

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina, área de Tocoginecologia da FCM/UNICAMP, para obtenção do Título de Doutor.

Campinas, 09 de setembro de 1996.

PROF.DR.ALOÍSIO JOSÉ BEDONE
ORIENTADOR



*

LOURIVALDO RODRIGUES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS GESTACIONAIS DE
UM PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL
COM SÊMEN DE DOADOR**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR EM MEDICINA NA ÁREA DE
TOCGINECOLOGIA.**

*

ORIENTADOR: PROF. DR. ALOÍSIO JOSÉ BEDONE

UNICAMP

1996



1000000000

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	I UNICAMP
V.	So85a
Tombo BC/	28870
PROC.	667/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/10/96
N.º CPD	

CM.00094781.2

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

So85a Sousa, Lourivaldo Rodrigues de
Avaliação dos resultados gestacionais de um programa de
inseminação artificial com sêmen de doador (IAD) / . Lourivaldo
Rodrigues de Sousa. Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador : Aloísio José Bedone
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Esterilidade. 2. Sêmen. 3. Doador. 4. Inseminação. I. Aloísio
José Bedone. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Aluno: LOURIVALDO RODRIGUES DE SOUSA

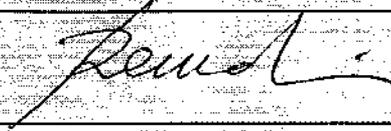
Orientador: Prof. Dr. ALOÍSIO JOSÉ BEDONE

Membros:

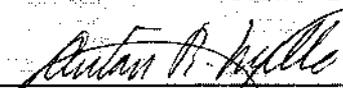
1.



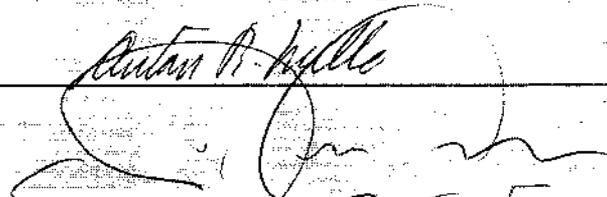
2.



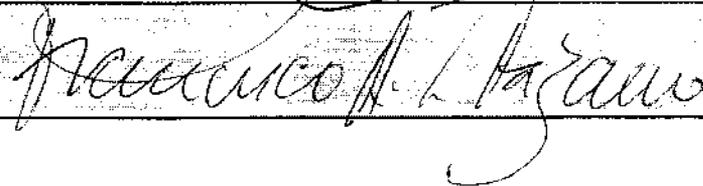
3.



4.



5.



Curso de Pós-Graduação em Medicina na Área de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado

À memória de meus pais,

À Suky, Danielle, Fabíola e Raphael, por entenderem as minhas ausências e compartilharem comigo as angústias e as incertezas daqueles que buscam o desconhecido.

Às pacientes desejosas e ansiosas que objetivam com esmero a consecução da realização de um sonho - ser mãe.

À todos os amigos que colaboraram direta e indiretamente para que esse sonho viesse a se realizar.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aloísio José Bedone, que nas horas mais difíceis pode redirecionar nosso plano de trabalho, apoiando e incentivando a consecução desta difícil tarefa - orientar.

Ao Prof. Dr. José Remohí, que ao convidar para buscar as informações em seu Centro, permitiu não somente isso, como também co-orientou sobre aspectos intrínsecos do projeto, deixando o IVI como se fosse nossa própria casa.

Ao Prof. Dr. Hugo Sabatino, por sua grande amizade, sempre desprendido de ambições maiores, e que facilitou, incentivou e apoiou nosso plano de metas.

Ao Biólogo José Luiz Suzuarregui, que partilhou sua experiência e sua colaboração valiosa no trabalho.

Ao Prof. Dr. Iradi Casal e Armando Infante, incansáveis na orientação, preparação e tabulação dos dados estatísticos deste trabalho.

A toda equipe do IVI, que tão gentilmente permitiu e facilitou a consecução do trabalho.

Aos colegas do Departamento de Saúde Materno-Infantil da FCS: Professores doutores: Wallace Ramos Oliveira, Zilton Vieira Leite, José Adalberto Bonfim, Francisco de Assis Soares Marques, Lenice Fortunato de Oliveira, Ione Rodrigues Brum, Carlos Henrique Esteves Freire, João Soares Barbosa, Sigrid Queiroz Cardoso, que com seus sacrifícios, apoiaram meu afastamento para a realização desse objetivo.

As amigas Maria José de Sousa e Ana Cláudia Figliuolo pelo apoio na revisão gramatical e correção do texto.

SIGLAS E ABREVIATURAS

SIGLAS E ABREVIATURAS UTILIZADAS NO ESTUDO

AATB	Associação Americana de Bancos de Tecidos
AFS	Sociedade Americana de Fertilidade
ANOVA	Análise de Variância
CC	Citrato de clomifeno
CN	Ciclos naturais
CPF	Cadastro de pessoa física
ET	Transferência embrionária
FIV	Fertilização in vitro
FIV-ET	Fertilização in vitro e transferência de embriões
FSH	Hormônio folículo-estimulante
FSHhp	Hormônio folículo-estimulante altamente purificado
GIFT	Transferência intratubárica de gametas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HIV	Vírus de imunodeficiência humana
hMG	Gonadotrofina de mulher menopausada
HTLV	Vírus humano linfotrópico celular T
IAC	Inseminação artificial conjugal

IAD	Inseminação artificial com sêmen de doador
ICSI	Injeção intracitoplasmática de gametas
IIP	Inseminação intra-peritoneal
IIT	Inseminação intra-tubárica
IIU	Inseminação intra-uterina
IVI	Instituto Valenciano de Infertilidade
LH	Hormônio luteinizante
p	Probabilidade de significância estatística
PCR	Polimerase Chain Reactive
PROST	Transferência tubárica de zigoto em estágio de pronúcleo
OMS	Organização Mundial de Saúde
TET	Transferência de embriões às trompas
TIG	Teste imunológico de gravidez
SUZI	Inseminação espermática na subzona
WHO	World Health Organization
χ^2	Qui-quadrado
ZIFT	Transferência intrafalópio de zigotos
DIA "0"	Dia da administração de hCG
DIA +1	Dia 1 da administração de hCG
DIA +2	Dia 2 da administração de hCG

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CONCEITO	1
1.2. MAGNITUDE DO PROBLEMA	5
1.3. INDICAÇÕES	7
1.4. ASPECTOS MORAIS, ÉTICOS E LEGAIS	10
1.5. ESTIMULAÇÃO OVARIANA	14
1.6. COMPLICAÇÕES DA INSEMINAÇÃO INTRA-UTERINA	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. GERAL	21
2.2. ESPECÍFICOS	21
3. SUJEITOS E MÉTODO	22
3.1. DESENHO DO ESTUDO	22
3.2. VARIÁVEIS ESTUDADAS	23
3.3. PROCEDIMENTOS REALIZADOS	27
3.4. ACOMPANHAMENTO DOS SUJEITOS	29
3.5. COLETA DE DADOS	30
3.6. PROCESSAMENTO DOS DADOS	30
3.7. ANÁLISE DOS DADOS	31
3.8. ASPECTOS ÉTICOS	34
4. RESULTADOS	36
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	68
7. APÊNDICE	69
8. ANEXO	97
9. SUMMARY	100
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

RESUMO

RESUMO

Com o objetivo de avaliar os resultados gestacionais de um programa de Inseminação Artificial com Sêmen de Doador (IAD), foi realizado um estudo clínico observacional com 480 casais no Instituto Valenciano de Infertilidade (IVI) - Espanha, utilizando diferentes esquemas de estimulação ovariana ou não, no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1994. Esses casais submeteram-se a 1429 ciclos de inseminações intra-uterina (IIU), sendo que 235 eram pacientes cujos maridos apresentavam diagnóstico de azoospermia e 245 mulheres cujos maridos apresentavam esterilidade masculina de causa severa. O tempo médio de esterilidade foi de 4,6 anos e a idade média das mulheres foi de 31,8 anos. Para análise dos dados foi utilizado o modelo estatístico de Kaplan-Meier, sendo considerados significativos valores de $P < 0,05$. Foram obtidas um total de 253 gestações, com uma taxa de gestação por paciente de 52,7% e uma taxa acumulada de gestação em seis ciclos de 67,1%. Observamos resultados gestacionais significativamente melhores no grupo com estimulação ovariana (notadamente no grupo com FSHhp) quando comparados com o grupo sem estimulação. Os resultados gestacionais obtidos após três e seis ciclos de inseminações foram muito semelhantes. Os resultados gestacionais foram melhores no grupo de pacientes azoospermicos apenas nos ciclos naturais. Não houve influência do fator idade nos resultados analisados. Concluímos que a taxa de gestação por paciente e a taxa acumulada de gestação foram superiores no grupo cuja ovulação fora estimulada com FSHhp e que os resultados gestacionais obtidos com três e seis ciclos não foram diferentes.

**“A QUESTÃO ÉTICA DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL
É, ESSENCIALMENTE, UM PROBLEMA DE
MORALIDADE DE MEIOS E NÃO DE FINS, DE
MÉTODOS E NÃO DE RESULTADOS. AOS QUE
CONTESTAM OS MEIOS E OS MÉTODOS CABE O
ÔNUS DE DEMONSTRAR, COM BASE NA RAZÃO, A
IMORALIDADE DE AMBOS”.**

Marcos de Almeida, 1992

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A primeira Inseminação Artificial por sêmen de Doador (IAD) exitosa que tem se notícia foi realizada em 1884 por Pancoast na Filadélfia, em um casal estéril por azoospermia do marido (GREGOIRE & MAYER, 1965). Desde então, o interesse pela IAD tem sido crescente, uma vez que, por um lado, cada vez mais tem se tornado difícil a adoção e, por outro, a atitude da sociedade a respeito da sexualidade e da fertilidade tem evoluído, ao separar ambos os aspectos e fazer-se mais tolerante e progressista, convertendo-se numa alternativa a mais, a fazer parte do espectro das técnicas de reprodução assistida.

1.1. Conceito

A IAD consiste na introdução, no aparelho genital feminino, de sêmen procedente de um doador.

Há, vários locais onde pode se efetuar a IAD. Dentre as diferentes localizações utilizadas classicamente para a inseminação artificial: intravaginal, intracervical e intra-uterina, destaca-se esta última, objeto deste estudo, uma vez que, desta maneira,

transpõe-se o obstáculo físico da cérvix, sem ter efeitos secundários derivados da técnica, quando realizada corretamente e em condições de assepsia adequada. Diversos estudos têm comprovado uma maior eficácia da técnica quando a inseminação se realiza dentro do útero (IA-IIU), comparada com a vaginal ou transcervical (PATTON et al., 1992; HURD et al., 1993).

Outras técnicas para realizar a inseminação artificial, são a intraperitoneal (IIP) e a intratubárica (IIT). A IIP, que consiste em uma punção no fundo de saco de Douglas e o depósito do sêmen capacitado na cavidade peritoneal, tem demonstrado taxas de gestação que se aproximam da intra-uterina, porém não superiores a esta (SERACCHIOLI, 1991). Não se justifica sua utilização em face do risco potencial de complicações como a perfuração de alças intestinais, infecção pélvica, e pela predisposição da paciente à doença inflamatória pélvica, ao se realizar esse procedimento invasivo. Por estas razões, essa técnica deve ser reservada para aqueles casos em que não é possível realizar inseminação intra-uterina por causa de uma grave estenose cervical.

A inseminação intratubárica consiste na canalização das trompas por via transcervical, com o conseqüente depósito de sêmen capacitado dentro das mesmas. Ainda é objeto de estudo e até agora não se tem provado ser melhor que a intra-uterina (HURD et al., 1993). O maior inconveniente é que essa canalização é de difícil realização por ser um procedimento às cegas, que pode provocar traumatismo da mucosa endometrial e endosalpingeal e, em muitas ocasiões, impossível de ser realizada.

