submeter um manuscrito aos ARQUIVOS DE MEDICINA os autores devem ter em sua posse os seguintes documentos que poderão ser solicitados pelo corpo editorial:

- consentimento informado de cada participante;
- consentimento informado de cada indivíduo presente em fotografias, mesmo quando forem efectuadas tentativas de ocultar a respectiva identidade;
- transferência de direitos de autor de imagens ou ilustrações;
- autorizações para utilização de material previamente publicado;
- autorizações dos colaboradores mencionados na secção de agradecimentos.

#### SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS

Os manuscritos submetidos aos ARQUIVOS DE MEDICINA devem ser preparados de acordo com as recomendações acima indicadas e devem ser acompanhados de uma carta de apresentação.

**Carta de apresentação**

Deve incluir a seguinte informação:

- 1) Título completo do manuscrito;
- 2) Nomes dos autores com especificação do contributo de cada um para o manuscrito;
- 3) Justificação de um número elevado de autores, quando aplicável;
- 4) Tipo de artigo, de acordo com a classificação dos ARQUIVOS DE MEDICINA;
- 5) Fontes de financiamento, incluindo bolsas;
- 6) Revelação de conflitos de interesse ou declaração da sua ausência;
- 7) Declaração de que o manuscrito não foi ainda publicado, na íntegra ou em parte, e que nenhuma versão do manuscrito está a ser avaliada por outra revista;
- 8) Declaração de que todos os autores aprovaram a versão do manuscrito que está a ser submetida;
- 9) Assinatura de todos os autores.

É dada preferência à submissão dos manuscritos por e-mail (submit@arquivosdemedicina.org).

O manuscrito e a carta de apresentação devem, neste caso, ser enviados em ficheiros separados em formato word. Deve ser enviada por fax (225074374) uma cópia da carta de apresentação assinada por todos os autores.

Se não for possível efectuar a submissão por e-mail esta pode ser efectuada por correio para o seguinte endereço:

ARQUIVOS DE MEDICINA  
Faculdade de Medicina do Porto  
Alameda Prof. Hernâni Monteiro  
4200 – 319 Porto, Portugal

Os manuscritos devem, então, ser submetidos em triplicado (1 original impresso apenas numa das páginas e 2 cópias com impressão frente e verso), acompanhados da carta de apresentação.

Os manuscritos rejeitados ou o material que os acompanha não serão devolvidos, excepto quando expressamente solicitado no momento da submissão.

**CORRECÇÃO DOS MANUSCRITOS**

A aceitação dos manuscritos relativamente aos quais forem solicitadas alterações fica condicionada à sua realização.

A versão corrigida do manuscrito deve ser enviada com as alterações sublinhadas para facilitar a sua verificação e deve ser acompanhada duma carta respondendo a cada um dos comentários efectuados.

Os manuscritos só poderão ser considerados aceites após confirmação das alterações solicitadas.

**MANUSCRITOS ACEITES**

Uma vez comunicada a aceitação dos manuscritos, deve ser enviada a sua versão final em ficheiro de Word<sup>®</sup>, formatada de acordo com as instruções acima indicadas.

No momento da aceitação os autores serão informados acerca do formato em que devem ser enviadas as figuras.

A revisão das provas deve ser efectuada e aprovada por todos os autores dentro de três dias úteis. Nesta fase apenas se aceitam modificações que decorram da correcção de gralhas.

Deve ser enviada uma declaração de transferência de direitos de autor para os ARQUIVOS DE MEDICINA, assinada por todos os autores, juntamente com as provas corrigidas.