Reprodução (Climatério

Volume 26 • Número 1 Janeiro/Março 2011

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

NOVIDADE!

Seu novo ambiente de Atualização, Consulta e Debate Científico





- Artigos Científicos
- Artigos Comentados
- Aulas livres
- Casos Clínicos
- Entrevistas
- Eventos

Apoio

Elaborados por renomados especialistas em Reprodução Assistida.

Um portal interativo onde você pode emitir sua opinião, enviar materiais científicos e debater com os colegas.



Participe!

www.portaldafertilidade.com.br









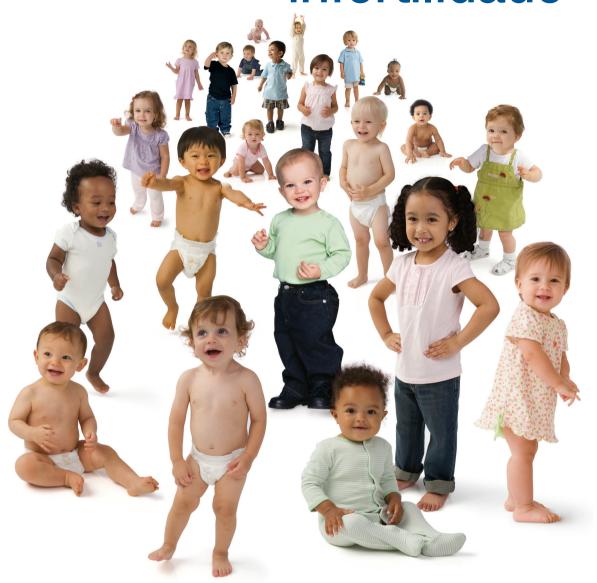
Você. Nós. Somos os pais da fertilidade







Compromisso com o tratamento da infertilidade



A **MSD**, uma nova empresa resultante da união de duas companhias farmacêuticas tradicionais, a Schering-Plough e a Merck Sharp & Dohme, é líder mundial em tratamentos para a Saúde da Mulher.

Os esforços em pesquisa de novos medicamentos na área da fertilidade reforçam nosso compromisso de ajudar as mulheres a realizar o sonho de ser mãe: celebramos o nascimento de mais de 1.000.000 de crianças com os nossos produtos.







O TRATAMENTO MEDICAMENTOSO NÃO HORMONAL É INDICADO PARA MULHERES:

- COM RESPOSTA INSATISFATÓRIA NA TH
- **COM REAÇÕES ADVERSAS NA TH**
 - QUE NÃO DESEJAM A TH
 - COM CONTRAINDICAÇÃO A TH

Apresentação: embalagem contendo 30 comprimidos revestidos de 100 mg de Trifolium pratense L. (extrato seco a 40%) que fornece 40 mg de isoflavonas.





Posologia: 1 comprimido uma vez ao dia.

Promensil® (Trifolium pratense L.). Apresentação: comprimido revestido - embalagem contendo 30 comprimidos. Indicação: Promensil® é um fitomedicamento que atua no alívio dos sintomas vasomotores da menopausa. Contraindicações: uso em lactantes, grávidas e pacientes com hipersensibilidade a qualquer um dos componentes da fórmula. Interações medicamentosas: o uso concomitante com tamoxifeno pode causar diminuição da eficácia do tamoxifeno e com anticoagulantes, agentes trombolíticos e heparina de baixo peso molecular pode causar aumento de sangramento. Além disso, a associação com contraceptivos, contendo estrogênio, pode alterar a eficácia contraceptiva, por inibicão competitiva da isoflavona. Reações adversas: alterações gastrointestinais como dor de estômago, enjoos e diarreia; leve sangramento gengival ou nasal ou reações de hipersensibilidade, como erupção, urticária e coceira na pele. Posologia: tomar um comprimido de 100 mg (40 mg isoflavonas totais) uma vez ao dia, via oral. A dose pode ser ajustada de acordo com a avaliação médica dos sintomas clínicos. M.S: 1.0390.0179 Farmoquímica S/A. CNPJ 33.349.473/0001-58. VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA. SAC 08000 25 01 10. Para ver o texto de bula na íntegra, acesse o site www.fqm.com.br.

Referências Bibliográficas: (1) BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Manual de atenção a mulher no climatério e menopausa. Brasília: Ministério da

CONTRAINDICAÇÕES: USO EM LACTANTES, GRÁVIDAS E PACIENTES COM HIPERSENSIBILIDADE A QUALQUER UM DOS COMPONENTES DA FORMULA. **INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS:** O USO CONCOMITANTE COM ANTICOAGULANTES, AGENTES TROMBOLÍTICOS E HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR PODE CAUSAR AUMENTO DE SANGRAMENTO, E COM TAMOXIFENO E CONTRACEPTIVOS COM ESTROGÊNIO PODE REDUZIR A EFICÁCIA.







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

EditorEditores AssociadosMario CavagnaEduardo Pandolfi PassosCo-editorJoão Sabino Pinho Neto

Leopoldo de Oliveira Tso Paulo Spinola

Editores Anteriores

Araken Irerê Pinto Nelson Vitielo Newton Eduardo Busso Dirceu Mendes Pereira Nilson Donadio Marcos Felipe Silva de Sá Edmund Chada Baracat Nilson Roberto de Melo Rui Alberto Ferriani

Conselho Editorial

Aarão Mendes Pinto Neto, Campinas, SP
Luc
Alberto Soares Pereira Filho, Rio de Janeiro, RJ
Ma
Alkindar Soares, Rio de Janeiro, RJ
Ma

Almir Antonio Urbanetz, Curitiba, PR Álvaro Petracco, Porto Alegre, RS Anaglória Pontes, Botucatu, SP

Angela Maggio da Fonseca, São Paulo, SP Aroldo Fernando Camargos, Belo Horizonte, MG

Artur Dzik, São Paulo, SP

César Eduardo Fernandes, São Paulo, SP Edmund Chada Baracat, São Paulo, SP Elsimar Metzer Coutinho, Salvador, BA Fernando Freitas, Porto Alegre, RS Gilberto Costa Freitas, São Paulo, SP Hans Wolfgang Halbe, São Paulo, SP Hugo Maia Filho, Salvador, BA João Carlos Mantese, São Paulo, SP José Carlos de Lima, Recife, PE José Mendes Aldrighi, São Paulo, SP

Juliano Augusto Brum Scheffer, Belo Horizonte, MG

Lucas Vianna Machado, Belo Horizonte, MG

Marco Aurélio Albernaz, Goiânia, GO

Marcos Felipe Silva de Sá, Ribeirão Preto, SP Maria Celeste Osório Wender, Porto Alegre, RS

Maria Yolanda Makuch, Campinas, SP

Mario Cavagna, São Paulo, SP

Marta Finotti, Goiânia, GO

Maurício Simões Abrão, São Paulo, SP Newton Eduardo Busso, São Paulo, SP Nilson Roberto de Melo, São Paulo, SP Polimara Spritzer, Porto Alegre, RS

Ricardo Baruffi, Ribeirão Preto, SP

Ricardo Melo Marinho, Belo Horizonte, MG Rogério Bonassi Machado, São Paulo, SP Ronald Bossemeyer, Santa Maria, RS

Rosaly Rulli Costa, Brasília, DF

Rui Alberto Ferriani, Ribeirão Preto, SP

Sebastião Freitas de Medeiros, Cuiabá, MT

Selmo Geber, Belo Horizonte, MG

Conselho Editorial Internacional

Cesare Aragona, Roma, Italia Gian Benedetto Melis, Cagliari, Italia Paolo E. Levi Setti, Milão, Italia

Diagramação, revisão e projeto gráfico

Zeppelini Editorial Ltda. Rua Bela Cintra, 178 - Cerqueira César - São Paulo/SP - CEP 01415-000 Tel.(11)2978-6686 www.zeppelini.com.br



Sociedade Brasileira de Reprodução Humana

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

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

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

Diretoria Biênio 2011-2012

Presidente

Artur Dzik

1º Vice-Presidente

Dirceu Henrique Mendes Pereira

2º Vice-Presidente

Cláudio Barros Leal Ribeiro

Secretário Executivo

João Pedro Junqueira Caetano

Secretário Adjunto

Vinicius Medina Lopes

Tesoureiro Geral

Gilberto da Costa Freitas

Tesoureiro Adjunto

Adriana Cristine Arent

Diretor Científico

Waldemar Naves do Amaral

Presidente do Conselho de Delegados

Luiz Augusto Antonio Batista

DELEGADOS SBRH - BIÊNIO 2011/2012

AC - Julio Eduardo Gomes Pereira

AL - Marco Antonio Torres Cavalcanti

AP - Carlos Glenny Valente Pó

AM - Marcel Heibel

BA - Genevieve Marina Coelho

CE - Sebastião Evangelista Torquato Filho

DF - Frederico José Silva Correa

ES - Jules White Soares Sousa

GO - Zelma Bernardes Costa

MA - Palmério de Brito Pacheco

MT - José Aldair Kotecki

MS - Suely de Souza Resende

MG - Rivia Mara Lamaita

PA - Arivaldo José Conceição Meireles

PB - Eduardo Borges da Fonseca

PR - Vivian Ferreira do Amaral

PE - Altina Castelo Branco Almeida Barros

PI - André Luiz Eigenheer da Costa

RJ - Isaac Moise Yadid

RN - Sonia Maria de Medeiros Barreto

RS - Isabel Cristina Amaral de Almeida

RO - José Hiran da Silva Gallo

RR - Tomas Segundo Espinosa Hurtado

SC - Kazue Harada Ribeiro

SP (interior) - Paula Andrea de Albuquerque S. Navarro

SÃO PAULO (capital) - Nilka Fernandes Donadio

SE - George Hamilton Caldas Silveira

TO - Alessandra Schiavinato Bianchini Daud

Índice

	Editorial
6	Bem-vindo o Consenso de Bologna
	Estudo Clínico
7	Folículos antrais como marcadores da reserva ovariana Antral follicles as markers of ovarian reserve Eduardo Camelo de Castro, Rodopiano de Souza Florêncio, Gercino Monteiro Filho, Waldemar Naves do Amaral
	Estudos Observacionais
12	Investigação bacteriológica e micológica de placas de cultivo de embriões em laboratório de reprodução humana Research bacteriological and mycological culture of plates from embryos in the laboratory of human reproduction Barbara Rosa Foizer Ribeiro, Waldemar Naves do Amaral, Geraldo Sadoyama
19	Efeitos das isoflavonas da soja sobre o tecido ósseo de ratas Effects of soy isoflavones on bone tissue of rats Miriam Aparecida dos Santos, Rinaldo Florêncio da Silva, Manuel de Jesus Simões, Rejane Daniele Reginato
	Relato de Caso
26	Relato de caso: hipospádia feminina em criança Case report: female hypospadia in children Heraldo Carlos Borges Inforzato, Ricardo Santos Simões, Adriana Aparecida Ferraz Carbonel, José Maria Soares Júnior

Instruções aos autores

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

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

Os originais devem ser preparados na seguinte següência:

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

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

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

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

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

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

Artigos em periódicos:

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

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

Volume com suplemento:

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

Livros

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

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

Material eletrônico:

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

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

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

Cartas e editoriais:

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

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

Bem-vindo o Consenso de Bologna

manejo clínico das pacientes más respondedoras nos ciclos de Fertilização *In Vitro* (FIV) sempre foi um desafio para os especialistas. Não há dúvida que a ovodoação é a alternativa que oferece as maiores chances de gravidez, porém nem todos os casais estão preparados a aceitar essa modalidade de tratamento. Por isso, alguns protocolos alternativos foram desenvolvidos na tentativa de aumentar a quantidade de oócitos maduros e, consequentemente, melhorar as taxas de sucesso antes da ovodoação: protocolos com altas doses de gonadotrofinas, uso de inibidores da aromatase, adição de hormônio do crescimento (GH) e o uso de androgênios entre outros. Atualmente a tendência é a adoção de protocolos com baixas doses de gonadotrofinas ou, até mesmo, o ciclo natural pela viabilidade econômica desses tratamentos frente ao pequeno número de folículos maduros obtidos em cada ciclo de estímulo.

Os estudos nessa área são difíceis de serem interpretados pela heterogeneidade e pelo número restrito de pacientes e, principalmente, pela falta de padronização na definição de pacientes más respondedoras (poor responders). Em abril de 2010, durante encontro da Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE), desenvolveu-se, na cidade de Bologna (Itália), critérios para definir o termo "má resposta ovariana" ao estímulo nos ciclos de FIV. De acordo com esse consenso, ficou estabelecido que a presença de duas de três das seguintes características são necessárias para definir a má resposta ovariana: i) idade materna avançada ou qualquer outro fator de risco para má resposta; ii) má resposta ovariana em ciclo prévio (menos de quatro oócitos obtidos); iii) teste de reserva ovariana alterado. Além disso, dois ciclos de má resposta ovariana após estímulo com altas doses de gonadotrofinas são suficientes para definir a paciente como má respondedora independente da idade e dos testes de reserva ovariana.

Parece que, finalmente, após uma medida simples, mas fundamental, que é a padronização de conceitos e definições será possível comparar resultados entre os estudos e buscar a melhor alternativa terapêutica nos casos de má resposta ovariana nos ciclos de FIV.

Leopoldo de Oliveira Tso Coeditor da Revista Reprodução & Climatério

Referências bibliográficas

1. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L; ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. Hum Reprod. 2011;26(7):1616-24.

Folículos antrais como marcadores da reserva ovariana

Antral follicles as markers of ovarian reserve

Eduardo Camelo de Castro¹, Rodopiano de Souza Florêncio², Gercino Monteiro Filho³, Waldemar Naves do Amaral⁴



O Doutor **Eduardo Camelo de Castro** é formado, fez Residência em Ginecologia e Obstetrícia e Curso de Especialização em Reprodução Humana na Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP). É Diretor Associado da Humana Medicina Reprodutiva (Femina), Professor do Curso de Pós Graduação em Reprodução Humana da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO) e Professor da Unidade de Saúde da Mulher do Curso de Medicina da PUC-GO.