Dentro do espectro da inseminação artificial, existem variantes, como o número de inseminações em cada ciclo e em cada paciente e o momento de realizá-las. Tem sido comprovado que, ao se proceder a duas inseminações nos dias +1 e +2, após a indução da ovulação, resultarão maiores taxas de gestação do que quando se realiza apenas uma no dia +2 (BYRD et al., 1990; CENTOLA, MATTOX, RAUBERTAS, 1990). A explicação desse fato é que há uma maior percentagem de pacientes que apresentam um pico endógeno de LH antes da ovulação, seja ou não induzida exogenamente com hormônio gonadotrófico coriônico (hCG). Por isso, ao se realizarem duas inseminações, esse grupo de pacientes estará coberto durante seu período fértil, uma vez que as porcentagens de gestação serão incrementadas. Por outro lado, tem se demonstrado que não há diferenças significativas quando se realiza apenas uma inseminação intra-uterina com sêmen criopreservado de doador, quando a paciente foi estimulada por drogas indutoras da ovulação, 24 horas após a administração de hCG, em relação às pacientes que receberam duas inseminações, às 24 e 48 horas após hCG (KHALIFA et al., 1995).

Está implícito que um pool de espermatozóides móveis que alcançam a trompa não aumenta significativamente quando se utiliza mais de uma inseminação e é sabido que a sobrevivência do espermatozóide no trato genital superior pode ser tão longa como de cinco dias seguintes ao da inseminação (GOULD, OBESTREET, HANSON, 1984).

Está bem estabelecido que o momento da inseminação é fator decisivo na IAD (KARLSTRÖM et al., 1993). Entretanto, o método ideal para determinar o momento ótimo de realizar IUI permanece duvidoso. Alguns estudos tentam estimar esse momento,

utilizando kits para detectar elevação do LH urinário comparando posteriormente com os resultados de gravidez após a inseminação (MARTINEZ et al., 1991).

Outros estudos demonstram que o ultra-som usado no momento da inseminação em alguns casos proporciona maior chance de sucesso (CLARAZ et al., 1989).

A ultra-sonografia transabdominal tem sido usada para medir o diâmetro folicular e ajudar no momento da inseminação, com resultados promissores (RONNBERG, YLOSTALO, JOUPPILA, 1978; MARINHO et al., 1982). Para muitos centros, entretanto, as limitações da ultra-sonografia transabdominal tornam-na impraticável pela necessidade da bexiga cheia, dificuldades em pacientes obesas, etc.

A ultra-sonografia transvaginal tornou-se a principal arma na monitorização do crescimento folicular e, ao mesmo tempo, para determinar o momento da inseminação. Constitui-se em técnica rápida, aceitável pela paciente, e que permite uma boa visualização da cavidade pélvica (DEUTINGER et al., 1986; ANDREOTTI, 1990; ITSKOVITZ et al., 1990; BONILLA-MUSOLES et al., 1989; 1992).

O tema mais delicado, dentro da alternativa que se supõe a inseminação artificial, é o que faz referência àquela que se realiza a partir de sêmen de doador, já que este método é o que maiores controvérsias suscita. Apesar de que esta prática seja antiga, o caráter de relativa clandestinidade que a revestia não só tem provocado historicamente escassos benefícios, como também dificultado, de grande maneira, seu progresso. As informações que a inseminação artificial com sêmen de doador podem proporcionar aos

nossos conhecimentos sobre a fertilidade humana, por exemplo, haverão ainda de ser reveladas.

Nos últimos anos, parece-nos que a IAD adquiriu tal impulso que tem se convertido nos grandes centros, pelo menos sob o ponto de vista numérico, no método para o tratamento da infertilidade masculina com melhores resultados. Hoje em dia a sociedade aceita a prática da IAD de forma positiva ou, na pior das hipóteses, não desperta nenhum interesse, sendo escassas as posições abertamente adversas, revelando uma enorme mudança da opinião pública nestas duas últimas décadas.

A IAD pode considerar-se hoje em dia como uma alternativa para os casais cujo fator masculino é o responsável pela infertilidade, em que pese aos últimos avanços com a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), restrita aos grandes centros e com elevados custos para o casal.

1.2. Magnitude do problema

Os dados exatos sobre a incidência da infertilidade numa determinada comunidade são, até certo ponto, hipotéticos e dependem dos critérios utilizados. Na tentativa de calcular a possível demanda de IAD, obtém-se resultados que oscilam entre 2-3 casos para cada 1.000 casamentos contraídos em um ano (LEVIE, 1972).

Supondo que 15% de todos os casais sejam inférteis e que a causa desta infertilidade se distribua por igual entre homem e mulher e, se a demanda de IAD corresponde à calculada (2/1000 casamentos contraídos em um ano), representaria aproximadamente 2,5% dos casais cuja esterilidade seja devida ao fator masculino.

Ainda que estas cifras fossem corretas, seriam aplicáveis unicamente a uma situação de equilíbrio. O que se tem comprovado em todos os serviços em que se realiza IAD é que a demanda atual inclui casais para os quais a IAD não havia sido possível antes (uma situação parecida a que se produz quando se legalizam os métodos de esterilização).

Segundo a experiência de Matthews em seu serviço de IAD, com uma população de 1.000.000 de habitantes, a demanda de IAD durante seis anos de atuação tem sido de 12 por cada 1.000 matrimônios contraídos, o que representa de quatro a seis vezes mais que a incidência estimada. Dito de outro modo, 24% de todas as uniões com esterilidade devido ao fator masculino, solicitariam a IAD (MATTHEWS et al, 1979).

Estudos anteriores realizados no Instituto Valenciano de Infertilidade tem demonstrado que as solicitações diretas de IAD dentre os casais que procuraram a consulta por infertilidade consistiam de 30% a 40% do total (REMOHI et al., 1989).

Os casais que solicitam diretamente IAD já têm feito uma verdadeira auto-seleção, bastante estrita antes de buscar auxílio à clínica. Entretanto, a seleção de casais para os quais a IAD constitui o método terapêutico mais apropriado pode ser difícil e evidentemente constitui a questão mais importante que deve valorizar-se, num serviço de infertilidade que dispõe das técnicas de fertilização assistida.

Para a realização da IAD, o médico deve considerar dois aspectos: em primeiro lugar, o estado reprodutivo do casal. Neste caso, deve-se comprovar a incapacidade ou inconveniência, por questões de ordem genética do marido, para levar a cabo a concepção, e a demonstração de que a capacidade reprodutora da mulher seja normal. Em segundo lugar, que os cônjuges estejam aptos para a IAD. As duas condições podem ser em ocasiões bem distintas, porém, com frequência, não é tarefa tão fácil determiná-las. Uma situação duvidosa é a do marido que apresenta espermatozoides em seu ejaculado, porém a capacidade de fertilização é incerta. Clinicamente torna-se muito difícil julgar a fertilidade de um indivíduo baseando-se unicamente na observação ao microscópio de seus espermatozoides. Há estudos demonstrando que, em casais que optaram pela adoção de recém-nascidos, se observaram 8% de concepção no período de espera (KLAUS & QUINN, 1977).

1.3. Indicações

Andrológicas: Correspondem a mais de 90% das IADs. Trata-se de indivíduos que apresentam um transtorno na ejaculação ou no sêmen, seja por azoospermia, seja por alteração severa (oligo, asteno ou teratozoospermia ou uma combinação das mesmas) não corrigível com os tratamentos convencionais. As causas podem ser múltiplas: infecções, displasias, criptorquídias, neoplasias, vasectomias, etc.

Os requisitos para indicação de IAD são: azoospermia, oligozoospermia severa ($0 - 1 \times 10^6$ de espermatozóides/ml), oligozoospermia moderada ($1 - 5 \times 10^6$ espermatozóides/ml), oligozoospermia leve ($5 - 20 \times 10^6$ espermatozóides/ml), asthenoteratozoospermia ($< 14\%$ de formas normais) e riscos genéticos (LE LANNOU & LANSAC, 1989).

Nos casos de azoospermia, criptozoospermia ($< 1.000.000$ de espermatozóides/ml) e ausência de mobilidade espermática, é muito difícil melhorar o padrão do sêmen com o emprego de técnicas normalmente utilizadas em reprodução assistida.

Nessas situações a indicação de IAD parece ser muito oportuna. Entretanto, quando o número de espermatozóides é maior e, sobretudo quando há mobilidade espermática, é factível a inseminação com sêmen do cônjuge devidamente preparado (IAC) ou fecundação *in vitro*. A escolha dependerá das condições da mulher e de uma concentração adequada de sêmen.

Segundo a experiência de muitos Centros, para realizar uma IAC com possibilidades de êxito deve haver, depois de melhorar o sêmen, ao menos um milhão de espermatozóides móveis de classe III (> 30 micras/seg.) (DE LAS HARAS et al., 1987). Em caso de fecundação *in vitro*, esta cifra é de 500.000 espermatozóides móveis de classe III. Caso seja inferior, indica-se IAD. Hoje em dia, com técnicas de microinjeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), pode-se tentar a fecundação inclusive com espermatozóides imóveis.

Doenças hereditárias: Quando o indivíduo tem a possibilidade de transmitir à sua descendência uma enfermidade hereditária, como por exemplo a hemofilia ou a coréia de Huntington, há indicações de IAD. Ela é também indicada nos casos de uma enfermidade genética dominante ou recessiva, em que ambos os cônjuges sejam afetados, assim como também naqueles casos, de antecedentes de mais de dois filhos com anormalidades do mesmo pai e com mães diferentes, mesmo que o estudo do cariótipo do sangue periférico se revele normal.

Incompatibilidade Rh: A IAD está também indicada para casais cuja mulher apresente anticorpos anti-Rh sendo o marido Rh positivo.

Mulher sem parceiro: Pode aplicar-se a IAD em mulheres sem parceiros que desejem ter um filho sem relações sexuais ou evitando os problemas que possam derivar-se de conhecer o pai biológico. Nos filhos resultantes destas indicações, não há maiores incidências de alterações psicomotoras ou anomalias no desenvolvimento quando comparadas com situações normais (McGUIRE & ALEXANDER, 1985). Entretanto, nestas indicações, deve-se sempre requerer um exame psicológico.

Esterilidade de origem desconhecida: Indica-se IAD nas esterilidades de origem desconhecida ou quando os tratamentos convencionais tenham falhados.

Marido soro positivo para HIV: Constitui indicação de inseminação com sêmen de doador quando o cônjuge apresenta soroconversão para o vírus da imunodeficiência humana adquirida.

1.4. Aspectos morais, éticos e legais

As objeções morais à IAD tem advindo em sua maior parte das instituições religiosas. De fato, a IAD tem sido julgada adversamente por todas as religiões de caráter autoritário. O Papa Pio XII rechaçou a inseminação artificial em 1949 e 1951. A Igreja Luterana e a Judia Ortodoxa também a proíbem. Um Comitê designado pelo arcebispo de Canterbury para tratar da inseminação artificial publicou, em 1948, que a IAD estava "equivocada em seus princípios e era contrária às normas cristãs". O Ministério do Interior da Grã-Bretanha considerou e recomendou que a IAD constituía uma "liberdade indesejável e imoral, comparável à fornicação e ao adultério", recomendando energicamente sua proibição. A principal objeção tem se centrado sobre a ruptura do laço de união entre marido e mulher. Apesar de que a filosofia moral cristã aceita que "o coito não fora instituído unicamente para a procriação", a base histórica da civilização ocidental, em seus aspectos filosóficos, legais e religiosos, considera a procriação como um direito exclusivo das uniões legais. Assim, pois, a transgressão desta lei resulta em adultério (DUNSTAN, 1976).