Resumo

Objetivo: Comparar as curvas padrões de decréscimo da reserva ovariana considerando a dosagem do hormônio folículo estimulante (FSH) e a contagem dos folículos antrais (CFA). Método: Estudo transversal prospectivo de pacientes atendidas no Centro de Reprodução Fêmina no período de 01/03/2010 a 31/08/2010. As pacientes foram submetidas à ultrassonografia transvaginal e à dosagem do FSH do 2º ao 4º dia da menstruação. Foram incluídas pacientes de 21 a 44 anos, com ciclos regulares, dois ovários íntegros, nenhuma evidência de endocrinopatias, que não recebiam medicamentos há 6 meses, e que assinaram o consentimento. Foram excluídas as tabagistas, portadoras de galactosemia, cistos ovarianos, com antecedente de hepatopatia, cirurgia ginecológico-ovariana, tratamento com quimioterapia ou radioterapia. O teste utilizado foi o coeficiente de correlação de Pearson. Resultados: Sessenta e oito pacientes com idade entre 22 e 44 anos foram incluídas. O fator masculino foi a principal etiologia da infertilidade, contribuindo com 41% dos casos. A correlação entre a dosagem do FSH e a CFA foi fraca (r=-0,269) e o teste de Pearson foi estatisticamente significante (p=0,026). Conclusão: A correlação entre a contagem dos folículos antrais e a dosagem sérica do hormônio folículo estimulante foi fraca e estatisticamente significante.

Unitermos: Reserva ovariana; Hormônio folículo estimulante; Contagem dos folículos antrais ovarianos; Infertilidade.

Abstract

Objective: To compare the curves patterns of ovarian reserve decline taking into account the follicle stimulating hormone measurement (FSH) and the antral follicles count (AFC). Methods: Prospective transversal study of patients attended at Fêmina Reproduction Center from March 2010 to August 2010. The patients were submitted to transvaginal ultrasonography and had FSH measurement from days 2 to 4 of their period. Patients included were the ones who were 21 to 44 years old, with regular menses, two healthy ovaries, without any evidence of endocrinopathies, that were not taking medicines for 6 months, and signed the consent. Patients excluded: smokers, with galactosemia or ovarian cysts, with antecedents of hepatopathies, gynecological ovarian surgeries or were treated with chemotherapy or x-ray. Pearson's correlation coefficient was used to analyze the data. Results: Sixty-eight patients were included in the trial, age ranged from 22 to 44 years old. The male factor was the main etiology of infertility, contributing with 41% of the cases. The correlation between FSH measurement and AFC was weak (r=-0,269) and Pearson test was statistically significant (p=0,026). Conclusions: The correlation between the antral follicles count and the serum dosage of FSH was weak and statistically significant.

Uniterms: Ovarian reserve; Follicle stimulating hormone; Antral follicles count; Infertility.

Pesquisa idealizada no Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Goiás (UFG) e realizada no Centro de Reprodução Assistida Fêmina

¹ Graduado em Medicina; Residência Médica em Ginecologia e Obstetrícia e Especialização em Infertilidade Conjugal na Santa Casa de São Paulo; Professor da Unidade de Saúde da Mulher do Curso de Medicina da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO); Professor do Curso de Pós-Graduação em Reprodução Humana da PUC-GO; Diretor Associado do Centro de Reprodução Assistida Fêmina.

² Professor Adjunto Doutor do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFG; Diretor Técnico do Centro de Reprodução Assistida Fêmina.

³ Professor Adjunto IV de Estatística da Faculdade de Medicina da UFG; Professor Efetivo de Estatística da Universidade do Estado de Goiás – Goiânia (GO), Brasil.

⁴ Professor Adjunto Doutor e Diretor do Departamento de Ginecología e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFG; Diretor Técnico da Clínica Fértile Diagnósticos – Goiânia (GO), Brasil. Endereço para correspondência: Eduardo Camelo de Castro – Rua 90-A, 166 – Setor Sul – CEP: 74093-030 – E-mail: dr.eduardodecastro@gmail.com

Introdução

Reserva ovariana é o *pool* de folículos ovarianos disponíveis para recrutamento, representando o potencial funcional do ovário através do número e da qualidade oocitária^{1,2}.

Diminuição da reserva ovariana é um processo de declínio da fecundidade associado tanto a depleção folicular dos ovários quanto a piora da qualidade oocitária³. Parece haver também uma diminuição da resposta ovariana à quantidades crescentes de gonadotrofinas⁴.

Sugere-se que apenas a idade não prediz de forma confiável a capacidade reprodutiva de uma mulher⁵. Entre mulheres de mesma idade, a reserva ovariana pode variar de forma significativa. Um declínio na função reprodutiva das mulheres torna-se evidente cerca de dez anos antes do seu término e a fertilidade diminui durante a quarta década de vida, período associado com modificações na secreção de gonadotrofinas⁶.

O recrutamento e o desenvolvimento de múltiplos folículos ovarianos em resposta ao estímulo com gonadotrofinas são realizados no tratamento com fertilização *in vitro* (FIV). A responsividade ovariana a este tipo de tratamento é variável e imprevisível. O número de folículos em desenvolvimento durante a estimulação ovariana tem relação direta com a quantidade de oócitos captados e influencia o número de embriões disponíveis para seleção, transferência e congelamento. Assim, a reserva ovariana está relacionada com maior ou menor chance de gestação. Em aproximadamente 10% dos casos, ocorre baixa resposta ao tratamento proposto, associado diretamente à redução do número de oócitos captados, ao aumento do número de ciclos cancelados e a índices menores de gravidez³.

A avaliação da reserva ovariana se aplica a pacientes inférteis que serão submetidas às técnicas de reprodução assistida com a intenção de selecionar as que apresentam bom prognóstico para gravidez viável, a pacientes com suspeita ou história familiar de falência ovariana prematura (FOP), para jovens que serão submetidas a tratamentos para neoplasias que podem acarretar perda da fertilidade futura e ajuda os médicos na decisão da realização de uma ooforectomia profilática em mulheres selecionadas. Isso mostra a importância de se estabelecerem curvas de normalidade para os testes de reserva ovariana.

Existem poucos dados na literatura que suportem a utilização de um único marcador para determinar a reserva ovariana de uma paciente. A contagem folicular antral (CFA) associada ao hormônio Folículo Estimulante (FSH) basal parece ser a abordagem de menor custo na avaliação atual do casal infértil. A demonstração que existe uma correlação estreita entre a curva da dosagem do FSH e da contagem dos folículos antrais permitirá a racionalização ainda maior dos custos da avaliação da reserva ovariana.

8

Portanto, o objetivo deste trabalho foi comparar as curvas padrões de decréscimo da reserva ovariana considerando a dosagem do hormônio folículo estimulante e a contagem dos folículos antrais.

Metodologia

Foi realizado um estudo transversal prospectivo de pacientes dos 22 aos 44 anos atendidas pelos autores no Centro de Reprodução Assistida Fêmina no período 01/03/2010 a 31/08/2010.

As pacientes foram submetidas à ultrassonografia transvaginal na fase folicular precoce do segundo ao quarto dia do ciclo menstrual. As ultrassonografias foram realizadas apenas pelos médicos pesquisadores, com equipamento Voluson da marca GE com transdutores transvaginais de 7,5MHz.

Todas as medidas dos folículos antrais foram feitas no modo bidimensional. O diâmetro máximo longitudinal e seu diâmetro perpendicular foram obtidos com o modo convencional 2D. O tamanho dos folículos foi considerado como a média dessas duas medidas. Os folículos de 2 a 10mm de diâmetro foram considerados antrais. Foram avaliados os ovários direito e esquerdo e realizado a somatória das duas contagens. O número total dos folículos antrais foi utilizado para o cálculo. Essas medições já são feitas de modo rotineiro para avaliação da reserva ovariana da mulher.

Entre o dia 2 e 4 do ciclo menstrual foram colhidas amostras de sangue para determinar também a dosagem do FSH basal pela eletroquimioluminescência. As coletas foram realizadas pela manhã, em jejum mínimo de 4 horas. Coletou-se 1mL de soro que ficou refrigerado entre 2° e 8°C e foi processado em, no máximo, 30 dias. Essa dosagem também é rotineira para avaliação da reserva ovariana da mulher.

O protocolo foi preenchido com a idade da paciente, causa da infertilidade, método de dosagem do FSH, o valor da dosagem do FSH, a contagem ultrassonográfica dos folículos ovarianos antrais, histórico de endocrinopatias, tabagismo, galactosemia e presença de cistos ovarianos durante a contagem dos folículos antrais. Nesse momento também foram avaliados os critérios de inclusão e exclusão discriminados abaixo.

Foram incluídas as pacientes com idade entre 21 e 44 anos, com ciclos regulares de 21 a 35 dias, com dois ovários íntegros, sem evidência de doenças endócrinas, que não recebiam medicamentos ou hormônios há 6 meses e que assinaram o informe de consentimento.

Foram excluídas as seguintes pacientes: tabagistas, portadoras de galactosemia, com antecedente de cirurgias ginecológicoovarianas e de tratamento com quimioterapia ou radioterapia,

portadoras de cistos ovarianos ou de folículos ovarianos medindo mais que 10mm e aquelas com insuficiência hepática.

Para avaliar a significância das analises estatísticas foi utilizado o programa SPSS versão 16.0 para Windows. O teste utilizado para uma amostra normal foi o coeficiente de correlação de Pearson.

Este estudo foi aprovado pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Resultados

Sessenta e oito pacientes foram incluídas no estudo, com idade entre de 22 e 44 anos (média de 32,3 anos). Dentre as causas de infertilidade, o fator masculino foi a principal etiologia, contribuindo com quarenta e um por cento (41%) dos casos.

O Gráfico 1 demonstra que a correlação entre as medidas obtidas do FSH para cada idade foi pequena quando avaliada pelo coeficiente de correlação (r=0,191), não sendo estatisticamente significativa (p=0,119).

O Gráfico 2 mostra que o coeficiente de correlação entre as medidas obtidas do CFA para cada idade foi maior quando comparada com as dosagens do FSH. A correlação foi moderada e estatisticamente significante (r=-0,545 e p<0,001).

A comparação entre a contagem dos folículos antrais e a dosagem sérica do hormônio folículo estimulante pode ser observada no Gráfico 3. A correlação entre a dosagem do FSH e a CFA foi fraca (r=-0,269) e o teste de Pearson foi estatisticamente significante (p=0,026).

Discussão

Um bom teste de reserva ovariana deve estimar a duração provável da atividade dos ovários, indicar a dose real de estimulação ovariana, ser preditivo de concepção e apontar a chance de se ter um recém nascido-vivo¹. Em vários pontos da literatura considera-se que não há exames confiáveis e altamente sensíveis para avaliar esses fatores em mulheres na menacme.

Os testes estáticos (basais) são comumente realizados no terceiro dia do ciclo menstrual, destacando-se neste estudo a dosagem do FSH basal e o número de folículos antrais ovarianos^{7,8}.

Os níveis basais do FSH refletem o estoque folicular de ambos os ovários em um determinado momento da vida reprodutiva. À medida que a reserva folicular diminui, os níveis basais do FSH se elevam. Por isso, o FSH tem sido utilizado como um marcador de insuficiência ovariana e, quando elevado, está associado à baixas taxas de sucesso em técnicas de reprodução assistida.

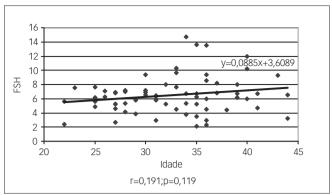


Gráfico 1 - Distribuição da dosagem sérica do hormônio folículo estimulante (FSH) em relacão à idade.

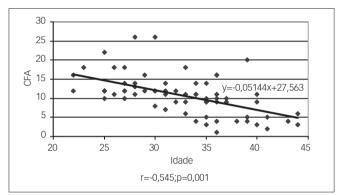


Gráfico 2 - Distribuição da contagem dos folículos antrais (CFA) em relação à idade.

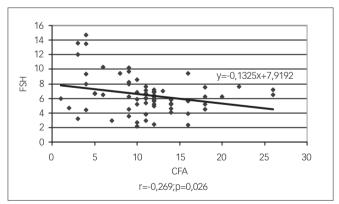


Gráfico 3 - Distribuição da dosagem sérica do hormônio folículo estimulante (FSH) em relação à contagem de folículos antrais (CFA).

Os valores considerados normais do FSH sérico variam entre 3 e 15UI^2 .

A idade da mulher e o FSH basal são associados de forma independentes aos resultados da FIV. Um estudo com pacientes submetidas à FIV concluiu que o FSH basal é um marcador do tamanho do pool folicular remanescente. Observou-se também que mulheres de idade avançada, mesmo com níveis baixos desse hormônio, demonstraram resultados limitados no tratamento. Isso sugere que a idade deve ser levada em conta antes da

dosagem do FSH na estimativa de sucesso da FIV². O coeficiente de correlação entre o FSH e a idade nesta casuística foi pequeno. Foi aplicado o teste de Pearson, que não apresentou significância estatística.

Outro estudo observou que o FSH alto não deve ser critério de exclusão de pacientes para FIV, já que o teste representa o aspecto quantitativo e não qualitativo da reserva ovariana, ou seja, apesar de possuir um baixo *pool* folicular, uma paciente não necessariamente apresentará uma má qualidade oocitária, especialmente se for jovem. Por outro lado, sugere-se que o FSH basal seja usado para aconselhar as pacientes sobre suas chances de sucesso de uma gestação⁹.

A primeira publicação que correlacionou a CFA com a reserva ovariana foi em 1996¹⁰. Posteriormente, mostrou-se que a CFA diminui com o avançar da idade¹¹. A casuística deste estudo corroborou o achado da maioria dos trabalhos que demonstraram uma relação entre a CFA e a idade^{12,13}.

Há algum tempo, estudos também demonstram uma correlação entre a CFA e o estado funcional dos ovários. A CFA parece refletir o número de folículos primordiais remanescentes¹², podendo ter correlação com a quantidade de ciclos cancelados nas más respondedoras e com o número de oócitos aspirados⁵.

Neste estudo a CFA envolveu a medida de folículos entre 2 e 10mm, mas esse valor pode variar entre os centros de estudo. Considera-se que essa contagem depende do tamanho do *pool* folicular primordial do qual os folículos são recrutados ^{13,14,15}. Mulheres com mais folículos antrais tendem a produzir mais folículos maduros e oócitos fertilizados em resposta à administração do FSH¹⁶. Considera-se como mínima uma contagem de dez folículos antrais na soma dos dois ovários para a obtenção de taxas adequadas de gestação ¹⁵.

Uma meta-análise demonstrou que a CFA é superior à medida do volume dos ovários na avaliação de má resposta à FIV^{17} .

Esse e outros estudos demonstraram também a superioridade da CFA em relação à dosagem de gonadotrofinas basais na predição de resposta à hiperestimulação ovariana nos ciclos de FIV^{17,18}.