Dunstan, um dos teólogos atuais mais relevantes, com uma visão ampla da situação angustiada do casal cristão que se decide a recorrer à IAD, diz que "se o casal conscientemente mantém este ponto de vista, a tradição moral cristã ortodoxa considera-a estritamente livre de pecado, desde que atuem em plena consciência". "Os católicos

praticantes todavia haverão de afrontar as conseqüências do que fora proibido de forma clara pela máxima autoridade da Igreja" (DUNSTAN, 1976).

Da moral nasce a ética. Um método que se realiza com perfeição técnica, segundo umas normas morais estritas, é ético. A continuidade da IAD depende da pública aceitação de normas estritas, as quais seguirão indubitavelmente às modificações das leis que facilitem sua prática.

Na realidade, até pouco tempo, a falta de clareza da lei tem sido fator importante para que a IAD se realizasse de forma quase sub-reptícia e, ainda que se tenha modificado muito pouco a situação legal, a expansão da IAD evidencia a crescente confiança dos médicos na atitude que tomaria a lei em caso de chegar a juízo. De fato, é na aceitação da IAD por parte da população em geral e dos médicos que se tem encontrado uma disposição mais favorável.

Duas décadas e meia atrás havia nos Estados de Nova York e Oklahoma, leis relativas à IAD. Desde então, outros sete Estados norte-americanos tem autorizado sua prática regida pela correspondente legislação. Na Itália, tem se proibido sua realização e, na França, decidiu-se não aceitar legalmente o método. Na Austrália, igual à maioria dos países, ao não existirem leis que proibam ou regulem a IAD, sua aplicação depende do critério do médico e da aceitação do casal (KLAUS & QUINN, 1977).

Em Israel, as três diferentes religiões monoteístas seculares se opõem em aceitar a IAD. Para evitar conflito entre população e religiões, o governo, através do Ministério da Saúde, não estabeleceu leis e sim normas regulamentadoras para equacionar o problema.

Dessa forma, o governo e as instituições não se envolvem com questões éticas e religiosas. Assim as decisões são tomadas entre os casais, doadores e serviços de saúde institucionais (MOR-YOSEF & SCHENCKER, 1995).

Do ponto de vista legal, é imprescindível um documento de consentimento firmado pelo marido e sua esposa, individualmente; entretanto, é importante para aumentar a eficácia desse procedimento que o conteúdo desse documento seja somente admissível como uma prova em seu favor. Necessita ser informativo para o casal e, dirigido da forma mais específica possível aos aspectos que possam ser objeto de futuras demandas.

Há uma área de possível controvérsia entre o médico e as pacientes em que se efetua a IAD. Poderia acusar-se o médico de negligência se, em consequência da IAD, se produzisse uma pelviperitonite ou se o recém-nascido apresentasse malformações congênitas. No caso de se estabelecer uma relação causa-efeito entre a IAD e o problema que se apresenta, a defesa deveria basear-se fundamentalmente na demonstração de que o casal havia dado seu consentimento com a adequada informação e, que as técnicas se efetuaram de acordo com as normas recomendadas profissionalmente. Por tudo isso, pode ser conveniente para o médico demonstrar que o sêmen utilizado se encontrava isento de organismos patógenos e que o doador era normal quanto a antecedentes genéticos, exame físico e dados de laboratório.

Outro problema a se defrontar é o da legitimidade do recém-nascido. Ela é importante pelas diversas questões de herança, manutenção, indenizações, visitas e custódia em caso de litígio por divórcio ou por falecimento dos pais. Na realidade, estas

crianças serão particularmente vulneráveis aos transtornos que advêm de uma separação matrimonial. Na lei civil, e tão somente em alguns países, o critério que geralmente se utiliza nestes casos é de que o marido possa ter acesso no momento da concepção, o que realmente não pode aplicar-se à IAD. Portanto, a prova residiria na clara demonstração da procedência do recém-nascido mediante estudos médicos ou provando que o marido é infértil.

Pode-se dizer que a discussão de legitimidade e ilegitimidade é controvertida. O que claramente é necessário para os nascidos por IAD é que se reconheça o marido da mãe como pai, mediante a promulgação de uma lei semelhante àquela proposta nos Estados Unidos, "Lei uniforme sobre a paternidade", que permite que considere o marido, como o pai natural da criança (KLAUS & QUINN, 1977). Pelo geral, a criança recebe o nome do marido da mãe. Constitui aspecto legal interessante se a definição de pai pressupõe uma condição biológica. Sem dúvida a assinatura no documento apresenta-se como uma prova objetiva de que, no momento da declaração, o marido aceitava seu papel de pai, o que pode-se usar para impedir que o marido apresente, ao longo do tempo, provas para rediscutir sua paternidade e legitimidade do filho (WHELAN, 1978).

Provavelmente, a mesma atitude geral que hoje em dia manifesta a lei, ante o filho adotivo que solicita informação sobre seus pais biológicos, se aplicaria aos nascidos mediante IAD. Não há dúvida de que, nos países com legislação sobre este tema, se pode requerer judicialmente ao médico para que apresente toda sua informação clínica sobre o caso. Em decorrência de não existirem leis positivas a respeito, a defesa do "segredo profissional" só poderia manter-se ao demonstrar que fora em benefício da criança.

A maioria dos casais receptores deseja que todo o processo seja estritamente confidencial. Os dados sobre consultas, correspondência e tratamentos devem manejar-se, portanto, de forma extremamente responsável e confidencial, já que a filtração de informação sobre os mesmos poderia ser causa de demanda.

1.5. Estimulação ovariana

A inseminação artificial intra-uterina sob estimulação ovariana constitui um efetivo método para mulheres com ausência de fatores de esterilidade de causa tubárica. Da mesma forma, tem se descrito na literatura que as taxas de gestação aumentam quando se utilizam protocolos de estimulação ovariana. As bases para a introdução da estimulação ovariana iniciaram-se com Gemzell quando descreveu pela primeira vez a indução da ovulação e gravidez em mulher amenorréica com o uso de gonadotrofinas (GEMZELL, DICZFALUZY, TILLINGER, 1958).

Citrato de Clomifeno (CC)

O citrato de clomifeno foi introduzido por GREENBLATT et al. (1961). Logo a seguir, concluiu-se que “o citrato de clomifeno poderia ser uma importante ferramenta para prevenção e tratamento da infertilidade numa mulher jovem” (WHITELAW, 1963). A conveniência e efetividade dessa medicação oral teve rápida aceitação popular. Assim, outros pesquisadores relataram suas experiências com o uso de citrato de clomifeno, ao

longo da década de 60, em diferentes diagnósticos de anovulação, comprovando seu efeito benéfico (FISCH et al., 1989; DICKEY et al., 1992; 1993). Atualmente, todos que trabalham na área de infertilidade humana conhecem o papel do citrato de clomifeno e suas precisas indicações.

Gonadotrofina da mulher menopausada (hMG)

Lunefeld introduziu os derivados das gonadotrofinas da mulher menopausada (hMG) como sendo uma das principais substâncias indutoras da ovulação (LUNEFELD, MENZI, VOLET, 1960; 1962). Posteriormente, a hMG tornou-se aceita mundialmente como terapia para a indução da ovulação em mulheres anovuladoras crônicas e inférteis (DIAMOND & WENTZ, 1986).

A indução da ovulação em mulheres que apresentam ciclos anovulatórios constitui atualmente uma rotina comum entre os especialistas. Os resultados de gestações obtidas após seu emprego, em mulheres amenorréicas e/ou na presença de outros fatores de infertilidade determinantes de anovulação, constituem o princípio de sua utilização. Por outro lado, as menotropinas seriam utilizadas em mulheres anovulatórias somente depois que uma investigação de infertilidade seja confirmada e quando o uso de uma forma mais simples e mais econômica de estimular a ovulação, como o citrato de clomifeno, tenha falhado para conseguir gestação. Da mesma forma, o seu emprego somente deveria ser feito após eliminação de outros fatores de esterilidade, como a integridade da permeabilidade das trompas e uma adequada avaliação espermática.

Nas últimas décadas, com o desenvolvimento das tecnologias de reprodução assistida, teve-se ampliado o uso da hMG para mulheres com ciclos ovulatórios normais, quando é desejável uma superovulação, possibilitando maior chance de gravidez como é o caso da IAD.

Além das indicações da estimulação da ovulação em anovuladoras, sabe-se que a hMG tem aplicação em outros fatores de esterilidade, tais como: infertilidade inexplicada, fator masculino, fator cervical, endometriose e defeitos da fase lútea (DODSON & HANEY, 1991).

Hormônio Folículo-Estimulante altamente purificado (FSHhp)

Ficou demonstrado clinicamente a importância do incremento dos níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH) para estimular a atividade ovariana (BROWN, 1978). Foi verificado que a iniciação do crescimento folicular pré-ovulatório em humano ocorre dentro de um limite muito estreito de concentrações de FSH, sendo que 10% a 30% de incremento nos níveis de FSH exógeno seria suficiente para iniciar o desenvolvimento folicular pré-ovulatório.

Tanto o LH como o FSH estão presentes nas células gonadotrópicas e ambas, síntese e secreção parecem estar reguladas pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Em diferentes doses fisiológicas, a amplitude e a frequência de pulsos de GnRH variam e estão associadas com diferentes níveis de secreção de LH e FSH (FILICORI & FLAMIGNI, 1994). A ovulação de um folículo de Graaf é um processo biológico

dependente do disparo da onda de LH. Este evento é precedido pelo crescimento, desenvolvimento e seleção do folículo pré-ovulatório e está associado com mudanças específicas na diferenciação das células da teca e da granulosa (RICHARDS, 1980).

Inicialmente o FSH é responsável pela iniciação da produção do estradiol através da ativação do sistema enzima aromatase nas células da granulosa, seleção e crescimento folicular. O hormônio luteinizante (LH), por outro lado, desempenha um papel importante no suporte da esteroidogênese ovariana, estimulando as células tecais do ovário a produzir androgênios, precursores da síntese de estradiol.

Na última década, o FSH tem sido usado com êxito para estimular o crescimento folicular em mulheres inférteis. Suas indicações são para as mulheres inférteis que apresentem disfunção hipotalâmica-hipofisária, nas portadoras de síndrome de ovários policísticos e para indução do crescimento folicular múltiplo nas pacientes que se submetem às técnicas de fertilização assistida.

Nos últimos cinco anos, o FSH tem sido empregado, isolado ou em associação ao hMG, para induzir crescimento folicular múltiplo para as técnicas de reprodução assistida como Fertilização *in vitro*, e para estimular o crescimento folicular durante ciclos de mulheres que irão se submeter a IAD.

Finalmente, surgiram os preparados de FSH altamente purificados (FSHhp), os quais dispõem de uma alta atividade específica e são praticamente isentos de outras proteínas urinárias (maior que 95% de proteína presente é FSH) comparados com alguns dos preparados gonadotrópicos correntemente disponíveis. Deste modo, sendo quase

completamente isento de contaminação de outras proteínas, o FSHhp é recomendado para administração subcutânea, permitindo um maior grau de flexibilidade clínica, adesão da paciente e um menor risco de reações colaterais no local da injeção.

1.6. Complicações da inseminação intra-uterina

Como todo procedimento médico, a inseminação intra-uterina, seja IAD ou seja IAC, tem uma série de riscos que, embora raros em algumas ocasiões, podem ser tão graves que requerem intervenções de urgência e comprometem inclusive a vida das pacientes. Por isto, deve-se ter conhecimento das possíveis complicações que podem advir de uma IAD, devendo-se sobretudo, aprender a preveni-las e tratá-las.