Estudos mostram que a CFA apresenta nítida correlação positiva com as concentrações dos marcadores séricos 19,20 e com os testes dinâmicos e sugerem que a CFA seja um dos melhores parâmetros funcionais quantitativos de reserva ovariana 14,18. O coeficiente de correlação entre a dosagem do FSH e a CFA realizado nesta dissertação foi fraco, com o teste de Pearson estatisticamente significante.

A CFA e níveis séricos de HAM foram os dois parâmetros de maior poder preditivo de sucesso no tratamento de reprodução assistida.

A CFA seria capaz de identificar 89% das más respondedoras previamente à estimulação com gonadotrofinas exógenas. Apesar da especificidade de 39%, os autores encontraram associação significativa com o número de oócitos obtidos após ciclos induzidos e a probabilidade de gravidez química²¹. Outro estudo admite a importância da CFA como teste de *screening* para predição da má resposta ovariana²².

Vários estudos demonstraram a reprodutibilidade da CFA tanto quando feita em duas oportunidades pelo mesmo observador quanto por dois observadores diferentes^{18,23,24}.

Uma metanálise com 11 estudos conclui que a combinação de múltiplas variáveis (HAM, Inibina B, FSH, CFA e outras) para diagnóstico de má respondedora é comparável ao CFA isoladamente. Assim, se a opção for por um único exame, este seria a CFA²⁵.

Conclusão

A correlação entre a contagem dos folículos antrais e a dosagem sérica do hormônio folículo estimulante foi fraca e estatisticamente significante.

Referências bibliográficas

- Maheshwari A, Fowler P, Bhattacharya S. Assessment of ovarian reserve – should we perform tests of ovarian reserve routinely? Hum Reprod. 2006;21(11):2729-35.
- 2. Chuang CC, Chen CD, Chao KH, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Age is a better predictor of pregnancy potencial than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. Fertil Steril. 2003;79(1):63-68.
- 3. Tomas C, Nuojua-Huttunen S, Martikainen H. Pretreatment transvaginal ultrasound examination predicts ovarian responsiveness to gonadotrophins in in-vitro fertilization. Hum Reprod. 1997;12(2):220-3.
- 4. Jacobs SL, Metzger DA, Dodson WC, Haney AF. Effect of age on response to human menopausal gonadotropin stimulation. J Clin Endocrinol Metab. 1990;71(6):1525-30.

- Jain T, Soules MR, Collins JA. Comparison of basal follicle-stimulating hormone versus the clomiphene citrate challenge test of ovarian reserve screening. Fertil Steril. 2004;829(1):180-5.
- Burger HG, Dudley EC, Robertson DM, Dennerstein L. Hormonal changes in the menopause transition. Recent Prog Horm Res. 2002;57(1):257-75.
- Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Berk CA. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. Fertil Steril. 1997;67:110-4.
- Hofmann GE, Danforth DR, Seifer DB. Inibin-B: the physiologic basis of the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. Fertil Steril. 1998;69:474-7.

- Abdalla H, Thum MY. An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. Hum Reprod. 2004;19(4):893-8.
- Ruess ML, Kline J, Santos R, Levin B, Timor-Trisch I. Age and the ovarian follicle pool assessed with transvaginal ultrasonography. Am J Obstet Gynecol. 1996;174:624-7.
- Popovic-Todorovic B, Loft A, Lindhard A, Bangsbøll S, Andersson AM, Andersen AN. A prospective study of predictive factors of ovarian response in standard IVF/ICSI patients treated with recombinant FSH. A suggestion for a recombinant FSH dosage normogram. Hum Reprod. 2003;18(4):781-7.
- 12. Wallace WH, Kelsey TW. Ovarian reserve and reproductive age may be determined from measurement of ovarian volume by transvaginal sonography. Hum Reprod. 2004;19(7):1612-7.
- 13. Tufan E, Elter K, Durmusoglu F. Assessment of reproductive ageing patterns by hormonal and ultrasonographic ovarian reserve tests. Hum Reprod. 2004;19(11):2484-9.
- 14. Haadsma ML, Bukman A, Groen H, Roeloffzen EMA, Groenewoud ER, Heineman MJ, et al. The number of small antral follicles (2-6mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. Hum reprod. 2007;22(7):1925-31.
- Avril C. L'ovocite: avancées fondamentales et thérapeutiques. Peut-on prédire la qualité ovocytaire par L'échographie? J Gynecol Obstet Biol Reprod. 2006;35(2):2542-3.
- 16. Melo MA, Garrido N, Alvarez C, Bellver J, Meseguer M, Pellicer A, et al. Antral follicle count (AFC) can be used in the prediction of ovarian response but cannot predict the oocyte/embryo quality or the in vitro fertilization outcome in an egg donation program. Fertil Steril. 2009;91(1):148-56.
- 17. Hendriks DJ, Kwee J, Mol BWJ, te Velde ER, Broekmans JM. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. Fertil Steril. 2007;87(4):764-75.

- Jayaprakasan K, Hilwah N, Kendall NR, Hopkisson JF, Campbell BK, Johnson IR, et al. Does 3D ultrasound offer any advantage in the pretreatment assessment of ovarian reserve and prediction of outcome after assisted reproduction treatment?. Hum Reprod. 2007;22(7)1932-41.
- Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. Hum Reprod. 2003;18(2):323-7.
- 20. Visser JA, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. Mol Cel Endocrinol. 2005;234:81-6.
- Muttukrishna S., McGarrigle H., Wakim R., Khadum I., Ranieri D. M., Serhal P. Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? BJOG. 2005;112:1384-90.
- 22. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. Hum Reprod Update. 2006;12(6):685-718.
- Pache TD, Wladimiroff JW, De Jong FH, et al. Growth patterns of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle. Fertil Steril. 1990;54:638-642.
- 24. Scheffer GJ, Broekmans FJM, Bancsi LF, Habemma JDF, Looman CWN, te Velde ER. Quantitative transvaginal two and three-dimensional sonography of the ovaries: reproducibility of antral follicle counts. Ultrasound Obstet Gynecol. 2002;20(3):270-5.
- Verhagen TEM, Hendriks DJ, Bancsi LFJMM, Mol BWJ, Broekmans FJM. The accuracy of multivariate model predicting ovarian reserve and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis. Hum Reprod. 2008;14:95-100.

Recebido em: 6/4/2011 Aprovado para publicação em: 18/8/2011

Investigação bacteriológica e micológica de placas de cultivo de embriões em laboratório de reprodução humana

Research bacteriological and mycological culture of plates from embryos in the laboratory of human reproduction

Barbara Rosa Foizer Ribeiro¹, Waldemar Naves do Amaral², Geraldo Sadoyama³



Ms. Barbara Rosa Foizer Ribeiro é professora da saúde na Universidade Salgado de Oliveira, aluna do doutorado em Ciências da Saúde–UFG, sob orientação do Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral, atua em Reprodução Humana, com ênfase em contaminação microbiológica como fator de redução das taxas de fertilização assistida.

Resumo

Introdução: Em laboratórios de Reprodução Humana, o controle de qualidade é de fundamental importância para o sucesso dos procedimentos. A realização correta dos procedimentos influi diretamente nos resultados, principalmente porque a vagina, o líquido folicular e o sêmen não podem ser esterilizados. Um alto grau de higiene, limpeza e o descarte do material deve ser observado para se evitar contaminação nos meios de cultura e equipamentos. Objetivo: Investigar a prevalência de contaminação bacteriológica e micológica nas placas de cultivo de embriões humanos e identificar o micro-organismo em gênero e espécie. Métodos: Foram coletadas 125 amostras de placas de cultivo de embriões humanos, após a transferência para o útero materno, em três laboratórios de reprodução humana na cidade de Goiânia (GO), no período de maio de 2009 a maio de 2010. Os meios de cultivo foram inoculados em caldo BHI e incubados na estufa. As amostras que turvaram (positivaram) foram isoladas e identificadas. Resultados: Foram encontradas 6 amostras contaminadas do total de 125, com prevalência de 4,8% de contaminação. Os micro-organismos encontrados foram bactérias do gênero Escherichia coli (50%), Klebsiella sp. (16,6%), Pseudomonas sp. (16,6%) e uma levedura (16,6%). Conclusão: Embora os meios de cultura apresentem os antibióticos penicilina G ou gentamicina, bastonetes Gram-negativos resistentes foram encontrados. Houve prevalência de 4,8% de contaminação. E. coli foi o bastonete Gram-negativo de maior frequência, encontrado em três amostras, das seis contaminadas. Os micro-organismos encontrados e seus quantitativos foram: E. coli (3), Klebsiella sp. (1), Pseudomonas sp. (1), e levedura (1).

Unitermos: Reprodução humana; Contaminação; Microbiologia; Laboratório; Placas de cultivo; Estruturas embrionárias.

Abstract

Introduction: In human reproduction laboratories, quality control is crucial for the success of procedures. The correct implementation of procedures directly influences the results, especially because the vagina, the follicular fluid and semen can not be sterilized. A high degree of hygiene, cleanliness and disposal of the material must be observed to avoid contamination in the cultural environment and equipment. Objective: To investigate the prevalence of bacterial contamination on plates and mycological culture of human embryos and identify the organism in the genus and species. Methods: 125 samples of culture dishes from human embryos, kept in the greenhouse after embryos transfer to the uteruswere collected at three human reproduction laboratories in Goiânia (GO), from May 2009 to May 2010. The culture media were inoculated in BHI broth and incubated. Samples that clouded (positivist) were isolated and identified. Results: We found six contaminated samples of the total 125, with a prevalence of 4.8% contamination. The microorganisms were bacteria like Escherichia coli (50%), Klebsiella sp (16.6%), Pseudomonas sp (16.6%), and yeast (16.6%).

Endereço para correspondência: Barbara Rosa Foizer Ribeiro, Rua S-5, nº 262, apto. 502, Ed. Arara azul, St. Bela Vista, Goiânia-GO, e-mail: wellingtonbarbara@yahoo.com.br (Barbara Rosa Foizer Ribeiro) Pesquisa financiada pelo IPTSP da UFG, com fornecimento do material de coleta e reagentes de identificação microbiológica.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina e no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG) – Goiânia (GO), Brasil.

¹Pós-Graduanda (Doutorado) em Ciências da Saúde da UFG; Professora da Universidade Salgado de Oliveira, campus Goiânia – Goiânia (GO), Brasil.

² Pós-Graduado (Doutor) em Doenças Infecciosas e Parasitárias pelo IPTSP; Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da UFG; Diretor Técnico da Fértile Diagnósticos e Presidente da Sociedade Brasileira de Reprodução Humana (SBRH).

³ Pós-Graduado (Doutor) em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU); Professor Adjunto da UFG – Goiânia (GO), Brasil.

Conclusion: Although the culture media provide the antibiotics penicillin G and gentamicin resistant gram negative rods were found. The *E. coli Gram*-negative rod was more frequently found in three samples of the six contaminated. The microorganisms and their quantity were *E. coli* (3), *Klebsiella sp* (1), *Pseudomonas sp* (1), *and Yeast* (1).

Keywords: Human reproduction; Contamination; Microbiology; Laboratory; Culture dishes; Embryos structures.

Introdução

O decréscimo da fertilidade, com o passar do tempo, é um inevitável fato biológico, aliado à maternidade tardia. A técnica de fertilização *in vitro* (FIV) avançou nessas últimas três décadas para ajudar os casais a resolverem o problema da infertilidade. Relatos históricos trazem o bebê Louise Brown como o primeiro a nascer de FIV, na Inglaterra, no ano 1978. Na FIV, os embriões são formados e cultivados fora do corpo da mãe, em placas de cultivo, graças ao avanço dos meios de cultura, que oferecem os nutrientes necessários para o bom desenvolvimento dos embriões, cultivados em laboratório de reprodução humana¹.

Em laboratórios de reprodução humana, o controle de qualidade é de fundamental importância para o sucesso dos procedimentos. A realização correta dos procedimentos influi diretamente nos resultados, principalmente porque a vagina, o líquido folicular e o sêmen não podem ser esterilizados. Um alto grau de higiene e de limpeza e o descarte do material devem ser observados para se evitar contaminação nos meios de cultura e nos equipamentos.

Cada passo nos procedimentos e manipulações laboratoriais devem ser executados com técnicas de assepsia rigorosas². A exata frequência dessas contaminações microbiológicas não é conhecida. Há um número limitado de publicações e descrições de casos sobre esse assunto³. Desde 1997, contaminações microbiológicas em meios de cultura têm sido rotineiramente registrados para contribuir na melhora da qualidade do sistema de manejo em reprodução humana, o que compromete diretamente os resultados gestacionais em fertilização assistida. Bactericidas e fungicidas vêm sendo incorporados aos meios de cultura, à medida que aumenta a resistência dos micro-organismos⁴. As principais causas dessa contaminação vêm sendo associadas à infecção do trato genital masculino e feminino e, consequente, contaminação dos ovócitos e embriões. Também pode vir da contaminação do ar, de maquinários e materiais utilizados, como as placas de cultivo.

No entanto, nem vagina e nem um ejaculado podem ser considerados como ambientes estéreis⁵. Portanto, muito cuidado deve ser tomado para se minimizarem os riscos de transferência de micro-organismos durante a realização de procedimentos clínicos ou laboratoriais. Durante a coleta de ovócitos, há estudos de aparecimento de células vaginais no fluído folicular, correndo o risco de contaminar a pelve materna e os embriões⁶. A maioria dos laboratórios de reprodução humana utiliza meios de cultura

contendo antibióticos para minimizar os riscos de crescimento microbiano. Os meios de cultivo utilizados nos laboratórios de reprodução foram o IVF + 5% de albumina, que apresenta penicilina G como antibiótico, e o HTF (sigla do inglês Human Tubal Fluid, Irvine Scientific), que apresenta gentamicina como antibiótico. Esses meios devem ser usados depois de equilibrada a atmosfera em 37°C e 5% de CO₂. Não obstante, ocasionalmente, os micro-organismos colonizam placas de cultivo de oócitos e embriões. A frequência exata dessas contaminações ou infecções microbianas é desconhecida. O próprio número limitado de publicações e relatórios de como lidar com esse assunto^{4,7,8} poderia sugerir que as infecções nas placas de cultivo apresentam um risco insignificante. Foram relatadas placas com a contaminação de levedura, no total de 729 ciclos, com prevalência de 0,69%, e outros seis casos de relatos3, nos quais a contaminação microbiológica da cultura de embriões foi observada após 1.691 coletas de ovócitos, com prevalência de 0,35%. Extrapolando essa frequência para o número de ciclos de FIV realizados na Europa, os resultados9 indicaram que muitas centenas de placas de cultivo de embriões contaminadas, provenientes de FIV, ocorrem a cada ano. Ao longo de um período de 8 anos, 95 infecções em placas de cultivo in vitro foram observadas após coleta de 13.977 amostras envolvendo placas e sêmens, com prevalência de 0,68%⁵. Técnicas diferentes em reprodução assitida possuem índice de contaminação diferentes. Na injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), a taxa de contaminação foi desprezível, mas, na FIV, o índice de contaminação aumenta⁵.

A primeira consequência que se deve observar está na redução da formação de embriões viáveis para transferência. Os embriões podem não sobreviver nas primeiras clivagens, apresentar teratogenia, ou simplesmente não conseguirem implantar no útero. Também pode haver síndromes e comprometimento da saúde do feto, trazendo a possibilidade de aumento de natimortos, prematuridade, nascimento de conceptos pequenos e defeituosos – fatos descritos em estudos bovinos nos quais a fertilização assistiva é amplamente utilizada¹⁰.

Em outra vertente, traz o risco de contaminar e infectar o organismo da mãe, com lesão temporária ou definitiva para a mesma. É por isso que procedimentos no controle de qualidade devem ser sempre acrescentados para minimizar os riscos, já que a contaminação pode ser vertical (dos progenitores para o embrião), ou lateral (de uma mulher para outra, durante as intervenções cirúrgicas de coleta de ovócitos e de transferência, por exemplo)⁶.

Como não há estudos longitudinais sobre doenças que acometem indivíduos concebidos por fertilização assistida em qualquer fase da vida ligadas à provável contaminação na fase embriológica, torna-se difícil a atribuição da causa "contaminação" à consequência "doença". A qualidade dos embriões precisa ser preservada, e mesmo que a contaminação ainda não possa ser corroborada por estudos em humanos, há evidência de infecção gestacional que prejudica o aparelho reprodutivo e provoca má formação no feto, em animais¹⁰.

O entendimento sobre as possíveis contaminações, endógenas e exógenas, de gametas e embriões e seus maus resultados reprodutivos, traz à luz a necessidade do rastreamento e controle dos agentes infecciosos dentro do laboratório de reprodução humana. A identificação microbiológica se faz necessária, uma vez que são fornecidos dados que comprovem essa contaminação, o que vai nortear as mudanças necessárias nos guias de procedimentos laboratoriais e ambulatoriais, também nos meios de cultivo de embriões, para que haja proteção materno-fetal^{7,9}.

Neste estudo, analisou-se a prevalência da contaminação microbiológica por bactérias e fungos, em placas de cultivo de embriões humanos, e as contaminações encontradas foram isoladas e identificadas. Essas placas de cultivo dos embriões representam o melhor local de coleta para verificar se há contaminação microbiológica eminente, por que para ela confluem os vários fatores prováveis de contaminação, que interfere diretamente nas taxas de gestação.

Métodos

14

Essa pesquisa de corte transversal realizou-se de forma qualitativa, com abordagem descritiva sobre a presença e o tipo de micro-organismo em materias em que foi constatada contaminação, e também quantitativa, com índices de prevalência. Houve coleta do meio de cultura após a transferência dos embriões para o útero em três laboratórios de reprodução humana em Goiânia (GO). Os locais foram escolhidos por se tratarem de instituições privadas e pública - três instituições ativas em Goiânia. Embriões foram cultivados em meio de cultura HTF ou IVF (meio de cultivo de embriões, Vitrolife), contendo penicilina ou gentamicina de antibiótico. As placas foram preparadas com gotas periféricas de IVF, com albumina a 5%, e cobertas com óleo mineral (sigma), mas houve também o cultivo de embriões em placas que utilizam o modo "poças", com IVF ou HTF (Figura 1). Independente da suspeita de contaminação, todas as placas guardadas na incubadora dos laboratórios de reprodução foram utilizadas como amostra para esse estudo.

O projeto foi aprovado no comitê de ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG). A coleta do material de estudo foi realizada no decorrer do ano de 2009 e

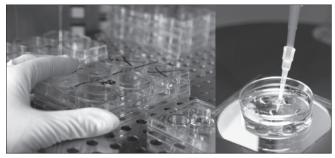


Figura 1 - Placas de cultivo de embriões. Modo: "poças" à esquerda e modo "microgotas", à direita.

no primeiro semestre de 2010, nas dependências das instituições citadas, de acordo com a disponibilidade do descarte de placas de embriões, e levadas ao laboratório de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG, onde se analisou primeiramente a presença de contaminação e, posteriormente, a identificação dos micro-organismos das amostras. Para analisar a presença de contaminação, foi utilizado o meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion). Para garantir a esterilidade dos caldos BHI, estes foram preparados nos tubos de ensaio e autoclavados em seguida. Os meios foram mantidos em geladeira e colocados na estufa 24 horas antes da utilização. Se estivessem contaminados, turvariam nesse período dentro da estufa. Depois de garantida a esterilização, as amostras foram coletadas no próprio ambiente dos laboratórios de reprodução humana. Cada coleta foi realizada utilizando a câmara de fluxo laminar ou a pressão positiva do laboratório, evitando a contaminação externa. O meio de cultivo foi retirado das placas com pipetas estéreis, também autoclavadas e embaladas isoladamente, e inoculado nesses tubos contendo 5 mL de caldo BHI e incubados por 24/48 horas a 37°C, na estufa do laboratório de microbiologia do IPTSP-UFG. Foi retirado todo o meio de cultura disponível, tanto nas placas contendo microgotas, quanto nas placas contendo "poças". As amostras que positivaram no caldo BHI, foram posteriormente subcultivadas em Agar Nutriente (verificar crescimento de fungos), Agar Manitol Salgado (verificar crescimento de Staphylococcus e Bacillus) e Agar MacConkey (verificar o crescimento de bactérias Gram-negativas). As amostras isoladas foram identificadas por meio da caracterização morfotintorial (azul de lactofenol – fungos e coloração de Gram-bactérias). Para os cocos Gram-positivos foram realizado os testes de produção de catalase e coagulase. Para os bacilos Gram-negativos foram realizados vários testes bioquímicos de identificação metabólica bacteriana.

Testes bioquímicos

Os testes bioquímicos baseiam-se na presença ou ausência de substâncias, sejam elas enzimas ou produtos do metabolismo bacteriano, sendo identificadas por métodos químicos, como

indicadores de pH e mudança de coloração. Uma sequência de testes bioquímicos foi realizada em metodologia semelhante à citada por Koneman¹¹.

As amostras contaminadas foram coradas com método *Gram* e em seguida, separadas e subcultivadas no meios MacConkey, ágar manitol salgado e ágar nutriente.

Na amostra contaminada por Klebsiella, houve crescimento no MacConkey, indicando a presença de bastonetes Gramnegativos. Passou-se para o TAF (tríplice açúcar e ferro) com o indicador de pH vermelho de fenol, que fermentou apenas a glicose. Na leitura, o TAF apresentou inclinação alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo). Não houve degradação de sacarose, lactose e manitol. A produção de gás CO2 pela fermentação, no ambiente anaeróbio inferior do tubo do TAF, foi elevada. No meio SIM (motilidade, indol e enxofre), para detecção da produção do indol (um produto de degradação do aminoácido triptofano), não apareceu a cor vermelha na parte superior do tubo, indicando que não houve a produção de indol, e não foi detectada a motilidade bacteriana (para motilidade com a presença de flagelos, o meio contendo tetrazólio induz o aparecimento de rastros de cor vermelha, que ajuda a seguir a disseminação da bactéria a partir da linha de inoculação, em uma análise macroscópica), nem a produção de ácido sulfídrico (enxofre é liberado a partir da degradação de aminoácidos, com produção de precipitado negro, sulfeto de metal pesado insolúvel) como corpo de fundo no tubo. O teste foi realizado com o indicador de pH vermelho de metila, e o resultado foi negativo, já que não houve mudança de cor, pois a quantidade mínima de ácidos produzidos foi insuficiente para reduzir o pH, característico da família Enterobacteriaceae. No meio para citrato, que determina a capacidade de utilização do citrato de sódio como única fonte de carbono metabólico, ocorreu a produção de uma cor azul no meio, indicando resultado positivo, com presença de produtos alcalinos. No meio para fenilalanina, o aparecimento do ácido fenilpirúvico indica a degradação da fenilalanina pela enzima fenilalanina desaminase, que foi negativo. Caso fosse positivo, surgiria uma cor verde após a adição do reativo cloreto férrico. No meio ágar ureia de Christensen para urease, a mudança de cor de rosa para vermelho indica a positividade. A superfície inclinada torna-se vermelha, em uma reação alcalina, indicando que o micro-organismo hidrolisa a ureia, liberando amônia e produzindo mudança de cor vermelho rosado no meio.

Na amostra contaminada por pseudomonas, houve crescimento no MacConkey. Passou-se para o TAF com o indicador de pH vermelho de fenol, no qual não houve fermentação de glicose, de sacarose, de lactose e de manitol. A cor vermelha de inclinação alcalina permaneceu inalterada. No meio SIM, não houve motilidade, nem produção de indol e de ácido sulfídrico. No teste para urease, não houve mudança de cor, sendo negativo.

Positivo para citrato, com a produção de substâncias alcalina e coloração azulada no teste.

Nas amostras contaminadas por *E. coli*, houve crescimento no MacConkey. A leitura do TAF revelou fermentação para glicose, sacarose, lactose e manitol, com mudança de cor de vermelho para amarelo. Houve produção de gás. Positivo para vermelho de metila. No meio SIM, positivo para motilidade, para produção de indol e negativo para produção de ácido sulfídrico. Não houve hidrolização da ureia, sendo negativo para ureia. Não houve a utilização do citrato de sódio como fonte de carbono, sem mudança de cor, de caráter negativo. Negativo para degradação da fenilalanina.

Na amostra contaminada por leveduras, houve crescimento no ágar nutriente com antibióticos, e, no *Gram*, foi observada a presença de células eucariontes, bastante coradas, unicelulares.

As amostras que apareceram com *Bacillus Gram*-positivos cresceram no meio manitol. No método *Gram*, todas apresentavam coloração roxa e organizavam-se sob a forma de estreptobacilos, sem importância médica.

Realizou-se uma análise da prevalência, dos achados identificados e testes comparativos com os estudos de Kastrop, do ano de 2007.

Resultado

Foram coletadas 125 amostras no período de maio de 2009 a maio de 2010, das quais 6 apresentaram contaminação, resultando em uma prevalência de 4,8%. Foi achada contaminação tanto para a técnica FIV, quanto para ICSI. Nos laboratórios um e três, cada procedimento incluiu tanto FIV quanto ICSI, e no laboratório dois, apenas ICSI foi realizada. A identificação dos micro-organismos mostrou que a principal contaminação foi por E. coli, presente na microbiota humana. Uma contaminação foi causada por uma levedura, provavelmente do gênero Candida, muito comum na microbiota genital. O quantitativo encontrado foi de quatro bactérias, sendo três da família Enterobacteriaceae da microbiota intestinal humana (E. coli e Klebsiella) e um bastonete Gram-negativo não fermentador (Pseudomonas), uma bactéria ambiental e muito encontrada em infecções hospitalares. Todas as contaminações bacterianas são de bastonetes Gram-negativos, como mostra a Tabela 1. Os micro-organismos de maior prevalência, segundo os resultados, foram E. coli para bactérias e o gênero Candida, um tipo de levedura, para fungos. Essas bactérias apresentam resistência à penicilina G e gentamicina, antibióticos presentes nos meios de cultura IVF e HTF, respectivamente.

Foram encontradas contaminações por *bacillus Gram*-positivos nos três laboratórios, grandes bacilos típicos de contaminação do ar, motivo pelo qual foram retiradas dos dados de prevalência. Esses bacilos normalmente não são identificados com testes bioquímicos e são indicadores da qualidade do ar. Como foram

encontrados em amostras dos três laboratórios, levantou-se a hipótese de contaminação cruzada entre os laboratórios, inclusive o de microbiologia IPTSP-UFG, onde acontecia a manipulação e posterior incubação dos caldos BHI nas estufas, para crescimento, caso houvesse contaminação. Essas amostras foram descartadas.

A maior frequência dos micro-organismos encontrados foi da *E. coli*, no laboratório um. A maior variação de micro-organismos foi encontrada no laboratório dois. A distribuição percentual isolada de cada micro-organismo encontrado é apresentada na Tabela 2.

Analisando a taxa de contaminação, em proporção ao número de amostras por laboratório, encontramos as porcentagens na Tabela 3.

Discussão

16

Semelhantemente aos trabalhos anteriores, foi encontrada contaminação nas placas de cultivo de embriões humanos, em laboratórios de reprodução humana. Com a legislação vigente de implementação de uma gestão de qualidade, todo caso de contaminação deve ser considerado um evento adverso, que não só deve ser registrado, a fim de corroborar tendências, mas também analisado a fim de maximizar a possibilidade de tomar medidas ativas, com o objetivo de evitar a transferência, tanto da contaminação microbiológica dos espermatozoides para o ovócito, quanto dos embriões contaminados para o útero. Foi evidenciado⁵ que, nos casos em que as placas de cultivo estavam contaminadas por bactérias, a qualidade dos embriões em desenvolvimento era pobre. Embriões ruins, de classificação R (Figura 2), apresentam clivagem desequilibrada, com muitos blastômeros de tamanhos desiguais, alta fragmentação e resíduos¹².

Os micro-organismos de maior prevalência foram *E. coli* e levedura, , sendo os mesmos exemplares resultados de estudos na Europa⁵, que coletou amostras no período de 1997 a 2004. Penicilina G ainda é utilizada no meio IVF, mas no meio HTF houve substituição por gentamicina, a partir de 2005e, desde então, a colonização de placas de cultivo foi observada somente por *Candida*; dados considerados inéditos para Kastrop et al.⁵, mas fora de seu período de coleta de dados. No entanto, é conhecida a alta frequência de adaptação e resistência, adquirida por bactérias em um curto período de tempo. Os antibióticos penicilina G ou gentamicina, utilizados nos meios de cultivo de embriões, foram insuficientes para conter a proliferação bacteriana neste estudo.

Diferentemente dos trabalhos de Kastrop et al.⁵, que utilizaram sêmen como parte da amostragem, a técnica ICSI não foi encontrada como um fator de proteção contra a contaminação. Nessa técnica, a injeção de um único espermatozoide no ovócito M2 (maduro para fertilização), ao contrário da FIV (colocado

Tabela 1 - Distribuição dos micro-organismos isolados dos meios de cultura em Goiânia (GO), 2009/2010

Micro-organismos	Laboratório 1 (n=25)	Laboratório 2 (n=80)	Laboratório 3 (n=20)
Escherichia coli	2	_	1
Klebsiella sp.	_	1	_
Pseudomonas sp.	_	1	_
Leveduras	_	1	_

N: número de amostras disponibilizadas em cada laboratório.