Pode-se dividir as complicações da IAD nas derivadas da própria técnica, as próprias do uso da medicação indutora do desenvolvimento folicular múltiplo e, nas complicações da gravidez. Entre as primeiras, destaca-se a possibilidade de introduzir microorganismos no aparelho genital. De igual forma, a possibilidade de uma reação anafilática por uma inadequada preparação da amostra ou pelo uso de substâncias que provocam uma ativação das defesas do organismo, constitui uma possível complicação que se deve conhecer e saber tratar eficazmente. O aparecimento de anticorpos antiespermatozóides nas mulheres tratadas com IAD é também um tema que provoca debate.

Entre as complicações próprias da estimulação ovariana destacam-se a gestação múltipla e a hiperestimulação ovárica, que se constituem nas complicações mais frequentes e potencialmente perigosas da IAD.

A gravidez ectópica é também uma complicação da IAD, que se soma a maiores riscos de abortamento.

Em resumo, a IAD constitui-se numa opção terapêutica dentro das diversas indicações que apresentamos anteriormente, convertendo-se numa alternativa válida se o casal, com as características descritas, deseja conseguir uma gestação, uma vez que o sêmen azoospermico do marido é substituído por sêmen fértil de banco.

Classicamente, considerando que a IAD consistia somente na substituição de sêmen, presumia-se que a mulher não apresentasse alterações que pudessem contribuir para a fertilidade do casal. Como resultado disto, vem-se realizando inseminações em ciclos naturais, comprovando-se o momento da ovulação por diferentes métodos. Entretanto, o que se observa na prática, é a presença de uma associação de subfertilidade feminina, notadamente em sua função ovulatória. Para eliminar esse aspecto, tem sido sugerido a estimulação da ovulação para se obter melhores resultados.

Outro aspecto importante que pode influenciar nos resultados de um programa de IAD é a idade da mulher. É conhecido o declínio da fertilidade a partir de 35 anos de idade.

Um terceiro aspecto diz respeito ao diagnóstico da esterilidade do marido. Não está totalmente esclarecido a importância do tipo de esterilidade masculina (ausência total de espermatozoides - azoospermia ou a presença do fator masculino severo) nos resultados de IAD.

O número de ciclos de tentativas constitui também fator importante no prognóstico de IAD. Tem sido propostos esquemas com seis ciclos de tentativas com o objetivo de lograr melhores resultados. Não se pode, entretanto, desconsiderar o ônus que acarreta um grande número de inseminações em um mesmo casal.

A estimulação ovárica, sob seus diferentes esquemas para o desenvolvimento folicular múltiplo, o fator idade da paciente, o tipo de esterilidade masculina e o número de ciclos de tentativas são as variáveis propostas neste estudo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar as taxas de gestação de um programa de Inseminação Artificial com sêmen de doador, em Valência - Espanha, usando diferentes esquemas para a indução do desenvolvimento folicular.

2.2. Específicos

1. Avaliar as taxas de gestação por paciente e acumulada num programa de IAD.
2. Comparar as taxas de gestação por paciente e as taxas acumuladas de gestação em mulheres com ciclos naturais e com estimulação ovariana da ovulação.
3. Identificar qual o melhor esquema de estimulação para aplicação em IAD.
4. Comparar os resultados gestacionais obtidos com 3 e 6 ciclos nos diferentes grupos estudados.
5. Comparar a taxa acumulada de gestação nos grupos de ciclos naturais e estimulados de acordo com o tipo de esterilidade masculina (azoospermia ou fator masculino severo).
6. Avaliar a influência da idade num programa de IAD.

SUJEITOS E MÉTODO

3. SUJEITOS E MÉTODO

3.1. Desenho do estudo

O presente estudo constituiu-se numa pesquisa clínica longitudinal controlada.

Critério para seleção dos sujeitos

Participaram do estudo mulheres cujos parceiros apresentavam fator masculino de infertilidade, submetidas à IAD sob estimulação ovariana controlada ou não.

O critério de seleção dos sujeitos foi o de identificação pela revisão seqüencial dos prontuários de pacientes que participaram do programa de IAD, no caso todas as mulheres submetidas ao mínimo de uma e ao máximo de seis inseminações, durante o período de janeiro de 1990 a dezembro de 1994.

Crêterios de inclusão

- Fator masculino de infertilidade (azoospermia e fator masculino severo).
- Ausência de fator ovulatório.
- Trompas permeáveis.
- Cavidade uterina normal.
- Idade da mulher entre 20 e 40 anos.
- Ausência de patologia médica.
- Ausência de patologia ginecológica diagnosticada.

3.2. Variáveis estudadas

Variáveis independentes

1. Estimula o ovariana: Tecnologia empregada para estimula o do desenvolvimento folicular múltiplo. As pacientes foram assim distribuídas:

- **Ciclos Naturais (CN)** - Nenhum esquema de estimula o.
- **Citrato de Clomifeno (CC)** - Dose de 100 mg iniciando-se no 3^o dia do ciclo (Figura 1).

- **Gonadotrofina de mulher menopausada (hMG)** - 1000 UI, iniciando se a partir do 3o. dia do ciclo (Figura 2).
- **Hormônio Foliculo-Estimulante altamente purificado (FSHhp)** - 150 UI, iniciando-se a partir do 3o. dia do ciclo (Figura 2).
- Em todas as pacientes foi induzida a ovulação, empregando uma dose de **5.000 UI de Gonadotrofina coriônica humana (hCG)**, de acordo com o resultado da monitorização ecográfica endovaginal.

2. Idade: Idade da mulher, em anos, no momento da inseminação.

3. Fator masculino de esterilidade

- **Azoospermicos:** Parceiros que não apresentavam ao espermograma (mínimo de três) espermatozóides no ejaculado.
- **Fator Masculino Severo:** Parceiros que apresentavam ao espermograma (mínimo de três) ou após capacitação um ou mais de um dos seguintes parâmetros:
 - ◆ **Número de espermatozóides:** Inferior a 1.000.000 de espermatozóides/ml.
 - ◆ **Mobilidade espermática:** Concentração inferior a 500.000 espermatozóides/ml com mobilidade linear progressiva prejudicada.

- ◆ **Morfologia:** Percentagem de formas normais inferior ou igual a 14% (KRUGER, et al., 1988).

Variáveis dependentes

- **Taxa de gestação por paciente:** Percentagem de gravidez clínica (visualização ecográfica do saco gestacional mediante ecografia transvaginal) obtida para cada paciente.
- **Taxa acumulada de gestação:** Percentagem de gestação clínica após três e seis ciclos de tratamento.

3.3. Procedimentos realizados

Monitorização ecográfica do crescimento folicular

Em todas as pacientes foi realizada ecografia transvaginal, a partir de oitavo dia do ciclo, diariamente, até que o folículo dominante alcançasse 19-20 mm de diâmetro.

Indução da ovulação

Em todas as pacientes foi induzida a ovulação, empregando uma dose de 5.000 UI de hCG, no dia em que o folículo dominante apresentava um diâmetro de **19-20 mm**. O dia em que foi feita a aplicação da injeção de hCG foi considerado “**dia zero**”.

Momento da Inseminação

Todas as inseminações foram realizadas nos dias +1 e +2 após a administração de hCG.

Material de inseminação

As inseminações foram feitas com sêmen de banco, de doadores do próprio Instituto, os quais cumpriam todos os requisitos da American Fertility Society para poder ser utilizado. As diretrizes desse processo estão descritas no apêndice deste trabalho.

Uma vez descongelado, o sêmen do doador foi capacitado sendo os espermatozóides separados do plasma seminal, através da Técnica de Percoll. Os gradientes utilizados foram duas camadas a 90% e 45% (Apêndice).

Local da inseminação

Através de uma seringa de insulina acoplada a uma cânula fina, introduziu-se 0,5 ml de sêmen capacitado dentro da cavidade uterina. Adotou-se o critério de não eliminar o muco cervical antes da passagem pelo canal cervical. Naqueles casos onde houve dificuldade ao introduzir a cânula através do orifício cervical, ou quando havia uma ante ou retroversão uterina exagerada, utilizou-se uma pinça de Pozzi para fixar o colo e ao mesmo tempo suavizar o ângulo interno entre este e o útero. Após o depósito do conteúdo, a cânula foi retirada suavemente.

Obs.: Todos os procedimentos clínicos, diagnósticos e terapêuticos empregados foram realizados pelos mesmos profissionais que compõem a equipe do "staff" do Instituto Valenciano de Infertilidade.

Descanso pós-inseminação

Todas as pacientes, uma vez realizada a inseminação intra-uterina, permaneceram em posição de decúbito supino durante 10 minutos, com o objetivo de apoiar psicologicamente o casal já que, em geral, pensam que o retorno às atividades de imediato pressupõe a perda do sêmen, podendo influenciar negativamente na eficácia do processo.

Crítérios de descontinuação

- Ausência de resposta folicular.
- Resposta folicular superior a 6 folículos de 15 mm de diâmetro, pelo risco de desenvolver síndrome de hiperestimulação ovariana assim como gestação multifetal, critério este obtido de trabalhos precedentes realizados na Instituição (CASTELVÍ et al., 1992).

3.4. Acompanhamento dos sujeitos

Suporte da fase lútea

Todas as mulheres submetidas ao programa de IAD receberam 2.500 UI de hCG nos segundo, quarto e sexto dias após a segunda inseminação.

Diagnóstico de gestação

Diagnóstico bioquímico

O diagnóstico de gravidez bioquímica foi realizado mediante o Teste Imunológico de Gestação na urina do décimo-sétimo dia, após a segunda inseminação.

Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico de gestação foi feito através da visualização ecográfica de saco gestacional mediante ecografia transvaginal. Para efeito deste trabalho, foram computadas somente as gestações clínicas.

3.5. Coleta de Dados

Os dados deste estudo foram obtidos dos prontuários das pacientes que se submeteram a IAD e coletados em fichas pré-codificadas com informações dos receptores e dos doadores.

3.6. Processamento dos Dados

Foi criado um banco de dados no qual as informações foram arquivadas, utilizando-se o programa DBASE 4. Os dados foram digitados duas vezes para identificar

inconsistências e códigos ilícitos por meio do mesmo programa. Foram feitas todas as correções antes do início do processo de tabulação.

3.7. Análise dos Dados

A análise estatística dos dados foi realizada em duas fases:

A primeira, exploratória, visou condensar a informação disponível em várias quantidades descritivas.

O conceito de **ciclo** pode ser utilizado na análise no sentido de **oportunidade de gestação**, isto é: um tempo de exposição como utilizado nas técnicas de análise estatística de dados de sobrevivência.

Uma outra característica importante dos dados da pesquisa é a presença de **observações censuradas**, isto é, de dados fornecidos pelas pacientes (a) cuja permanência no estudo foi limitada após 1, 2, 3, 4 ou 5 tentativas (“desistentes”) ou (b) que fracassaram após a sexta tentativa (“persistentes sem sucesso”).

Também foi calculada a mediana da variável “tentativas até obter gestação” para cada um dos grupos de estudo com o intuito de exibir a intensidade de ação da estratégia terapêutica nos quatro grupos distintos.

O risco positivo de gestação após n tentativas foi calculado mediante a seguinte fórmula:

$$R(n,G) = \frac{1000 \times N_G}{N_{TOT}}$$

onde N_G é o número total de gestações no grupo estudado, obtidas após n tentativas e N_{TOT} é o número total de oportunidades oferecidas nas n tentativas.

Uma análise utilizando a estatística de qui-quadrado foi utilizada para revelar a quantidade de pacientes com insucesso após seis tentativas, e estabelecer significância entre os três grupos de estimulação ovariana, utilizando (χ^2 , gl, $0,5\% < P < 1\%$).

Com o intuito de referir o “risco positivo de gestação” (chance de gravidez) é $R(n,G)$ dos três grupos com estimulação ovárica ao correspondente risco $R(n,CN)$ do grupo de ciclos naturais, foram também calculadas taxas relativas de gestação após n tentativas para $n = 3$ e $n = 6$, definidas como quocientes $R(n,G)/R(n,CN)$ dos correspondentes riscos.