Tabela 2 - Distribuição dos casos da pesquisa microbiológica, realizadas em laboratórios de reprodução humana, Goiânia (GO), 2009/2010, segundo os micro-organismos identificados

Microrganismo isolado	Número de amostras	%
Escherischia coli	3	50,0
Klebsiella sp.	1	16,6
Pseudomonas sp.	1	16,6
Leveduras	1	16,6
Total	6	100

Tabela 3 - Porcentagem de contaminação em proporção ao número de amostras de cada laboratório de reprodução humana, Goiânia (GO)

Laboratório	Número de amostras	Número de amos- tras contaminadas	% de contami- nação
1	25	2	8,00
2	80	3	3,75
3	20	1	5,00

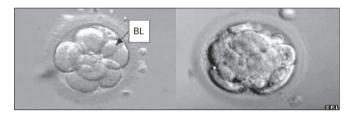


Figura 2 - Comparação entre embriões humanos saudáveis (à esquerda) e embriões ruins de classificacão R¹².

uma gota de sêmen capacitado sobre o ovócito), poderia reduzir a contaminação proveniente do sêmen, o que não interfere em outras prováveis causas de contaminação. Essa capacitação (técnica de *swim-up*) separa os espermatozoides classe A e B da parte líquida do sêmen, fonte potencial de micro-organismos. Em estudos da contaminação do sêmen⁴, 46 amostras do total de 150 foram encontradas contaminadas, e foram detectadas nas lavagens da agulha após a coleta de ovócitos amostras de sêmen, nos fluidos foliculares e em placas de incubação para FIV. O uso de penicilina e estreptomicina foi eficaz na contenção da contaminação, em 1996. Após o processamento seminal em meio de cultura, rico em antibióticos, a taxa de contaminação reduzia para 5% (8 contaminadas em 120 amostras)⁴. Neste estudo, utilizaram-se apenas as placas de cultivo de embriões, já que possíveis contaminações do sêmen poderiam ser percebidas e

identificas, também por meio das placas. As placas de cultivo são o local de maior problemática de contaminação, já que interferem diretamente no embrião, em suas primeiras clivagens.

As amostras contaminadas por grandes bacilos *Gram*-positivos, normalmente presentes no ar, no solo e na água, indicam contaminação ambiental, com ausência de espécies de importância médica. Como foram encontrados nos três laboratórios (uma amostra em cada), levantou-se a hipótese de contaminação cruzada entre os laboratórios, inclusive com o de microbiologia IPTSP-UFG, onde acontecia a manipulação dos meios, posterior incubação dos caldos BHI nas estufas, para crescimento, e identificação, caso houvesse contaminação. Como não houve formas de descartar essa hipótese de contaminação cruzada, as amostras foram retiradas do total. Não houve nenhum trabalho que apresentasse bacilos *Gram*-positivos associados à infecção humana.

Para a espécie de levedura encontrada neste trabalho, tem-se o relato⁸ de que a *Candida albicans* não afetou parâmetros espermáticos, mas aumentou a fragmentação do DNA e apoptose, danos que podem ter causado fracasso após a fertilização no tratamento de reprodução assistida. Fungos normalmente são de crescimento mais lento quando comparados a bactérias. Eles aparecem nas placas de cultivo de embriões com 2 a 3 dias, até mesmo após a transferência, e, por isso, muitas vezes não são detectados. Em outro estudo¹³ constata-se que, de 240 amostras do ar de ambientes hospitalares, 80 foram isoladas fungos, dentre os quais, 41 eram leveduras (do gênero *Candida*). *C. albicans* é um fungo muito encontrado na microbiota genital feminino e masculino.

Foram identificados os mesmos gêneros de micro-organismos encontrados nos estudos de Kastrop et al.⁵ (com prevalência de 0,68% de contaminação) (Tabela 4).

Em estudos comparativos que testam a diferença entre o resultado deste estudo e o de Kastrop et al⁵, apresentou-se uma prevalência microbiológica sete vezes maior do que o mesmo, com intervalo de confiança de 95%. Foi utilizada como teste

Tabela 4 - Comparação da distribuição dos micro-organismos isolados e identificados, neste estudo, Goiânia (GO), 2009/2010, e nos de Kastrop, Graaf-Miltenburg, Gutknecht e Weima^s.

Estudo atual - Goiânia (2009-2010)	n°*	%	Kastrop, Graaf-Milten- burg, Gutknecht e Weima ⁵	nº*	%
Escherichia coli	50	3	Candida species	24	25,3
Klebsiella sp.	16	1	Escherichia coli	56	58,9
Pseudomonas sp.	16	1	Stenotrophomonas maltophilia	4	4,2
Leveduras	16	1	Agrobacterium species	3	3,2
-			Pseudomonas species	3	3,2
-			Klebsiella pneumoniae	2	2,1
-			Citrobacter koseri	1	1,1
-			Ochromobacter anthropi	1	1,1
-			Aspergillus terreus	1	1,1

^{*}Número de amostras contaminadas com cada tipo de micro-organismo.

estatístico uma análise de risco de incidência (*risk-ratio*), devido ao número baixo de amostras contaminadas.

A qualidade do ar nos laboratórios de FIV deve estar em constante e rigorosa vigilância, para manutenção do controle de qualidade e segurança exigidos e citados12. Essa contaminação poderia comprometer irreversivelmente a qualidade dos embriões, que são de alta sensibilidade, e diminuir suas taxas de implantação e gestação, com nascimento a termo. Durante as etapas de fertilização, há risco de contaminação, seja ele na coleta de ovócitos, com a microbiota vaginal, o sangue e urina da mãe no trato genital feminino, ou com o cateter introduzido na cavidade abdominal, com o sêmen e até mesmo com o material. maquinários e comprometimento do ar, nos laboratórios⁵. Todos esses dados de resistência bacteriana à penicilina e gentamicina sugerem mudanças nos protocolos de fabricação dos meios de cultivo de embriões humanos, e até mesmo adaptando o tipo antimicrobiano usado a um estudo de necessidades para as diferentes localidades onde se pratica a FIV. No entanto é necessário um estudo que quantifique o grau de sensibilidade/resistência a vários antibióticos, das bactérias encontradas e também que determine a toxicidade desses antibióticos para os embriões, avaliando vantagens e desvantagens.

Mesmo sendo um estudo de corte transversal com pouca literatura revisada sobre a identificação das causas de contaminação, e com um número limitado de amostras devido ao tempo reduzido da coleta de um ano, este estudo comprovou que a contaminação microbiológica existe, tendo sido encontrada em todos os três laboratórios de reprodução e devendo ser ser considerada como fator de contribuição dos fracassos em reprodução assistida. O pequeno número de estudos sobre contaminação em laboratórios de reprodução e sua relação com a fertilidade devem ser um fator estimulante para estudos posteriores.

Houve uma prevalência de 4,8% de contaminação, sendo os micro-organismos encontrados e seu quantitativo por amostra: *E. coli* (3), *Klebsiella* sp. (1), *Pseudomonas* sp. (1) e levedura (1).

Agradecimentos

Agradeço aos professores do IPTSP-UFG: Leda, Ms. Lara Stefânia Netto de Oliveira e Doutor José Daniel Gonçalves Pereira. Agradeço aos laboratórios de Reprodução Humana de Goiânia, Doutor Mário Aprobatto, Tatiana Moreira da Silva e Mônica Canêdo Silva Maia do Hospital das Clínicas, Dr. Eduardo , Dr. Rodopiano de Sousa Florêncio, Dra. Jane Porfírio Rocha da clínica Humana à Doutora Zelma Bernardes Costa, Lilian de Fátima Filetti Gomes, Jucyara do Valle Lima daClínica Fértile Diagnósticos. Agradeço aos participantes das bancas examinadoras. Agradeço a Deus esta oportunidade, a Ele toda glória e honra.

Referências bibliográficas

- Samrsla M, Nunes JC, Kalume C, Cunha ACR, Garrafa V. Expectativa de mulheres à espera de reprodução assistida em hospital público do DF – estudo bioético. Rev Assoc Med Bras. 2007;53(1):47-52
- 2. Elder K, Baker D, Ribes J. Infections, infertility and assisted reproduction. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2005.
- 3. Cottell E, McMorrow J, Lennon B, Fawsy M, Cafferkey M, Harrison RF. Microbial contamination in an in vitro fertilization-embryo transfer system. Fertil Steril. 1996;66(5):776-80.
- Cottell E, Lennon B, McMorrow J, Barry-Kinsella C, Harrison RF. Processing of semen in an antibiotic-rich medium to minimize microbial presence during in vitro fertilization. Fertil Steril. 1997;67(1):98-103.
- 5. Kastrop PMM, Graaf-Miltenburg LAM, Gutknecht DR, Weima SM. Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. Hum Reprod. 2007;22(8):2243-8.
- Teixeira RF, Guimarães JKL. Detecção de células escamosas vaginais no aspirado de fluido folicular durante fertilização in vitro. Reprod Clim. 1996;11(4):203-6.
- Ben-Chetrit A, Shen O, Haran E, Brooks B, Geva-Eldar T, Margalioth EJ. Transfer of embryos from yeast-colonized dishes. Fertil Steril. 1996;66(2):335-7.

- 8. Burrello N, Calogero AE, Perdichizzi A, Salmeri M, D'Agata R, Vicari E. Inhibition of oocyte fertilization by assisted reproductive techniques and increased sperm DNA fragmentation in the presence of Candida albicans a case report. RBM Online. 2004;8(5):569-73.
- 9. Andersen AN, Goossens V, Gianaroli L, Felberbaum R, De Mouzon J, Nygren KG. Assisted reproductive technology in Europe, 2003: Results generated from European registers by ESHRE. Hum Reprod. 2007;22(6);1513-25.
- Junqueira JRC, Alfieri AA. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. Semina Ci Agr. 2006;27:289-98.
- 11. Koneman EW et al. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- Amaral WN, Dzik A, Pereira DHM, Cavagna M. editores. Tratado de Reprodução Assistida. São Paulo: SBRH, 2010. p. 295-316.
- 13. Cordero R, Pérez ALG, González RTB, Armada JG, Hernandez NR. Comportamiento de la infección nosocomial en las unidades de terapia en un período de 5 años. Rev Cuba Hig Epidemiol. 2002;40(2):79-88.

Recebido em: 19/1/2010 Aprovado para publicação em: 18/8/2011

Efeitos das isoflavonas da soja sobre o tecido ósseo de ratas

Effects of soy isoflavones on bone tissue of rats

Miriam Aparecida dos Santos¹, Rinaldo Florêncio da Silva¹, Manuel de Jesus Simões², Rejane Daniele Reginato³



Miriam Aparecida dos Santos é Graduada em Biomedicina pela Universidade de Santo Amaro (Unisa). Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Aluna de Doutorado em Ciências da Saúde pela Unifesp. Tem experiência na área de Morfologia com ênfase nos seguintes temas: reprodutor feminino e hormônios sexuais.

Resumo

Introdução: É sabido que as isoflavonas da soja exercem efeitos positivos contra a perda de massa óssea após a menopausa. No entanto, os efeitos de diferentes doses de isoflavonas e sua associação com o 17β-estradiol no tecido ósseo não são bem conhecidos. Objetivo: Nesse estudo, foram investigados os efeitos de diferentes doses de isoflavonas da soja e sua associação com o 17β-estradiol no tecido ósseo de ratas osteopênicas. Métodos: 50 ratas Wistar adultas foram ooforectomizadas e, após 90 dias, divididas em 5 grupos (10 ratas em cada): GI – grupo controle; GII, GIII e GIV – tratados diariamente com isoflavonas da soja por gavage nas doses de 80 mg, 200 mg e 350 mg/kg, respectivamente; GV – tratado com 350 mg/kg de isoflavonas da soja associadas ao 17β-estradiol (10 μg/kg/via subcutânea, diariamente). Após 90 dias, os fêmures e tíbias foram coletados, e seus comprimentos e espessuras foram medidos. Os fêmures distais foram processados para histomorfometria e as tíbias foram congeladas e, posteriormente, submetidas a testes físicos e biomecânicos. Resultados: Durante o período de tratamento, foi observada perda de peso no grupo submetido ao tratamento combinado. O comprimento dos fêmures e a espessura das tíbias foram maiores no grupo submetido ao tratamento combinado promoveu maior área óssea trabecular e espessura do osso cortical. A densidade óssea e a capacidade das tíbias de receber carga foram maiores no grupo submetido ao tratamento combinado. Conclusão: Dessa forma, este estudo demonstrou que as isoflavonas da soja têm efeito positivo no tecido ósseo de ratas osteopênicas e sua associação com 17β-estradiol potencializa esse efeito.

Unitermos: Isoflavonas; Tecido ósseo; Estrogênios; Ratos.

Abstract

Introduction: It has been shown that soy isoflavones counteract postmenopausal bone loss. However, the effects of different doses and its treatment combined with 17β-estradiol on bone tissue are not well-known. Objective: In this study we investigated the effects of different doses of soy isoflavones and their association with 17β-estradiol on bone tissue of osteopenic rats. Methods: 50 adult Wistar rats were ovariectomized and after 90 days divided in 5 groups (10 rats in each): GI – control; GII, GIII and GIV – treated orally with soy isoflavones at the doses of 80 mg, 200 mg and 350 mg/kg/bodyweight/daily respectively; GV – soy isoflavones (350 mg/orally) + 17β-estradiol (10 μg/kg/body weight/subcutaneously, daily). After 90 days, the femurs and tibias were collected and its length and thickness were measured the distal femurs were processed for histomorphometry; the tibias were frozen and submitted to biomechanical tests. Results: During the period of treatment, loss of body weight in the group subjected to the combined treatment was observed. The femur length and the thickness of the tibias were higher in the combined treated group as well as

Trabalho realizado no Departamento de Morfologia da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) – São Paulo (SP), Brasil.

¹ Pós-graduandos (Mestrado) em Ciências da Saúde do Departamento de Morfologia e Genética da Escola Paulista de Medicina da Unifesp — São Paulo (SP), Brasil.

² Professor Associado e Livre-Docente do Departamento de Morfologia da Escola Paulista de Medicina da Unifesp – São Paulo (SP), Brasil.

³ Professora Adjunta e Docente do Departamento de Morfologia da Escola Paulista de Medicina da Unifesp – São Paulo (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Miriam Aparecida Dos Santos – Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural – Rua Botucatu, 740 – CEP 04023-009 – São Paulo (SP), Brasil – E-mail: miriam. santos@unifeso br

higher trabecular bone area and cortical thickness. Bone density and the capacity of the tibias to receive load were higher in the combined treated group. **Conclusion**: This study demonstrated that soy isoflavones has positive effects on bone tissue of osteopenic rats and it is potencialized when combined with 17β-estradiol.

Keywords: Isoflavones; Bone tissue; Estrogens; Rats.

Introdução

O osso é um tecido que se renova constantemente ao longo da vida e sua integridade depende do equilíbrio entre processos anabólicos (aposição) e catabólicos (reabsorção); a perda desse equilíbrio pode levar a alterações na matriz e mineralização óssea¹. A remodelação óssea é um processo contínuo entre a reabsorção do osso pelos osteoclastos e a formação e mineralização da matriz po meio dos osteoblastos. Interações entre as células ósseas e proteínas da matriz são essenciais no controle da massa óssea².³.

Uma série de condições como mobilidade, idade, estado hormonal e ação de algumas drogas podem alterar esse equilíbrio entre formação e reabsorção, levando a alterações metabólicas e ou mecânicas, como a osteoporose⁴.

A osteoporose é uma desordem esquelética sistêmica progressiva que afeta principalmente mulheres na pós-menopausa e é caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração de sua microarquitetura, levando a aumento de fragilidade e consequente aumento do risco de fraturas^{5,6}. Considerado um grave problema de Saúde Publica, a osteoporose atinge grande parte da população acima de 50 anos de idade^{7,8}. A cessação da função ovariana e mais particularmente a deficiência estrogênica é considerada a maior causa de osteoporose na pósmenopausa⁹.

A terapia de reposição hormonal quando iniciada no período de transição do climatério, é efetiva na redução ou reversão da perda óssea que ocorre na pós-menopausa^{10,11} e no alívio de outros sintomas do climatério¹². Por outro lado, estudos realizados em 2002 pelo *Women's Health Initiative Study* revelaram os efeitos adversos da terapia estrogênica, incluindo doenças cardiovasculares e câncer de mama, apesar de seu efeito benéfico sobre o osso⁶. Diversas investigações científicas têm voltado seu interesse em alternativas farmacêuticas naturais que possam apresentar os efeitos benéficos do estrogênio sobre o osso, funções cognitivas e sintomas da menopausa sem promover os efeitos adversos da TRH sobre a mama, o útero e o sistema cardiovascular¹³.

Nesse sentido, as isoflavonas, compostos químicos fenólicos, pertencentes à classe dos fitoestrogênios, que estão amplamente distribuídos no reino vegetal, têm sido a terapia natural mais

20

estudada, principalmente devido aos potenciais benefícios que uma dieta rica nesses compostos pode conferir no controle de muitas doenças crônicas. Essas substâncias se comportam como estrogênios na maioria dos sistemas biológicos, além de serem os mais abundantes dentre os fitoestrogênios, possuem diversas propriedades biológicas (atividade antioxidante, inibição da atividade enzimática, entre outras) que podem influenciar muitos processos bioquímicos e fisiológicos¹⁴.

Estudos epidemiológicos têm sugerido que a incidência de osteoporose pós-menopausa é menor na Ásia que no Ocidente. Uma das possíveis explicações para essa diferença baseia-se na elevada ingestão de produtos da soja, ricos em isoflavonas, pelas mulheres asiáticas¹⁵. Estudos têm demonstrado que o extrato de soja inibe a perda óssea em mulheres menopausadas^{16,17}. Nesse sentido, estudo experimental em ratas mostrou que o extrato de soja aumenta a densidade mineral óssea (DMO) e melhora a microarquitetura do osso trabecular na tíbia de ratas^{18,19}, além de observar que o tratamento com extrato de soja suprimiu a perda óssea induzida pela ooforectomia e esse efeito foi dose dependente.

Objetivo

Este trabalho teve por objetivo avaliar a ação de diferentes doses do extrato de soja no tecido ósseo de ratas ooforectomizadas.

Métodos

O projeto de pesquisa foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) sob o número 0702/09.

Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus albinus*) adultas, virgens, com 6 meses, pesando aproximadamente 310 g, fornecidas pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais em Medicina e Biologia (CEDEME) da Unifesp.

Os animais foram transportados para o biotério e mantidos à temperatura de 22°C, com iluminação artificial, sendo o ciclo claro-escuro constante e o período de luz das 7 às 19 horas. Durante todo o período do experimento, os animais receberam alimentação Nuvilab CR1 (Paraná, Brasil) – composição

por quilograma da ração: cálcio de 1 a 1,2%, fósforo de 0,78 a 0,90%, zinco aproximadamente 60 mg, vitamina D3 1.800,00 UI e água *ad libitum*.

Após 7 dias de adaptação, todos os animais foram submetidos à ooforectomia bilateral, com a finalidade de induzir os animais a um anestro.

Após 3 meses da ooforectomia, 50 ratas foram divididas, aleatoriamente, em 5 grupos, contendo 10 animais cada: Grupo I – animais tratados diariamente com propilenoglicol (0,2 mL); Grupo II – animais que receberam extrato concentrado de soja (80 mg/kg, por dia), durante 90 dias; Grupo III – animais que receberam extrato concentrado de soja (200 mg/kg, por dia), durante 90 dias; Grupo IV – animais que receberam extrato concentrado de soja (350 mg/kg, por dia), durante 90 dias; Grupo V – animais que receberam extrato concentrado de soja (350 mg/kg, por dia) associado ao 17 β -estradiol (10 μ g/kg, por dia).

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram pesados semanalmente até o final do experimento. O veículo e as drogas foram administrados por gavagem (0,5 mL, volume final).

Ao final da administração das drogas, os animais foram anestesiados pelo cloridrato de cetamina (Dopalen®; 300 mg/kg) e Xilazina (Anasedan®; 30 mg/kg) por via intraperitoneal. Em seguida, os fêmures e as tíbias foram removidos para subseqüentes análises

Análise das propriedades físicas e biomecânicas das tíbias

As tíbias foram dissecadas e congeladas a 20°C (em NaCl 0,9%) imediatamente após a eutanásia. As análises foram realizadas no Departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Propriedades físicas

As análises foram realizadas no Departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFSCar.

As tíbias foram descongeladas e imersas separadamente em água destilada e mantidas em um dessecador (DI-PUMP) por 24 horas, para retirar o ar dos poros ósseos. O volume ósseo (VO) e a densidade óssea (DO) foram calculados segundo o princípio de Arquimedes²⁰. Para tanto, obteve-se o peso imerso (Pi) inserindo as tíbias em água destilada à temperatura ambiente, suspensas individualmente por um fio de cobre. Posteriormente, as tíbias foram pesadas para se obter o peso úmido (Pu). O

peso seco das amostras (Ps) foi obtido após desidratação em estufa a 100°C por 24 horas. Em seguida, os ossos então foram colocados em um forno mufla a 800°C (Quimis, modelo Q318A) por 24 horas para obtenção do peso de cinzas (Pc)²¹. Todas as medidas foram realizadas em balança analítica de precisão, com sensibilidade de 0,0001 g (Chy JK-180, Japan). Os seguintes parâmetros foram avaliados: DO (g/cm³), VO (cm³) e DMO (g/cm).

Os valores obtidos das pesagens foram calculados com base nas fórmulas descritas a seguir:

Volume ósseo =
$$\frac{Pu - Pi}{\rho}$$
 (cm³)

$$Densidade \, \acute{o}ssea = \frac{Pu}{VO} \, (g \, / \, cm^3)$$

Densidade mineral =
$$\frac{Pc}{VO}$$
 (g / cm³)

Sendo:

Pu: peso úmido ósseo;

Ps: peso ósseo da amostra desidratada;

Pi: peso imerso ósseo;

Pm: peso do material mineral (cinzas)

ρ: densidade da água.

Propriedades biomecânicas

As propriedades biomecânicas das tíbias foram mensuradas por meio do teste de flexão em três pontos, utilizando-se a máquina de ensaio universal INSTRON modelo 4444 acoplada a uma célula de carga com capacidade de medir até 100 kgf²².

Os resultados foram registrados pelo *software* Instron Series IX na forma de gráfico, gerando uma curva: carga x deformação. Como resultado das análises das curvas, foram obtidos as seguintes propriedades biomecânicas: carga máxima (carga máxima aplicada durante o ensaio) e carga de fratura (carga aplicada no momento da fratura).

Análise morfológica

Processamento do material

A parte distal dos fêmures foi fixada em formaldeído 10% (tampão fosfato) e descalcificados em ácido fórmico 25%, por aproximadamente 40 dias. Em seguida, as peças foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Os blocos foram

realizados cortes semisseriados (5 μ m) e, em seguida, corados pela hematoxilina-eosina (HE).

Histomorfometria óssea

As análises histomorfométricas (seis cortes de cada animal) foram realizadas nas lâminas coradas por HE, que foram observadas e fotografadas com o auxilio de um microscópio (Axiolab 2.0, Carl Zeiss) com objetivas variando de 4 a 100x, acoplado a uma videocâmara de alta resolução (AxionCam, Carl Zeiss) e analisadas com o auxílio do programada Axionvision 4.2 REL (Carl Zeiss).

Para o VO trabecular (BV/TV/%) dos fêmures distais, as medidas foram obtidas determinando-se um retângulo de 1.800×1.600 µm, que foi traçado a 390 µm a partir do ponto inferior do disco epifisário em direção a diáfise, para excluir a região entre a cartilagem e a metáfise, e 390 µm a partir do periósteo²³. As trabéculas localizadas na área do retângulo foram delimitadas e tiveram suas áreas mensuradas.

A espessura (Ct.Wi/µm) do osso cortical foi obtida em três locais: na porção posterior, média e inferior do quadrado estabelecido para a análise do BV/TV, no qual foi traçada uma linha que media a espessura do osso nessas regiões.

As abreviações dos parâmetros morfométricos foram baseadas na nomenclatura padronizada pelo Comitê da *American Society for Bone and Mineral Research*²⁴.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Tukey, para observar as possíveis diferenças entre os grupos. O nível de significância para a rejeição da hipótese nula foi de 5% ($\alpha \le 0.05$). Para tanto, utilizou-se o programa *GraphPad Prism* 5.0 (San Diego, California, USA).

Resultados

Parâmetros físicos e biomecânicos das tíbias

Observou-se que a DO (princípio de Arquimedes) das tíbias dos animais que receberam a terapia combinada (Tabela 1)

apresentou DO significativamente maior (p<0,05) quando comparada a todos os outros grupos tratados e ao controle. A terapia apenas com isoflavonas nas doses administradas não promoveu uma melhora na DO. Não ocorreram diferenças significantes nos demais parâmetros físicos estudados.

Entre os parâmetros biomecânicos estudados, novamente verificou-se que as tíbias dos animais que receberam isoflavonas associadas ao estrógeno se tornaram mais resistentes à fratura, pois apresentaram uma maior capacidade de receber carga e essa diferença foi significante (p<0,05) quando se comparou esse grupo a GII e GIV. Não foram encontradas diferenças significantes nos demais parâmetros biomecânicos estudados.

Análise morfológica

Histomorfometria óssea dos fêmures

Todos os grupos tratados apresentaram maior área óssea trabecular (BV/TV) quando comparados ao grupo controle, porém essa diferença só foi estatisticamente significante (p<0,05) quando se comparou o grupo que recebeu a terapia combinada aos que receberam 80 e 200 mg/kg/dia de isoflavonas e ao controle (Figura 1 e Tabela 2). GV também apresentou maior espessura de osso cortical Ct.Wi (μ) do fêmur (Figura 1B) quando comparado com aos demais grupos tratados e ao controle. Essa diferença foi estatisticamente significante (p<0,05) quando comparado ao grupo que recebeu 200 mg/kg/dia de isoflavonas que foi o que apresentou a menor espessura quando comparado com os demais grupos.

Discussão

Diante do grande número de mulheres que apresentam contraindicações à reposição hormonal com estrógenos²⁵, nos últimos anos têm-se notado que alguns constituintes de plantas denominados fitoestrogênos e, sobretudo, as isoflavonas da soja, podem atuar como alternativas naturais à terapia de reposição hormonal, melhorando os sintomas da menopausa e osteoporose²⁶.

Apesar de, nas últimas décadas, evidências científicas demonstrarem que o consumo das isoflavonas da soja e, consequentemente, a presença dessas substâncias e de seus metabólitos no

Tabela 1 - Média ± desvios-padrão da densidade óssea, densidade mineral óssea, carga máxima e carga de fratura das tíbias dos animais nos vários grupos experimentais.

Grupos	DO (g/cm ³)	DMO (g/cm³)	CM (Kn)	CF (N)
GI-Controle	1,596±0,078*	0,758±0,092	0,048±0,01	0,077±0,01
GII-ISO-80	1,610±0,041#	0,733±0,046	0,039±0,01*	0,062±0,02
GIII-ISO-200	1,600±0,021 ^{&}	0,739±0,021	0,054±0,02	0,066±0,01
GIV-ISO-350	1,607±0,010 ^s	0,737±0,027	0,031±0,01#	0,076±0,01
GV-ISO-350+E	1,680±0,040*#&\$	0,788±0,093	0,062±0,01*#	0,076±0,01

p<0,05; DO (g/cm³): GI*, GII#, GIII\&, GIV\\$, GV*#\\$: CM (Kn): GII*, GIV\#, GV*#.

DO: densidade óssea: (DMO): densidade mineral óssea; (CM): carga máxima; (CF): carga de fratura.

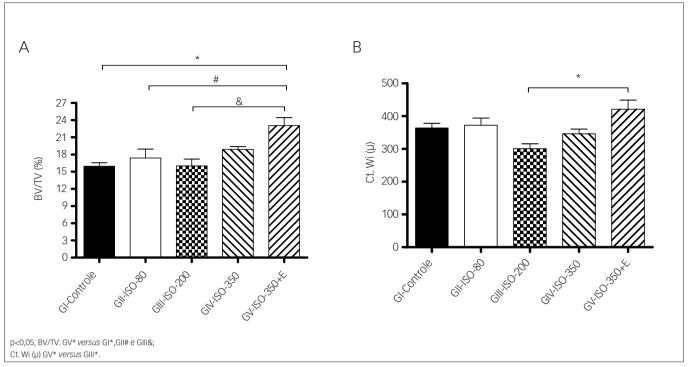


Figura 1 - Média da área óssea trabecular (BV/TV %) e da espessura do osso cortical (Ct.Wi μ) dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais. Média ± desvio padrão.