A segunda fase da análise estatística procurou avaliar se as diferenças entre taxas de interesse foram reais, utilizando testes de significância estatística.

As taxas acumuladas de gestação foram calculadas utilizando o estimador de Kaplan-Meier, que utiliza todos os dados, sejam ou não censurados.

Como as taxas acumuladas de gestação dependem do número de ciclos tentados, a evidência sobre possíveis diferenças entre as taxas deve ser ponderada mediante um teste estatístico que utilize a informação completa sobre o desenvolvimento de gestações em todas as pacientes dos grupos comparados. Esse teste baseia-se na fórmula:

$$L = \frac{(O_A - E_A)^2}{E_A} + \frac{(O_B - E_B)^2}{E_B}$$

Ele é o logarítmico (logrank test), na variante de Savage (PETO et al, 1976; 1976), que mede o afastamento entre números observados O_A , O_B e números esperados E_A , E_B de gestações nos grupos comparados A (Azoospermicos) e B (Fator masculino severo).

O teste foi empregado para comparar as taxas acumuladas de gestação no grupo de ciclos naturais (CN) e no grupo formado pelos pacientes sob estimulação ovariana. A significância desses resultados é avaliada utilizando a distribuição de qui-quadrado, com um grau de liberdade.

O mesmo teste, foi aplicado (a) na comparação das taxas acumuladas de gestação do grupo A formado pelas pacientes tratadas com ciclos naturais (CN) possuindo parceiros azoospermicos e do grupo B, formado pelas restantes pacientes do grupo CN com

parceiros de fator masculino de esterilidade e (b) na comparação analógica entre as pacientes que receberam estimulação ovariana.

O teste de logrank foi utilizado para comparar as taxas acumuladas nos quatro grupos entre si. Neste caso, a distribuição de referência foi a de qui-quadrado com três graus de liberdade.

As comparações (a), (b) e a comparação quádrupla foram também aplicadas aos dados restritos aos ciclos 1, 2 e 3 e aos restritos aos ciclos 4, 5 e 6.

Finalmente, uma análise de tabelas de contingência utilizando o teste de homogeneidade do qui-quadrado, foi realizada (a) para pesquisar o efeito da idade como fator prognóstico, usando os dados disponíveis e (b) para estudar a significância das taxas de insucesso dos quatro tratamentos após seis ciclos.

3.8. Aspectos Éticos

O estudo foi realizado segundo critérios adotados pelo IVI, baseados nas normas da AFS e OMS. Foi respeitado o compromisso de sigilo de ambos os participantes do tratamento (casais receptores e doadores). Todos os casais assinaram um termo de consentimento informado, após lerem e discutirem seus detalhes, antes de iniciar o tratamento, bem como os doadores que concordaram em fazer parte do banco de sêmen,

não apresentando assim implicações éticas outras que não a manutenção da confiabilidade das informações trabalhadas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Foram realizadas inseminações intra-uterinas com sêmen de doador em 480 mulheres (1429 ciclos, sendo 420 naturais e 1009 em estimulados).

Desses casais, 235 eram mulheres cujos maridos apresentavam diagnóstico de azoospermia, e 245 mulheres, cujos maridos apresentavam esterilidade de causa masculina severa.

Os 480 casais apresentavam história de esterilidade média de 4.6 ± 1.1 anos. A idade média das mulheres foi de 31.8 ± 4.2 anos. No grupo estudado, após seis ciclos de inseminações, obteve-se um total de 253 gestações, logrando uma taxa de gestação por paciente de 52.7%. A taxa acumulada de gestação em seis ciclos foi de 67.1% (Tabela 1).

TABELA 1. RESULTADOS GLOBAIS DAS GESTAÇÕES OBTIDAS NO PROGRAMA DE IAD

Número do ciclo	Pacientes n	Gestações	Gestações (%) (a)	Desistência (b)	Taxa acumulada gestações (%) (c)
1	480	85	17,7±1,7	34	17,7±1,7
2	361	74	20,5±2,1	30	34,6±2,2
3	257	48	18,7±2,4	47	46,8±2,4
4	162	20	12,3±2,6	41	53,4±2,5
5	101	13	12,9±3,3	20	59,4±2,7
6	68	13	19,1±4,8	55	67,1±2,9
Total		253	52,7±2,3	172	67,1±2,9

- a) O erro padrão da porcentagem corresponde ao número de pacientes no início do correspondente ciclo.
- b) Nas desistências do ciclo 6 é exibido o número de pacientes sem gestação após a realização de 6 ciclos de tratamento. O total de desistências não inclui esse número.
- c) A taxa acumulada de gestação corresponde à estimativa de Kaplan-Meier. Seu erro padrão foi obtido com a fórmula de Greenwood.

A Tabela 2 mostra os resultados de gestações obtidas no grupo de pacientes sem estimulação que foi de 36,4% e uma taxa acumulada de gestação de 51,0%.

TABELA 2. GESTAÇÕES OBTIDAS NO PROGRAMA DE IAD NO GRUPO DE PACIENTES SEM ESTIMULAÇÃO OVARIANA (CICLOS NATURAIS).

Número do ciclo	Pacientes n	Gestações	Gestações (%) (a)	Desistência (b)	Taxa acumulada de gestações (%) (c)
1	132	16	12,1±2,8	7	12,1±2,8
2	109	12	11,0±3,0	17	21,8±3,7
3	80	10	12,5±3,7	20	31,6±4,3
4	50	5	10,0±4,2	17	38,4±4,8
5	28	2	7,1±4,9	5	42,8±5,4
6	21	3	14,3±7,6	18	51,0±6,4
Total		48	36,4±4,2	66	

- a) O erro padrão da porcentagem corresponde ao número de pacientes no início do correspondente ciclo.
- b) Nas desistências do ciclo 6 é exibido o número de pacientes sem gestação após a realização de 6 ciclos de tratamento. O total de desistências não inclui esse número.
- c) A taxa corresponde à estimativa de Kaplan-Meier. Seu erro padrão foi obtido com a fórmula de Greenwood.

Na tabela 3, pode-se observar os resultados dos diferentes esquemas de estimulação ovariana, observando-se que 58.9% das pacientes engravidaram, com uma taxa acumulada de gestação de 72.5%. Os detalhes de cada grupo podem ser vistos nas tabelas 4, 5 e 6.

TABELA 3. GESTAÇÕES OBTIDAS NO PROGRAMA DE IAD NO GRUPO DE PACIENTES SOB OS DIFERENTES ESQUEMAS DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA.

Número do ciclo	Pacientes n	Gestações	Gestações (%) (a)	Desistência (b)	Taxa acumulada de gestações (%) (c)
1	348	69	19,8±2,1	27	19,8±2,1
2	252	62	24,6±2,7	13	39,6±2,7
3	177	38	21,5±3,1	27	52,5±2,8
4	112	15	13,4±3,2	24	58,9±2,9
5	73	11	15,1±4,2	15	65,1±3,0
6	47	10	21,3±6,0	37	72,5±3,1
Total		205	58,9±2,6	106	

- a) O erro padrão da porcentagem corresponde ao número de pacientes no início do ciclo correspondente.
- b) Nas desistências do ciclo 6 é exibido o número de pacientes sem gestação após a realização de 6 ciclos de tratamento. O total de desistências não inclui esse número.
- c) A taxa corresponde à estimativa de Kaplan-Meier. Seu erro padrão foi obtido com a fórmula de Greenwood.

TABELA 4. GESTAÇÕES OBTIDAS NO PROGRAMA DE IAD NO GRUPO DE PACIENTES SOB ESTIMULAÇÃO OVARIANA COM CITRATO DE CLOMIFENO (CC).

Número do ciclo	Pacientes n	Gestações	Gestações (%) (a)	Desistência (b)	Taxa acumulada de gestações (%) (c)
1	30	5	16,7±6,8	1	16,7±6,8
2	24	3	12,5±6,8	2	27,1±8,2
3	19	2	10,5±7,0	1	34,8±8,9
4	16	2	12,5±8,3	1	42,9±9,5
5	13	2	15,4±10,0	0	54,3±10,5
6	11	2	27,3±13,4	9	65,8±10,5
Total		16	53,3±9,1	5	

- a) O erro padrão da porcentagem corresponde ao número de pacientes no início do correspondente ciclo.
- b) Nas desistências do ciclo 6 é exibido o número de pacientes sem gestação após a realização de 6 ciclos de tratamento. O total de desistências não inclui esse número.
- c) A taxa corresponde à estimativa de Kaplan-Meier. Seu erro padrão foi obtido com a fórmula de Greenwood.

TABELA 5. GESTAÇÕES OBTIDAS NO PROGRAMA DE IAD NO GRUPO DE PACIENTES SOB ESTIMULAÇÃO OVARIANA COM GONADOTROPINA DE MULHER MENOPAUSADA (hMG).

Número do ciclo	Pacientes n	Gestações	Gestações (%) (a)	Desistência (b)	Taxa acumulada de gestações (%) (c)
1	164	33	20,1±3,1	11	20,1±3,1
2	120	30	25,0±4,0	8	40,1±3,9
3	82	15	18,3±4,3	23	51,1±4,1
4	44	6	13,6±5,2	5	57,7±4,4
5	33	4	12,1±5,7	13	62,8±4,5
6	16	3	18,8±9,8	13	69,8±5,2
Total		91	55,5±3,9	60	

- a) O erro padrão da porcentagem corresponde ao número de pacientes no início do correspondente ciclo.
- b) Nas desistências do ciclo 6 é exibido o número de pacientes sem gestação após a realização de 6 ciclos de tratamento. O total de desistências não inclui esse número.
- c) A taxa corresponde à estimativa de Kaplan-Meier. Seu erro padrão foi obtido com a fórmula de Greenwood.

TABELA 6. GESTAÇÕES OBTIDAS NO PROGRAMA DE IAD NO GRUPO DE PACIENTES SOB ESTIMULAÇÃO OVARIANA COM HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE (FSHhp).

Número do ciclo	Pacientes n	Gestações	Gestações(%) (a)	Desistência (b)	Taxa acumulada de gestações (%) (c)
1	154	31	20,1±3,2	15	20,1±3,2
2	108	29	26,9±4,3	3	41,6±4,1
3	76	21	27,6±5,1	3	57,7±4,2
4	52	7	13,5±4,7	18	63,4±4,2
5	27	5	18,5±7,5	2	70,2±4,4
6	20	5	25,0±9,7	15	77,6±4,4
Total		98	63,6±3,9	41	

- a) O erro padrão da porcentagem corresponde ao número de pacientes no início do correspondente ciclo.
- b) Nas desistências do ciclo 6 é exibido o número de pacientes sem gestação após a realização de 6 ciclos de tratamento. O total de desistências não inclui esse número.
- c) A taxa corresponde à estimativa de Kaplan-Meier. Seu erro padrão foi obtido com a fórmula de Greenwood.

A Tabela 7 mostra os resultados nos diversos grupos, ciclos naturais e sob estimulação ovariana, levando-se em consideração o número mediano de ciclos e os resultados com 3 e 6 ciclos. Observamos melhores resultados no grupo de ciclos estimulados, notadamente no grupo com FSHhp. Nota-se resultados muito parecidos com 3 e com 6 ciclos. O número mediano de ciclos para se obter resultados gestacionais positivo foi praticamente o dobro no grupo de ciclos naturais, quando comparado com o grupo sob estimulação ovariana.

TABELA 7. DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS GESTACIONAIS EM IAD COM CICLOS NATURAIS E ESTIMULADOS SEGUNDO O NÚMERO TENTATIVAS.

Grupo	Quantidade total de ciclos	Número mediano de ciclos (*)	Risco de sucesso após 3 ciclos (**)	Risco de sucesso após 6 ciclos (**)	Risco de insucesso após 6 ciclos
CN (N=132)	420	5,8	118,4	114,3	42,9
CC (N=30)	113	4,6	137,0	141,6	79,6
hMG (N=164)	459	2,9	213,1	198,3	28,3
FSHhp (N=154)	437	2,5	239,6	224,3	34,3
Estimulação ovariana (N=348)	1009	2,8	217,5	203,2	36,7
Total (N=480)	1429	3,5	188,5	177,0	38,5

$$\chi^2 = 9,26 \quad \text{gl} = 2 \quad 0,005 < P < 0,01$$

N Número de pacientes no grupo.

(*) Estimativa da mediana da distribuição do número de ciclos necessários para obter gestação. Ela é calculada por interpolação linear utilizando a estimativa de Kaplan-Meier.

(**) Obtido mediante a fórmula $1000 \times (\text{Número total de gestações obtidas}) / (\text{Quantidade total de oportunidades})$.

Com o intuito de referir o “risco de gestação” (chance de gravidez) dos três grupos com estimulação ovárica ao correspondente risco do grupo de ciclos naturais, na Tabela 8, foram calculadas as taxas relativas de gestação após n ciclos para $n=3$ e $n=6$, definidas como quocientes dos correspondentes riscos. A taxa relativa de gestação do grupo FSHhp após 3 e 6 ciclos foi de 2,03 e 1,97. Indicando que se aplicado em 3 ou 6 ciclos, o tratamento com FSHhp resulta no dobro de gestações que se poderia obter com Ciclos Naturais.

TABELA 8. TAXAS RELATIVAS DE GESTAÇÃO OBTIDAS NO PROGRAMA DE IAD. RESULTADOS OBTIDOS MEDIANTE ESTIMULAÇÃO OVARIANA COM CC, HMG E FSHhp COM REFERÊNCIA A CICLOS NATURAIS (CN).

Grupo	Taxa relativa de gestação após 3 ciclos (a)	Taxa relativa de gestação após 6 ciclos (a)
CC	1,16	1,27
hMG	1,81	1,73
FSHhp	2,03	1,97
Estimulação ovariana	1,84	1,78

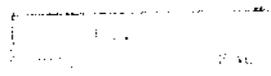
- a) Se $R(n,G)$ é a chance de sucesso após n tentativas para pacientes do grupo G (Estimuladas), a taxa relativa de gestação do grupo G é o quociente $R(n,G)/R(n,CN)$.

Uma outra comparação é a de todas as taxas acumuladas de gestação exibidas nas Tabelas 2, 4, 5 e 6 para os quatro grupos da investigação, que denominamos CN, CC, hMG e FSHhp. A Tabela 9 mostra que existe evidência moderada de diferenças reais entre os quatro conjuntos de taxas, devido essencialmente às diferenças nos três primeiros ciclos.

TABELA 9. ANÁLISE COMPARATIVA DAS TAXAS ACUMULADAS DE GESTAÇÃO ENTRE OS VÁRIOS GRUPOS, SEGUNDO O NÚMERO DE CICLOS.

Comparação	Estatística L	Graus de liberdade	Nível de significância
CN vs. CC vs. hMG vs. FSHhp (todos os 6 ciclos)	9,72	3	$0,01 < P < 0,02$
CN vs. CC vs. hMG vs. FSHhp (ciclos 1, 2 3)	9,13	3	$0,02 < P < 0,05$
CN vs. CC vs. hMG vs. FSHhp (ciclos 4, 5, 6)	1,04	3	NS

NS = Não significativo



Nas Tabelas 10 e 11 pode-se observar os resultados obtidos no grupo de ciclos naturais com parceiros azoospérmicos e com fator masculino severo. Observa-se melhores resultados no grupo dos azoospérmicos.

TABELA 10. GESTAÇÕES OBTIDAS NO PROGRAMA DE IAD PARA PACIENTES COM CICLOS NATURAIS E COM PARCEIROS AZOOSPÉRMICOS.

Número do ciclo	Pacientes n	Gestações	Gestações (%) (a)	Desistência (b)	Taxa acumulada de gestações (%) (c)
1	72	12	16,7±4,4	2	16,7±4,4
2	58	9	15,5±4,8	6	29,6±5,4
3	43	7	16,3±5,6	15	41,1±6,0
4	21	3	14,3±7,6	2	49,5±6,9
5	16	2	12,5±8,3	2	55,8±7,3
6	12	2	16,7±10,8	10	63,2±7,7
Total		35	48,6±5,9	27	

- a) O erro padrão da porcentagem corresponde ao número de pacientes no início do correspondente ciclo.
- b) Nas desistências do ciclo 6 é exibido o número de pacientes sem gestação após a realização de 6 ciclos de tratamento. O total de desistências não inclui esse número.
- c) A taxa corresponde à estimativa de Kaplan-Meier. Seu erro padrão foi obtido com a fórmula de Greenwood.

TABELA 11. GESTAÇÕES OBTIDAS NO PROGRAMA DE IAD PARA PACIENTES COM CICLOS NATURAIS E COM PARCEIROS COM FATOR MASCULINO SEVERO DE ESTERILIDADE.

Número do ciclo	Pacientes n	Gestações	Gestações (%) (a)	Desistência (b)	Taxa acumulada de gestações (%) (c)
1	60	4	6,7±3,2	2	6,7±3,2
2	51	3	5,9±3,3	6	12,2±4,3
3	36	3	8,3±4,6	15	19,5±5,7
4	29	2	6,9±4,7	2	25,0±6,5
5	12	0	0,0±0,0 (*)	2	25,0±6,5 (*)
6	10	1	10,0±9,5	10	32,5±9,2
Total		13	21,7±5,3	27	

- a) O erro padrão da porcentagem corresponde ao número de pacientes no início do correspondente ciclo.
- b) Nas desistências do ciclo 6 é exibido o número de pacientes sem gestação após a realização de 6 ciclos de tratamento. O total de desistências não inclui esse número.
- c) A taxa corresponde à estimativa de Kaplan-Meier. Seu erro padrão foi obtido com a fórmula de Greenwood.
- (*) Corresponde a um plateau de dois ciclos na taxa acumulada de gestação.

As Tabelas 12 e 13 mostram os resultados no grupo com estimulação ovariana, com parceiros azoospérmicos e com fator masculino severo. Comparando os dois grupos para avaliar a utilidade prognóstica do fator masculino de esterilidade para o grupo das pacientes que submeteram a estimulação ovariana, não se observou diferenças significativas.

TABELA 12. GESTAÇÕES OBTIDAS NO PROGRAMA DE IAD EM PACIENTES SOB ESTIMULAÇÃO OVARIANA COM PARCEIROS AZOOSPÉRMICOS.

Número do ciclo	Pacientes n	Gestações	Gestações (%) (a)	Desistência (b)	Taxa acumulada de gestações (%) (c)
1	163	35	21,5±3,2	7	21,5±3,2
2	121	24	19,8±3,6	6	37,0±3,8
3	91	24	26,4±4,6	14	53,7±4,1
4	53	6	11,3±4,4	12	58,9±4,1
5	35	7	20,0±6,8	1	67,1±4,3
6	27	5	18,5±7,5	22	73,2±4,3
Total		101	62,0±3,8	40	

- a) O erro padrão da porcentagem corresponde ao número de pacientes no início do correspondente ciclo.
- b) Nas desistências do ciclo 6 é exibido o número de pacientes sem gestação após a realização de 6 ciclos de tratamento. O total de desistências não inclui esse número.
- c) A taxa corresponde à estimativa de Kaplan-Meier. Seu erro padrão foi obtido com fórmula de Greenwood.

TABELA 13. GESTAÇÕES OBTIDAS NO PROGRAMA DE IAD PARA PACIENTES SOB ESTIMULAÇÃO OVARIANA E COM PARCEIROS DE FATOR MASCULINO SEVERO.

Número do ciclo	Pacientes n	Gestações	Gestações (%) (a)	Desistência (b)	Taxa acumulada de gestações (%) (c)
1	185	34	18,4±2,8	20	18,4±2,8
2	131	38	29,0±4,0	8	42,1±3,8
3	85	14	16,5±4,0	13	51,6±3,9
4	58	9	15,5±4,8	11	59,1±4,1
5	38	4	10,5±5,0	12	63,4±4,2
6	22	5	22,7±8,9	17	71,7±4,6
Total		104	56,2±3,6	64	

- a) O erro padrão da porcentagem corresponde ao número de pacientes no início do correspondente ciclo.
- b) Nas desistências do ciclo 6 é exibido o número de pacientes sem gestação após a realização de 6 ciclos de tratamento. O total de desistências não inclui esse número.
- c) A taxa corresponde à estimativa de Kaplan-Meier. Seu erro padrão foi obtido com a fórmula de Greenwood.

Na Tabela 14 podemos observar que existe diferenças entre os resultados obtidos em casais com parceiros azoospermicos e com fator masculino severo, apenas no grupo de ciclos Naturais, ao se considerar os 3 primeiros ciclos.

TABELA 14. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE CICLOS NATURAIS E ESTIMULADOS SEGUNDO O FATOR MASCULINO DE ESTERILIDADE NOS TRÊS PRIMEIROS CICLOS.

Comparação	Estatística L	Graus de liberdade	Nível de significância
CN vs. Estimulação	11,97	1	$P < 0,01$
Azoosp. vs. F.M.S. (CN)	7,03	1	$0,005 < P < 0,01$
Azoosp. vs. F.M.S. (Estimulação ovariana)	0,38	1	NS

NS = Não significativo

F.M.S. = Fator Masculino Severo

A mesma análise, considerando-se os resultados dos ciclos 4 a 6, pode ser vista na Tabela 15, onde se evidencia não haver mais as diferenças observadas nos 3 primeiros ciclos.

TABELA 15. ANÁLISE COMPARATIVA DE CICLOS NATURAIS E ESTIMULADOS, SEGUNDO O FATOR MASCULINO DE ESTERILIDADE, DO 4^o AO 6^o CICLOS.

Comparação	Estatística L	Graus de liberdade	Nível de significância
CN vs. Estimulação	2,15	1	NS
Azoosp. vs. F.M.S. (CN)	3,70	1	NS
Azoosp. vs. F.M.S. (estimulação ovariana)	0,06	1	NS

NS = Não significativo.

F.M.S. = Fator masculino severo

As Tabelas 16, 17 e 18 mostram os resultados gestacionais em Ciclos Naturais e Estimulados, segundo a faixa etária de todo o grupo. A Análise estatística nos revela haver diferenças significativas.

TABELA 16. RESULTADO GLOBAL DE GRAVIDEZ EM PROGRAMA DE IAD SEGUNDO FAIXA ETÁRIA DAS PACIENTES EM CICLOS ESTIMULADOS E NATURAIS

IDADE	PACIENTES (N)	CICLOS (N)	GESTACÕES	
			(N)	%
< 30 ANOS	211	710	117	55.5
31 - 35 ANOS	189	494	100	52.9
> 35 ANOS	80	225	36	45.0
TOTAL	480	1429	253	52.7

$\chi^2 = 2,54$

gl = 2

NS

TABELA 17. RESULTADO DE GRAVIDEZ EM UM PROGRAMA DE IAD EM CICLOS NATURAIS, SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA

IDADE	PACIENTES (N)	CICLOS (N)	GESTAÇÕES	
			(N)	%
< 30 ANOS	43	137	17	39.5
31 - 35 ANOS	61	190	23	37.7
> 35 ANOS	28	93	8	28.5
TOTAL	132	420	48	36.4

$\chi^2 = 0,97$ gl = 2 NS

TABELA 18. RESULTADOS DE GESTAÇÃO EM UM PROGRAMA DE IAD EM CICLOS ESTIMULADOS E ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA:

IDADE	PACIENTES (N)	CICLOS (N)	GESTAÇÕES	
			(N)	%
< 30 ANOS	168	573	100	17.4
31 - 35 ANOS	128	304	77	25.3
> 35 ANOS	52	132	28	21.2
TOTAL	348	1009	205	58.9

$\chi^2 = 0,66$ gl = 2 NS

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que mais da metade das mulheres que entraram no programa de IAD engravidaram, sendo que o grupo que recebeu estimulação resultou em maior taxa de gestação que o grupo de ciclo natural. E, naquele grupo, no esquema com FSHhp foi o que melhor resultado gestacional se observou.