Tabela 2 - Área óssea trabecular (BV/TV%) e espessura do osso cortical (CT.Wi) dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais

Parâmetros					
Grupos	BV/TV %	CT.Wi (µ)			
GI-Controle	15,93±1,93*	364,0±45,26			
GII-ISO-80	17,37±4,70#	372,5±66,04			
GIII-ISO-200	16,00±3,84 ^{&}	300,6±47,52*			
GIV-ISO-350	18,88±1,45	346,1±45,62			
GV-ISO-350+E	23,03±4,42*#&	421,2±87,55*			

Média da área óssea trabecular (BV/TV) dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais. Média \pm DP. p<0,05, GI*, GII* e GIII 8 versus GV* 8 8.

Média da espessura do osso cortical (Ct.Wi) do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais. Média ± DP. p<0,05, GV* *versus* GIII*.

plasma estão relacionados a efeitos benéficos sobre o osso, não existe ainda na literatura um consenso em relação à melhor dose de isoflavonas associada ou não ao estrógeno que pode ser utilizada com eficácia e segurança.

Dessa forma, o propósito deste estudo foi verificar os efeitos de diferentes doses do extrato de isoflavonas da soja e deste associado ao 17β -estradiol sobre os constituintes do tecido ósseo de ratas ooforectomizadas.

Ratas ooforectomizadas têm sido consideradas como modelo animal ideal para se estudar a perda óssea provocada pela depleção hormonal ovariana. Pois, a perda de massa óssea que ocorre tanto nesse modelo animal quanto em mulheres na menopausa apresentam várias similaridades²⁷⁻²⁹.

Optou-se, neste estudo, por um modelo de ratas maduras submetidas à ooforectomia bilateral, com o objetivo de submeter

esses animais à privação estrogênica. Para constatação da hipoestrogenia, realizou-se o exame colpocitológico no 21° dia do pósoperatório; somente os animais que permaneceram em anestro foram utilizados para inclusão no experimento.

Com relação às propriedades físicas estudadas, foram encontrados efeitos positivos apenas sobre a DO no grupo que recebeu terapia combinada (Grupo V). Sabe-se que a DO reflete a quantidade de massa óssea, e sua diminuição pode influenciar na resistência do osso. Acredita-se que o aumento nesse parâmetro deve ter sido ocasionado pelo 17β -estradiol, pois o grupo tratado apenas com isoflavonas na mesma dose não apresentou esse efeito.

Foi observado que o tratamento por 16 semanas com extrato de isoflavonas (6,25 g/kg de dieta) preveniu a perda óssea e melhorou a DO em fêmures, tíbias e vértebras lombares de ratas ooforectomizadas com três meses de idade. O mesmo trabalho mostra que essa terapia com isoflavonas ainda foi mais eficaz do que o 17β -estradiol administrado sozinho pelo mesmo período na dose de 3,9 mg/kg de dieta³0.

A resistência óssea reflete a integração de dois importantes fatores: densidade e qualidade ósseas, alterações nessas propriedades intrínsecas do osso, podem contribuem para o aumento da fragilidade óssea, porém a resistência não está apenas relacionada à densidade, mas também à qualidade do osso neoformado. Para tanto, analisou-se a qualidade do osso por meio dos seguintes testes biomecânicos: carga máxima (maior carga suportada pela

amostra (tíbia) durante o ensaio) e carga de fratura (carga aplicada no momento da fratura da amostra (tíbia) durante o ensaio).

Esse estudo demonstrou que a carga máxima foi o parâmetro que apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais. Observou-se que o grupo tratado apenas com isoflavonas na maior dose (350 mg/kg por dia) apresentou menor capacidade de receber carga.

Com relação a esse aspecto, sabe-se que as isoflavonas em altas doses podem apresentar efeitos adversos, enquanto que em baixas doses, efeitos positivos^{31,32}. Esse modo de ação das isoflavonas é denominado de efeito bifásico e esse efeito tem sido observado *in vivo*^{33,36} e *in vitro*^{31,32}, tendo sido evidenciado que as isoflavonas estimulam a osteogênese em baixas concentrações e a inibem quando em altas concentrações.

Contudo, o grupo que recebeu a terapia combinada (10 μ g/kg + 350 mg/kg por dia), demonstrou maior resistência a fratura, pois sua capacidade de receber carga foi significativamente maior (p<0,05) em comparação ao grupo que recebeu isoflavonas na mesma dose. Acredita-se que o efeito positivo sobre esse parâmetro se deva ao 17 β -estradiol, já que o grupo tratado apenas com isoflavonas na mesma dose não apresentou esse efeito.

Para avaliar a ação das isoflavonas da soja combinadas ou não ao 17β -estradiol sobre a microarquitetura óssea, utilizou-se dois parâmetros histomorfométricos: a área óssea trabecular e a espessura do osso cortical.

Embora não tenha sido significante, observou-se que os grupos que receberam tratamento apenas com isoflavonas, nas diferentes doses, apresentaram maior área óssea (BV/TV). No entanto grupo que recebeu 350 mg/kg por dia, foi o que apresentou maior valor de BV/TV. Foi sugerido efeito dose-dependente, no qual a maior dose levou à melhor resposta³⁷; também foram encontrados efeitos dose-dependente sobre a DMO no fêmur de ratas osteopênicas

tratadas com 10 mg/kg/dia com genisteína, enquanto que na dose de 1 mg/kg/dia esse efeito apresentou-se diminuído.

Os animais que receberam o tratamento combinado apresentaram área óssea trabecular (BV/TV) significativamente maior quando comparado aos grupos que receberam 80 e 200 mg/kg/dia de isoflavonas e ao controle, porém quando comparados ao grupo que recebeu a mesma dose de isoflavonas, essa diferença não foi significante e acredita-se que nesse caso houve um efeito aditivo com o tratamento combinado.

Já em relação à espessura do osso cortical, o grupo tratado apenas com isoflavonas na menor dose (80 mg/kg/dia) apresentou maior valor (embora não significativo) comparado aos demais grupos tratados apenas com isoflavonas e ao controle. Novamente, verificaram-se os efeitos bifásicos das isoflavonas da soja, nos quais o osso cortical desses animais foi mais responsivo à terapia com isoflavonas em doses mais baixas.

O grupo que recebeu terapia associada apresentou maior espessura do osso cortical comparado a todos os demais grupos, embora essa diferença só foi estatisticamente significante quando se comparou esse grupo ao que recebeu 200 mg/kg/dia de isoflavonas.

Conclusão

O tratamento das isoflavonas combinado ao 17β -estradiol influenciou o peso corporal dos animais. A DO e a capacidade das tíbias de receber carga foram maiores no grupo que recebeu a terapia combinada. A terapia combinada teve efeito positivo na área óssea trabecular e na espessura do osso cortical dos fêmures. Dessa forma, este estudo demonstrou que as isoflavonas da soja têm efeito positivo no tecido ósseo de ratas osteopênicas e sua associação com o 17β -estradiol potencializa esse efeito.

Referências bibliográficas

- 1. Wellik DM, Capechi MR. Hox 10 and Hos 11genes are required to lobally pattern to mammalian skeleton. Science. 2003;301(5631):363-7.
- Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone Remodeling. Ann N Y Acad Sci. 2006;1092:385-96.
- Marie PJ. Bone cell-matrix protein interactions. Osteosporos Int. 2009;20(6):1037-42.
- Lerner UH. Bone remodeling in post menopausal.osteoporosis. J Dent Res. 2006;85(7):584-95.
- Cooper C, Campion G, Melton LJ. Hip fractures in the elderly: a word-wide projection. Osteosporos. 1992;2:285-9.
- 6. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg

- C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA. 2002;288(3):321-33.
- 7. Hohenhaus MH, McGarry KA, Col NF. Hormone therapy for the prevention of bone loss in menopausal women with osteopenia: is it a viable option? Drugs. 2007;67(16):2311-21.
- 8. Levine JP. Effective strategies to identify postmenopausal women at risk for osteoporosis. Geriatrics. 2007;62(11):22-30.
- Harman SM. Estrogen replacement in menopausal women: recent and current prospective studies, the WHI and the KEEPS. Gend Med. 2006;3:254-69.

- 10. Lindsay R, Hart DM, Aitken JM, Macdonald EB, Anderson JB, Clarke AC. Long-term prevention of postmenopausal osteoporosis by estrogen. Evidence for an increased bone mass after delayed onset of oestrogen treatment. Lancet. 1976;1(7968):1038-41.
- 11. Fitzpatrick LA. Estrogen therapy for postmenopausal osteoporosis. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2006;50(4):705-19.
- Chubaty A, Shandro MT, Schuurmans N, Yuksel N. Practice patterns with hormone therapy after surgical menopause. Maturitas. 2011;69(1):69-73.
- Brzezinski A, Debi A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1999;85(1):47-51.
- Setchell KD. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology and implications for human health of soy isoflavones. Am J Clin Nutr. 1998;68(6 Suppl):1333S-1346S.
- Potter SM, Baum JA, Teng H. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. Am J Clin Nutr. 1998;68(6):1375S-1379S.
- Chen YM, Ho SC, Lam SS, Woo JL. Soy isoflavonas have a favorable effect on bone loss in Chinese postmenopausal women with lower bone mass: a double-blind, randomized, controlled trial. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(10):4740-7.
- 17. Arjmandi BH, Khalil DA, Smith BJ, Lucas EA, Juma S, Payton ME, et al. Soy protein has a greater effect on bone in postmenopausal women not on hormone replacement therapy, as evidenced by reducing, bone resorption and urinary calcium excretion. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88:1048-54.
- 18. Zhang Y, Li Qi, Wan HY, Helferich WG, Wong MS. Genistein and a soy extract differentially affect three-dimensional bone parameters and bone-specific gene expression in ovariectomized mice. J Nutr. 2009;139(12):2230-6.
- 19. Gallo D, Zannoni GF, Apollonio P, Martinelli E, Ferlini C, Passeti G, et al. Characterization of the pharmacologic profile of a standardized soy extract in the ovariectomized rat model of menopause: effects on bone, uterus, and lipid profile. Menopause. 2004;12(5):589-600.
- Mosekillde L. Assessing bone quality-animal models in preclinical osteoporosis research. Bone. 1995;17(4 Suppl):343S-352S.
- Bedani R, Rossi EA. Isoflavonas: Bioquímica, fisiologia e implicações para a saúde. Boletim do Centro de Pesquisas de Processamento de Alimento. 2005;23(2):231-64.
- 22. Akhter MP, Wells DJ, Short SJ, Cullen DM, Johnson ML, Haynatzki GR, et al. Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. Bone. 2004;35(1):162-9.
- 23. Nozaka K, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Maekawa S, Noguchi H, Shimada Y. Intermittent administration of human parathyroid hormone enhances bone formation and union at the site of cancellous bone osteotomy in normal and ovariectomized rats. Bone. 2008;42(1):90-7.

- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. J Bone Miner Res. 1987;2(6):595-610.
- 25. Tinelli A, Perrone A, Tinelli FG. An alternative to postmenopausal Hormone Replacement Therapy? Selective Estrogens Receptors Modulators (SERMs). Minerva Ginecol. 2001;53(2):127-35.
- 26. Clapauch R, Meirelles RMR, Julião MASG, Loureiro CKC, Giarodoli PB, Pinheiro SA, et al. Fitoestrogênios: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). Arq Bras Endocrinol Metab. 2002;46:679-95.
- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke, HZ. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. Bone. 1995;17(4 Suppl):125S-133S.
- 28. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner. 1991:15(3):175-91.
- 29. Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. Calcif Tissue Int. 1989;45(6):360-6.
- 30. Lee YB, Lee HJ, Kim KS, Lee JY, Nam SY, Cheon SH, et al. Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. Bioscien Biotechnol Biochem. 2004;68(5):1040-5.
- 31. Dang ZC, Audinot V, Papapoulos SE, Boutin JA, Löwik CW. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) as a molecular target for the soy phytoestrogens. J Biol Chem. 2003;278(2):962-7.
- 32. Dang ZC, Lowic CW. The balance between concurrent activation of ERs and PPARs determines daidzein-induced osteogenesis and adipogenesis. J Bone Miner Res. 2004;19(5):853-61.
- 33. Branca F. Dietary phyto-oestrogens and bone health. Proceed Nutr Soc. 2003;62(4):877-87.
- 34. Anderson JJ, Ambrose WW, Garner SC. Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. Proc Soc Exp Biol Med. 1998;217(3):345-50.
- 35. Rachoń D, Seidlová-Wuttke D, Vortherms T, Wuttke W. Effects of dietary equol administration on ovariectomy induced bone loss in Sprague-Dawley rats. Maturitas. 2007;58(3):308-15..
- 36. Rachón D, Vortherms T, Seidlová-Wuttke, Menche A, Wuttke W. Uterotropic effects of dietary equol administration in ovariectomized Sprague-Dawley rats. Climacteric.2007;10(5):416-26.
- 37. Bitto A, Burnett BP, Polito F, Marini H, Levy RM, Armbruster MA, et al. Effects of genistein aglycone in osteoporotic, ovariectomized rats: a comparison with alendronate, raloxifene and oestradiol. 2008;155:896-905.

Recebido em: 25/3/2011 Aprovado para publicação em: 10/8/2011

Relato de caso: hipospádia feminina em criança

Case report: female hypospadia in children

Heraldo Carlos Borges Inforzato¹, Ricardo Santos Simões², Adriana Aparecida Ferraz Carbonel³, José Maria Soares Júnior⁴



Heraldo Carlos Borges Inforzato é médico especialista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica (SBCP). Pós-graduando do Departamento de Morfologia e Genética da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Resumo

Hipospádia feminina é uma doença raramente diagnosticada na infância na qual o óstio externo da uretra localiza-se na parede anterior da vagina. Na pesquisa da literatura encontram-se raros relatos de casos em crianças do sexo feminino. O diagnóstico nesta faixa etária acaba sendo feito quando há infecções urinárias recorrentes. Este trabalho apresenta um caso de uma criança de sete anos de idade cuja localização atípica do óstio da uretra foi corrigida através de cirurgia clássica modificada e adverte, ainda, da necessidade de realização de exames mais detalhados em crianças do sexo feminino que apresentam infecções urinárias de repetição, observando-se com mais atenção a localização anatômica do óstio externo da uretra.

Unitermos: Hipospádia; Uretra; Anormalidades urogenitais; Infecções urinárias; Doenças urogenitais femininas; Criança.