A taxa acumulada de gestação representa o índice mais fidedigno na valorização de um esquema de indução da ovulação. Ela nos indica que possibilidade de gestação pode se obter ao se submeter a um determinado número de ciclos de tratamento.

Analisando os dados, estimamos que 16% das pacientes que receberam CC, engravidariam no final do primeiro ciclo e que 65% das pacientes engravidariam ao completar seis ciclos de inseminação.

Do mesmo modo, ao utilizar hMG, teríamos uma taxa de gestação no final do primeiro ciclo de 20% e uma taxa acumulada de gravidez em torno de 70% ao final de seis ciclos.

Quando utilizado FSHhp, observou-se no final do primeiro ciclo, taxa igual ao

hMG (20%), porém, ao final de seis ciclos, uma taxa acumulada de gravidez de 77%.

Nos ciclos naturais, encontramos uma taxa de gestação, no final do primeiro ciclo de tratamento, de 12% e uma taxa acumulada de gestação, no final de seis ciclos, de 51%. Esses resultados diferem de outros autores, que encontraram 21% de gravidez, no final do primeiro ciclo, e 74% de gravidez, no final de seis ciclos (BRADSHAW et al., 1987).

Aspecto importante num programa de IAD é aquele que se refere ao uso de indutores da ovulação. A história nos mostra que as inseminações quer sejam homólogas ou de sêmen de doador eram realizadas em ciclos naturais, tal qual fora a primeira fertilização in vitro, de tal forma que protocolos de estimulação ovariana somente eram empregados nos casos de pacientes com comprovada anovulação crônica.

Todavia, atualmente observa-se um incremento dos serviços que utilizam a estimulação rotineira, embasados na hipótese de que, ao ter um maior número de ovócitos fecundáveis, as percentagens de gestação sejam também maiores. Além de que, a estimulação ovariana pode corrigir defeitos da fase lútea insuficiente, disfunções ovulatórias ou folículo luteinizado não roto, que poderiam passar despercebidos.

Esses dados demonstram que as taxas de gestação com IAD, em ciclos estimulados, são superiores às de ciclos naturais. Cabe destacar o trabalho multicêntrico realizado na França pela Federação CECOS (Centro d'Etude et de Conservation de Sperme Humanin) (LE LANNOU & LANSAC, 1989), onde, de um total de 6.083 casais, a taxa de

gestação por ciclo se situou em 8%. Assim mesmo, outros autores conseguiram taxa de gestação sem estimulação ovariana, entre 5 e 11%, observando-se que, com a estimulação ovariana, ocorre o incremento das taxas de gestação em IAD em face de um melhor controle e predição do momento da ovulação junto a uma maior produção ovocitária. Isso resulta altamente benéfico em pacientes que podem apresentar alguma disfunção ovárica, aumentando o número de ovócitos maduros disponíveis para a fecundação e, portanto, o número de embriões susceptíveis de implantação.

O benefício da utilização da estimulação ovariana na consecução de gestação tem sido estudado por vários autores. Assim DODSON & HANEY (1991), numa revisão de ciclos de IAC realizando inseminações intra-uterina, compararam ciclos não estimulados com ciclos estimulados com citrato de clomifeno e Gonadotrofina Menopáusica Humana (hMG). Analisaram os resultados com base na indicação de infertilidade de origem desconhecida, fator masculino, e endometriose, observando clara vantagem da utilização do citrato de clomifeno sobre aqueles ciclos nos quais não havia estimulação ovárica alguma. Por sua vez observaram melhores resultados quando se utilizava a estimulação com hMG. Estas diferenças apareceram em todos e cada um dos três grupos inférteis imputados de etiologia desconhecida, fator masculino e endometriose, destacando, não obstante, a diferença no grupo de endometriose.

Outro estudo interessante a destacar é o de CHAFFKIN (1991), que comparou a taxa de gestação numa população que só recebia estimulação ovárica, com uma segunda população em que se realizava apenas inseminações intra-uterina com sêmen do cônjuge (IAC-IIU) e uma terceira, na qual associava estimulação ovariana com a inseminação intra-

uterina. Observou-se que se produzia um significativo aumento do número de gestações no terceiro grupo, ou seja, naquele que recebia estimulação ovárica e inseminação intra-uterina conjuntamente.

Esses dois trabalhos, ainda que realizados numa população de IAC, representam a vantagem da união de IA-IIU com a estimulação ovárica pelos argumentos anteriormente expostos.

Partindo dessa premissa, sabendo que a estimulação ovárica nos vai proporcionar maior índice de resultados positivos, devemos perguntar-nos: qual é o protocolo de estimulação mais adequado? Como vimos nos trabalhos de Dodson & Haney, os protocolos com hMG superam em efetividade aqueles realizados com citrato de clomifeno.

Tem-se demonstrado em experimentos com ratas, uma tendência à formação de cistos foliculares residuais com a administração de hMG. Dados ainda não publicados pelo grupo do IVI tem mostrado que pacientes com estimulação ovárica que não lograram gestação nesse ciclo, a ocorrência de persistência de pequenos cistos foliculares remanescentes do ciclo anterior, ao utilizar hMG. Conseqüentemente, a presença desses cistos, no momento da menstruação, impede o início de uma nova estimulação, obrigando a um descanso temporal (REMOHÍ et al., 1995).

Por outro lado os resultados, quando se utilizou FSH (extraída de urina e, por conseguinte, com contaminação com LH), foram melhores que com hMG. Entretanto, a resposta do FSH *in vivo* não se traduz num efeito de contaminação de LH. Vistos estes

resultados, salienta-se que a estimulação com FSHhp seria o melhor protocolo. Embora, estudos clássicos em FIV, ao comparar a estimulação realizada com FSHhp com a que se efetua administrando hMG, não encontraram diferenças significativas entre elas (LAVY et al., 1988).

Se a utilização de FSH altamente pura na estimulação ocasiona menor número de remanescentes foliculares, permitir-nos-á a possibilidade de realização de ciclos de inseminação mais próximos, questão esta que segundo alguns autores favorece a possibilidade de gestação (SILVERBERG et al., 1992).

Outro aspecto importante que suscita curiosidade num programa de IAD é a questão do fator determinante da esterilidade masculina, senão vejamos: Dentre as indicações da IAD, podem-se formar dois grandes grupos: 1) ausência de espermatozóides no ejaculado (azoospermia) e 2) presença de espermatozóides, porém severamente afetados em um ou vários parâmetros, os quais não respondem ao tratamento médico, e/ou não tem conseguido gestação com outras técnicas de reprodução assistida.

A população estudada neste trabalho foi dividida em dois grupos, em função da qualidade do espermograma do parceiro infértil. No primeiro grupo, foram incluídos aqueles casais que apresentavam azoospermia, o segundo grupo foi representado por casais cujo espermograma apresentava oligoastenozoospermia severa (fator masculino severo).

São numerosos os trabalhos que têm comparado os resultados de IAD em ambas as populações, coincidindo, na maioria dos casos, que melhores resultados se obtém no grupo dos azoospérmicos.

Estudos prévios tem constatado que os casais de IAD com azoospermia tem uma percentagem de gestação maior que de casais cujo diagnóstico seja fator masculino severo (EMPERAIRE, GALZERE, AUDEBERT, 1982; CHAUHAN et al., 1989; EDVINSON et al., 1990). As análises desses estudos revelam que casais que se submetem a IAD por azoospermia têm uma percentagem de gestação maior do que a de casais cujo diagnóstico foi por fator masculino severo.

Esses achados estão respaldados por sólidos argumentos e são muitos os estudos retrospectivos que têm mostrado que, entre 5 e 20% dos homens que ao menos tem sido pai de um filho, tem apresentado, a posteriori, espermogramas anormais (KREMER, JAGER, KUIKEN, 1978; EMPERAIRE et al., 1980; 1982). Entretanto, muitos dos casais com estas características no espermograma acabam recorrendo a IAD.

Como o parceiro apresenta alguma expectativa de fertilidade, essas pacientes abandonam mais facilmente o programa do que aquelas outras e, não muitas vezes terminam por engravidar. Nessa situação, e deixando de lado a intervenção de um terceiro parceiro, a incidência de gravidez espontânea se explicaria pelos seguintes fatores:

1. Exposição prolongada e/ou
2. Grande capacidade fértil feminina.

Essa situação nos induz a acreditar que casais dotados de uma alta capacidade fértil feminina desaparecerão da população de casais sem filhos e, de outra forma, recorrerão a IAD pela subfertilidade masculina.

A explicação seria que numa população feminina existem mulheres férteis, sub-férteis e inférteis. A diferença do grupo azoospérmico em relação ao grupo com fator masculino severo é devido ao fato de haver presença de espermatozóides, neste último havendo possibilidade de se conseguir gestação, com algumas das mulheres férteis. Isto faz com que na população feminina correspondente ao grupo de Fator Masculino Severo que procura a IAD haja um menor número de mulheres férteis, comportando-se como uma população feminina selecionada, com uma proporção de subfertilidade maior.

Como isto não ocorre nos casos em que se realiza IAD em maridos azoospérmicos, a taxa de gestação com esta técnica deve ser superior nestes casais, dados já observados em trabalhos anteriores (EMPERAIRE et al., 1982), nos quais as taxas de gravidez global e por ciclo foram de 70% e de 10% na população azoospérmica, comparadas com 49% e 7% respectivamente, na população masculina subfértil severa, sendo estas diferenças estatisticamente significativas. Cabe destacar que o mesmo estudo realizado um ano antes, por esses mesmos autores, no mesmo grupo de casais, encontrou diferenças significativas, tanto na taxa de gestação por ciclo, em favor do grupo de azoospérmicos, como na exposição a inseminações durante nove meses. Embora tenha diminuído a diferença, a taxa global de gestação continuou sendo maior nos casais com azoospermia.

Cabe mencionar que nestes estudos não se realizou indução da ovulação para realizar a inseminação, o que torna um feito importante porque, realizada a indução da ovulação, não foram encontradas diferenças significativas entre ambos os grupos, pelo que se pode concluir que, ao realizar estimulação, elimina-se o fator de subfertilidade feminina

mencionado no grupo de azoospermia, o qual pode influir negativamente nos resultados de um programa de IAD.

Os resultados observados nesse estudo também confirmam esses achados. Encontramos uma taxa de gestação acumulada de 63% quando as inseminações foram realizadas em ciclos naturais e 73% quando inseminadas sob estimulação ovariana, nos casos de parceiros azoospermicos. No grupo de parceiros que apresentavam fator masculino severo de esterilidade, observamos taxas de 32% nos ciclos naturais e 71%, quando as pacientes receberam inseminação sob estimulação ovariana.

A literatura mostra que para a consecução de gestação, se praticava extensas séries de ciclos de inseminações. Mais recentemente houve uma tendência em analisar os efeitos determinados por esse prolongado tratamento bem como os pobres resultados advindos a partir de uma determinada quantidade de ciclos. Assim os trabalhos de BARRAT et al., (1989), descrevem um achatamento da curva de gestação, a partir do 6o. ciclo de inseminações. Por isso tem sido proposto não insistir com as inseminações além do 6o. ciclo, devendo-se optar, esgotadas essas tentativas, por outros métodos de fertilização assistida que possam garantir melhores resultados (CEFALU et al., 1988).