Abstract

Female hypospadia is a rare malformation in which the external urethral meatus is situated on the anterior vaginal wall. The cases reported in the literature in children are extremely rare, and the diagnosis is established when the patient presents recurrent urinary infections. This paper presents the case of a seven-year-old female with hypospadia whose atypical location of the ostium of the urethra was repaired by using modified classical surgery and draws further attention to the necessity of more detailed examinations on female children who have recurrent urinary infections, observing more closely the anatomical location of the external urethral orifice.

Uniterms: Hypospadias; Urethra; Urogenital abnormalities; Urinary tract infections; Female Urogenital Diseases; Child.

Trabalho realizado na Disciplina de Endocrinologia Ginecológica do Departamento de Ginecologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) – São Paulo (SP), Brasil.

¹ Médico especialista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica (SBCP); Pós-graduando do Departamento de Morfologia e Genética da Escola Paulista de Medicina da Unifesp – São Paulo (SP), Brasil.

² Médico Assistente do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP); Pós-Graduando do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP – São Paulo (SP). Brasil.

³ Pós-graduanda do Departamento de Morfologia e Genética da Escola Paulista de Medicina da Unifesp – São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Professor Associado e Livre-Docente do Departamento de Ginecologia da Escola Paulista de Medicina Unifesp; Médico do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP – São Paulo (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Adriana Aparecida Ferraz Carbonel – Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da EPM/Unifesp – Rua Botucatu, 740 – Vila Clementino – CEP 04023-009 – São Paulo (SP), Brasil – E-mail: adricarbonellfisio@hotmail.com

Introdução

Hipospádia feminina é uma anormalidade da uretra na qual o óstio externo da uretra está localizado em posição anômala na parede anterior da vagina, próximo ao anel himenal¹. Hipospádia é uma das anomalias congênitas mais comuns nos Estados Unidos, ocorrendo em aproximadamente 1 em cada 125 nascidos vivos do sexo masculino. No entanto, sua incidência no homem pode variar de 1/100 a 1/1000, de acordo com origem étnica².

No sexo feminino a incidência de hipospádia ainda não é conhecida, pois passa despercebida, sendo normalmente diagnosticada durante o cateterismo ou endoscopia do trato feminino já na mulher adulta³. Geralmente, essa anormalidade é detectada em pacientes do sexo feminino com infecções urinárias de repetição e que não respondem bem ao tratamento médico.

O diagnóstico é dificilmente feito em crianças do sexo feminino⁴, pois somente quando há infecções urinárias recorrentes é que é realizado o exame físico mais apurado dos órgãos genitais femininos externos. O presente artigo relata o caso de uma criança do sexo feminino submetida à correção cirúrgica do defeito, sem derivação da urina.

Relato de caso

Paciente do sexo feminino, 7 anos de idade, negra, natural de São Paulo, Brasil, que aos dois anos foi levada ao pediatra devido a quadro de febre e irritabilidade constante. Foi constatada, no exame físico, sinéquia parcial dos lábios menores do pudendo, porém, não foram percebidas alterações relacionadas às micções e ao óstio externo da uretra. Foram realizados exames de urina tipo I, urocultura e antibiograma, sendo diagnosticada infecção do trato urinário. Durante os cinco anos seguintes a criança apresentou, em média, duas vezes ao ano episódios de febre, poliúria e irritabilidade, diagnosticados como infecção urinária por meio de urocultura.

A paciente foi avaliada em consulta pela cirurgia plástica aos sete anos, na qual foi constatada, por meio de exame ginecológico externo, sinéquia parcial dos lábios menores do pudendo, e também a aparente ausência do óstio externo da uretra. No exame, sob sedação, notou-se que o óstio externo da uretra encontrava-se no interior da vagina, na parede anterior, próximo ao hímen. Diagnosticou-se hipospádia feminina tipo III, segundo a classificação de Blum⁵ (Figura 1).

Realizou-se a neo-uretroplastia pela técnica proposta por Fischelovitch e Ben-Bassat⁶. Demarcou-se um segmento da mucosa de 1cm de largura e 3cm de comprimento, iniciando-se a 2mm posterior ao óstio externo da uretra anômala, em forma de semicírculo, abrangendo-o e terminando na posição do óstio (Figura 2).



Figura 1 - Fotografia mostrando o aspecto da hipospádia feminina de paciente com sete anos, notando-se a aparente ausência do óstio externo da uretra no intróito vaginal.

Incisou-se o retalho em sua totalidade. A seguir, descolou-se uma extensão de 3mm de cada parte lateral desse e a totalidade da parte posterior que engloba o óstio externo uretral anômalo. Deixou-se aderido ao leito a parte demarcada (Figura 2). Suturaram-se os segmentos descolados a partir do orifício em direção à vulva, formando assim um tubo que se constituiu na neo-uretra, dando uma nova posição ao óstio uretral. As margens cruentas deixadas após a confecção da neo-uretra foram suturadas entre si, sepultando assim a mesma (Figura 3).

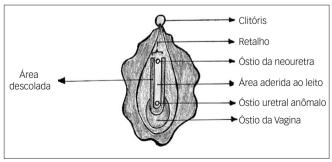


Figura 2 - Desenho esquemático mostrando como foi a marcação e a confecção do retalho da mucosa vaginal.

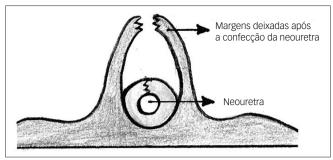


Figura 3 - Desenho esquemático mostrando como foi realizada a confecção da neo-uretra.



Figura 4 - Fotografia mostrando o aspecto do pós-operatório imediato da neo-uretra com sonda de Foley, reconstruída pela técnica de Fischelovitch e Ben-Bassat.

Não foi realizada cistostomia; apenas utilizou-se uma sonda de Foley durante dez dias. A paciente permaneceu internada por quatro dias. Evoluiu sem fístula ou qualquer outro tipo de complicação (Figura 4).

Discussão

A hipospádia feminina trata-se de uma doença rara e seu diagnóstico em crianças é ainda mais raro, conforme relatos da literatura. Em 1904, Blum classificou as hipospádias femininas em três grupos, de acordo com a situação do óstio da uretra em relação à parede anterior da vagina. O tipo I consiste na existência de uma comunicação longitudinal da parede posterior da uretra com a parede anterior da vagina; o tipo II é a persistência

do sinus urogenital; no tipo III,, a uretra abre-se no interior da vagina próximo à formação himenal⁵.

Campbell, em 1970, relata que tinha conhecimento de 46 casos de hipospádia feminina descritos na literatura até aquele momento, sendo a grande maioria diagnosticada em mulheres na idade adulta⁷.

Outros trabalhos reforçam a raridade dessa doença, principalmente em crianças, e que, quando diagnosticada, pode ou não haver outras malformações genitais associadas⁸⁻¹¹.

Pode-se mencionar estudo realizado por Gaber, em 1981, no qual se verificou o comprimento da uretra em 32 cadáveres do sexo feminino, cujas fichas mostravam infecções urinárias recorrentes. Chegou-se a um comprimento médio da uretra de 3,67cm após a análise de 29 casos. Em três casos, encontrou-se comprimento de 2,8; 3,1 e 3,2cm; destes, dois apresentavam o óstio externo da uretra junto ao anel himenial. Concluiu-se que a hipospádia feminina pode ser congênita, porém rara, sendo denominada "hipospádia feminina relativa ao encurtamento da uretra", e pode também ser adquirida pelo trauma durante a vida sexual ativa da mulher¹².

Outros autores, como Hill et al. em 1982, discutiram a possibilidade da mesma não ser apenas de etiologia congênita, mas também adquirida. Essa hipótese seria apoiada pelo fato de que quatro entre os cinco casos relatados pelos autores serem de mulheres com idade entre 69 e 84 anos e apenas uma com 4 anos⁸. Essa conclusão reforça o parecer de Gaber¹². A menina de quatro anos, além da ausência do óstio externo da uretra, apresentava deformidade congênita da bexiga. Portanto, a hipospádia fazia parte de uma deformidade complexa das vias urinárias. Contudo, raros são os casos com crianças descritos na literatura.

Em 1992, Van Bogaert apresentou seis casos somente de adultos, com idade entre 19 e 35 anos, com síndrome uretral, apresentando disúria e dispareunia e com o início dos sintomas após o começo da atividade sexual. Todos foram tratados com medicamentos por um período de dois anos. Não havendo resposta ao tratamento conservador, acabaram sendo submetidos ao avanço cirúrgico da uretra por meio de retalhos locais de mucosa, fato que vem reforçar a teoria da hipospádia adquirida⁹.

Novos relatos de casos em crianças, isolados na literatura, surgem em 1995 quando Knight et al. relataram um caso de hipospádia feminina na idade de 2 anos, com estenose parcial da uretra, e descreveram a diferença sinus urogenital e a hipospádia proximal ou distal¹⁰.

Também Ayed et al., em 1995, relataram três casos, sendo um de hipospádia isolada e outros dois nos quais havia outras anomalias genitais associadas¹¹.

Greenfield et al. 13 , em estudo retrospectivo de 10 anos - de 1994 a 2003 - no serviço de urologia da cidade de Buffalo (USA), encontraram 7 meninos com hipospádia e nenhuma menina.

Acredita-se que a hipospádia possa ter uma etiologia multifatorial, em que variantes alélicas de genes que controlam a ação dos androgênios e seu metabolismo predispõem os indivíduos a desenvolver essa condição^{3,14}. Quando a susceptibilidade genética é combinada com a exposição à agentes antiandrogênicos, um limite é ultrapassado, o que resulta na manifestação desse defeito congênito. Um papel claro para a exposição à substâncias químicas ambientais antiandrogénicas ainda não foi estabelecido na etiologia das hipospádias, embora os resultados em modelos animais de laboratório indicarem que uma série de compostos químicos ambientais possam estar envolvidos, entre os quais anti-histamínicos¹⁵; organofosforados¹⁶ e antirretrovirais¹⁷.

Assim, como no presente caso, vários autores relacionam a infecção urinária recidivante como fator importante para o diagnóstico no sexo feminino. Essa malformação pode vir acompanhada de outras relacionadas à bexiga. A demora no diagnóstico

deve-se ao fato de não se realizar um exame minucioso dos órgãos genitais femininos externos em casos nos quais há infecções urinárias recorrentes.

Em nosso trabalho baseamo-nos na técnica descrita por Fischelovitch e Ben-Bassat⁶ para a correção desse caso, embora esses autores relatem um caso de uma paciente de 27 anos corrigida através da presente técnica e com utilização da cistostomia.

A técnica cirúrgica utilizada, embora seja padronizada por outros autores, foi modificada, pois não foi utilizada a cistostomia. O fato de não se utilizar a cistostomia tornou o pós-operatório mais confortável para a criança. A não ocorrência de fístula abre uma nova perspectiva. O presente relato adverte para que o exame físico em crianças do sexo feminino com infecção urinária de repetição seja mais detalhado, observando-se com mais atenção a localização anatômica do óstio externo da uretra para que se faça o diagnóstico precoce desta anomalia, que é de fácil correção.

Referências bibliográficas

- Bhat A, Saxena R, Bhat MP, Dawan M, Saxena G. Female hypospadias with vaginal stones: a rare congenital anomaly. J Pediatr Urol. 2010;6(1):70-4.
- Manson JM, Carr MC. Molecular epidemiology of hypospadias: review of genetic and environmental risk factors. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2003;67(10):825-36.
- Kalfa N, Philibert P, Baskin LS, Sultan C. Hypospadias: interactions between environment and genetics. Mol Cell Endocrinol. 2011;335(2):89-95.
- Derevianko IM, Derevianko TI, Ryzhkov VV. Hypospadia in females. Urologia. 2007(3):26-8.
- Blum U. Die Hypospadias der weiblichen Harnrohre. Mber Urol. 1904;9:522-44.
- Fischelovitch J, Ben-Bassat M. Female hypospadias. Br J Urol. 1976; 48:72.
- Campbell M.F. Anomalies of the genital tract. In: Campbell MF, Harrison JH. Urology. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 1970. p. 1606-7.
- 8. Hill JT, Aker M, Fletcher MS, Yates-Bell AJ. Female hypospadias. Case reports. Br J Obstet Gynaecol. 1982;89(7):581-3.
- 9. Van Bogaert LJ. Surgical Repair of hypospadias in women with symptons of urethral syndrome. J Urol. 1992;147:1263-4.

- 10. Knight HML, Phillips NJ, Mouriquand PDE. Female Hypospadias: a case report. J Pediatr Surg. 1995;30(12):1738-40.
- 11. Ayed M, Ben Abid F, Loussaief H, Ben Hassine L, Jemmi M. Female Hypospadias. Apropos of 3 cases. J Urol. 1995;101(5-6):244-7.
- 12. Gaber, M. Female Relative Hypospadia. Urology. 1981;18(1):27-31.
- 13. Greenfield SP, Williot P, Kaplan D. Gross hematuria in children: a tenyear review. Urology. 2007;69(1):166-9.
- Asklund C, Jørgensen N, Skakkebaek NE, Jensen TK. Increased frequency of reproductive health problems among fathers of boys with hypospadias. Hum Reprod. 2007; 22(10):2639-46.
- 15. Pedersen L, Nørgaard M, Skriver MV, Olsen J, Sørensen HT. Prenatal exposure to loratadine in children with hypospadias: a nested case-control study within the Danish National Birth Cohort. Am J Ther. 2006;13(4):320-4.
- Nassar N, Abeywardana P, Barker A, Bower C. Parental occupational exposure to potential endocrine disrupting chemicals and risk of hypospadias in infants. Occup Environ Med. 2009;25:226-8.
- 17. Nso Roca AP, García-Bermejo CG, Larru B, RM, Muñoz Fernández MA, de José MI. Pathology in children of HIV women. Indian J Pediatr. 2009;76(11):1125-30.

Recebido em: 5/4/2011 Aprovado para publicação em: 15/8/201

PRODUÇÃO EDITORIAL



Uma empresa do Grupo ZP

Rua Bela Cintra, 178, Cerqueira César São Paulo/SP - CEP 01415-000 Tel.: 55 11 2978-6686 www.zeppelini.com.br

Para anunciar nesta revista: Departamento de Publicidade (Zeppelini Editorial) publicidade@zeppelini.com.br Te.: +55 11 2978-6686



Reprodução Assistida Endometriose Oncofertilidade Endocrinologia reprodutiva Avanços na anticoncepção e climatério Bioética Endoscopia pélvica Genética e embriologia reprodutiva Sexualidade conjugal Medicina fetal

Informações e inscrições:

sbrh@sbrh.org.br / 11 5055 2438

www.sbrh.org.br