Ao analisar estatisticamente os resultados desse trabalho, o fizemos *a priori* medindo os resultados com seis ciclos e depois decidimos comparar os resultados gestacionais entre três e seis ciclos, onde observamos que não ocorre diferenças significativas nas taxas de gestação a partir do terceiro ciclo. Isso talvez, possa contribuir para sugerir novas propostas de quantidade de ciclos para os programas de IADs. Ou, de

outra forma, novos trabalhos prospectivos objetivando analisar esse parâmetro poderiam ser propostos.

A idade da mulher no programa de IAD foi também analisada, quanto as taxas de gestação. É bem conhecido que a idade avançada da mulher constitui fator negativo para gestação, ocorrendo maior incidência de baixas respondedoras e má qualidade dos ovócitos e seus produtos, além da reduzida quantidade de ovócitos fecundáveis, sobrepondo a baixa qualidade biológica, repercutindo nos processos de fecundação, divisão e implantação (SCHWARTZ et al., 1979; EDVINSON et al., 1990).

Em nosso material estudado, a idade superior a 35 anos não influiu negativamente nos resultados obtidos, não apresentando diferenças significativas com o grupo de mulheres abaixo de 30 anos. Isto é bem verdade, contrasta com as publicações pertinentes, porém, o número de pacientes acima de 35 anos talvez pudesse não ser representativo e outros estudos fossem necessários para a confirmação desses achados.

Nos últimos anos, a IAD tem passado por várias mudanças evolutivas. Antes, se utilizava sêmen fresco. Entretanto, devido ao potencial risco deste procedimento, para a transmissão de doenças infecciosas, atualmente a American Fertility Society recomenda a não utilização de sêmen fresco, devendo o mesmo permanecer durante seis meses de observação, após "screening" negativo do doador, antes da coleta e no final da janela de observação (AFS, 1988; AFS, 1993). Desta forma, o sêmen colhido deve ser criopreservado, respeitando esse intervalo de tempo. Com a criopreservação do sêmen

ocorre uma perda de espermatozóides móveis recuperados, e se tem observado na literatura, menores taxas de gestação que quando se utiliza sêmen fresco.

Observações realizadas, utilizando as pacientes como seu próprio controle, encontraram uma redução das taxas de gestação com sêmen criopreservado ao compará-las com as de sêmen fresco (RICHTER, HANNING, SHAPIRO, 1984). Por outro lado, há autores que não observaram tais diferenças (KEEL & WEBSTER, 1989).

Partindo do princípio de que se encontram maiores taxas de gestação com sêmen fresco, os centros de fertilização assistida procuram melhorar o processo de criopreservação e utilizam outras estratégias que incrementam a taxa de gestação, uma vez que são atualmente obrigados, legal e eticamente, a utilizar sêmen que ofereça maior segurança para as pacientes que se submetem a tal procedimento.

Com este objetivo, tem sido propostas várias tentativas para aumentar os resultados, tais como: melhorar a criopreservação (KEEL & WEBSTER, 1989), nos métodos de preparação espermática, adotar inseminação intra-uterina ao invés de cervical (BYRD et al., 1990; PATTON et al., 1992), utilizar duas inseminações, ao invés de apenas uma (CENTOLLA et al., 1990), assim como uma melhor monitorização da ovulação, quer espontânea quer induzida (KEMMANN et al., 1987) e a sincronização desta com a inseminação.

Como vemos no anexo, existem diversas técnicas de preparação do sêmen que, em teoria, são úteis e benéficas para a capacitação do sêmen e fundamentalmente, nos casos com um sêmen normal, como é o caso deste estudo, já que se trabalhou com sêmen de

doadores de provada fertilidade, ou seja, com um sêmen dentro dos parâmetros da normalidade, o qual responde bem ante qualquer dos três métodos de capacitação apontados.

Não obstante, optou-se pela capacitação com gradientes de percoll já que tem sido demonstrado que esse método proporciona menor presença de radicais livres que vão destruir as membranas dos espermatozóides, portanto, melhorando a capacidade de fertilização do sêmen. Há autores que, partindo dessa premissa, consideram que a utilização do Swim-up poderia estar sancionada pela lei.

O sêmen uma vez capacitado pode ser depositado em localização intracervical, intratubárico, intraperitoneal, intrafolicular ou intra-uterinamente.

A colocação do sêmen no canal cervical ou na vagina consegue menores taxas de gestação que aquelas inseminações no trato genital superior (KEMMANN et al., 1987; CHAFFKIN et al., 1991). É lógico argumentar com estes resultados já que, de alguma maneira, se aproxima o sêmen capacitado ao ovócito, diminuindo a distância que o espermatozóide há que percorrer e, ao mesmo tempo, ultrapassando a barreira da cérvix, sobretudo naqueles casos de infertilidade onde há a presença do fator cervical (URRY et al., 1988).

A qualidade do sêmen do doador é uma importante fonte de variabilidade no sucesso da IAD. Os dados da Fundação CECOS, mostraram que o mais importante predictor da capacidade de fertilização do sêmen era a motilidade pós-descongelamento: a

taxa de sucesso por ciclo foi de 7% quando a motilidade pós-descongelção era menor de 40% e 17%, quando maior de 65%.

Esse detalhe não avaliamos por não ser objetivo deste estudo.

Em outro estudo do CECOS usando sêmen criopreservado antes de quimioterapia e radioterapia, e selecionado por qualidade, foi demonstrado que nenhuma gravidez fora obtida com inseminação com menos de 0.5 milhão de espermatozóides móveis pós-descongelção. Usando entre 0.5 e 2 milhões de espermatozóides, a taxa de sucesso foi menor que 4% por ciclo; com mais de 2 milhões foi de 10% por ciclo; com mais de 10 milhões de espermatozóides móveis a taxa de sucesso foi de 15 % por ciclo.

Há diferentes trabalhos na literatura (MOGHISSI, 1986; BROWN et al., 1988; HUMMEL & TALBERT, 1989; BYRD et al., 1990; MORTIMER, 1990) que não concordam com o número de espermatozóides móveis necessários para obter uma boa percentagem de gestação com sêmen de doador. Entretanto, parece ainda haver um consenso de que quanto maior a concentração de espermatozóides móveis mais se obtêm as melhores percentagens de gravidez, embora, em estudo preliminar realizado no IVI (GOMEZ et al., 1994), se tenham conseguido as mesmas percentagens de gravidez, quando se utilizaram concentrações menores que 5 milhões, entre 5 e 10 e acima de 10 milhões de espermatozóides móveis progressivos. Isto motivou a realização de novas observações com concentrações ainda menores .

Salientamos que os primeiros trabalhos citados foram realizados com inseminação intracervical enquanto este último utilizou inseminação intra-uterina.

Um outro fator importante está claro: é a seleção do doador. Em nosso estudo, os doadores foram muito bem selecionados e, em nenhum caso, foram inseminadas concentrações com motilidade menor que 65%, valendo assim o esforço do banco de sêmen para proceder a um bom recrutamento de doador.

O segundo fator relacionado com as taxas de sucesso em IAD é o dia e o número das inseminações. No estudo mencionado, o momento adequado para realizar a inseminação foi usualmente estimado com base no gráfico da temperatura basal e no escore cervical. Existem estudos que concluíram que, através do controle da temperatura basal e do escore cervical, aproximando-se da ovulação, o momento ótimo parece ser do dia -2 ao dia 0, os que estariam coincidindo com o máximo do escore cervical. Normalmente, duas inseminações são feitas a um intervalo de 48 horas para cobrir este momento ótimo. Talvez tudo isso explique as baixas taxas de sucesso dos estudos mencionados.

Esse problema não foi observado neste estudo, uma vez que, mesmo nos ciclos naturais, a monitorização do folículo, e portanto da ovulação, fora feita por ultra-sonografia transvaginal, e, ao alcançar um folículo 19 mm, em todas as pacientes foi administrado hCG para definir o dia zero e, 24 horas após, realizava-se a primeira inseminação seguida da segunda, 24 horas após, ou seja, nos dias +1 e +2.

Em resumo, a análise realizada nesse estudo demonstrou claramente a diferença de resultados gestacionais ao se utilizar estimulação ovariana com relação aos resultados obtidos em ciclos naturais. Ora, se o que se pretende é exatamente a gravidez, torna-se óbvio lançar mãos dos recursos que aumentem essa probabilidade.

Ao se comparar os resultados gestacionais mediante os diferentes esquemas de estimulação, verificamos que o grupo que se utilizou do FSHhp obteve os melhores resultados. Não podemos esquecer que esse estudo foi realizado num País de primeiro mundo, cuja facilidade de conseguir o produto é grande (o governo patrocina o produto) e que talvez não fosse possível generalizar seu uso, devido ao obstáculo decorrente dos custos. Entendemos que embora os resultados com FSHhp foram significativamente melhores que os demais esquemas de indução da ovulação, o custo com este esquema é também superior aos outros. Apesar de não ter sido objetivo do trabalho, mas à guisa de informação, salientamos que certamente o custo de um tratamento influi na decisão de se submeter ao mesmo, e devemos ter esta sensibilidade quando oferecer a um casal a possibilidade prática de resolução da sua infertilidade.

O fator idade, por outro lado não influenciou nos resultados, apesar de que o grupo de mulheres acima de 35 anos não fosse talvez expressivo para inferir tal conclusão.

Mas o aspecto relevante desta avaliação foi o resultado gestacional obtido com inseminações intra-uterinas após estimulação, aos três ciclos de tentativas. Observou-se que os resultados gestacionais obtidos do 4o. ao 6o. ciclo não apresentaram diferenças significativas em relação aos três primeiros ciclos, fato esse ainda não demonstrado em nenhuma publicação anterior.

Finalmente, em que pese as indicações da IAD terem sofrido um grande impacto nos últimos 5 anos, com o advento da ICSI, certamente sua prática jamais será totalmente abandonada, uma vez que os elevados custos desse novo procedimento e a condição social

de muitos casais constituirão empecilho para seu emprego. Novas pesquisas nesse campo, talvez de forma prospectiva, serão necessárias para aclarar aspectos como a da satisfação familiar, custos e benefícios do tratamento.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. As taxas de gestação por paciente e a taxa acumulada de gestação em um programa de IAD foram de 52.7% 67.1%, respectivamente.
2. As taxas de gestação por paciente e a taxa acumulada de gestação foram superiores no grupo com estimulação da ovulação, quando comparadas com ciclos naturais.
3. O melhor esquema de estimulação ovariana para aplicação em IAD no estudo foi FSHhp.
4. Os resultados gestacionais obtidos com 3 e com 6 ciclos não foram diferentes entre os grupos estudados.
5. Os resultados gestacionais foram superiores no grupo de parceiros azoospermicos quando comparados com fator masculino severo, apenas no grupo com ciclos naturais e ao final do 3o.ciclo.
6. O fator idade não influenciou nos resultados gestacionais na população estudada.

APÊNDICE

7. APÊNDICE

7.1. Banco de sêmen

A possibilidade dos espermatozóides humanos se manterem vivos, durante anos e com capacidade fecundante, constitui uma realidade desde 1953, quando Bunge e Sherman conseguiram as primeiras gestações com sêmen congelado a - 70oC (neve carbônica) numa mistura prévia com glicerol a 10% (BUNGE & SHERMAN, 1953).

Quatro anos antes, havia sido demonstrado a ação crioprotetora que o glicerol exerce sobre os espermatozóides de mamíferos (POLGE, SMITH, PARKES, 1949). Posteriormente, iniciou-se a utilização de uma mistura contendo glicerol, gema de ovo e citrato de Sódio (IIZUKA & SAWADA, 1958).

Em 1963, Sherman substituiu a neve carbônica por nitrogênio líquido, com o qual a temperatura é muito menor (-196,5oC). Um ano após se conseguiram gestações com

sêmen congelado em nitrogênio líquido (PERLOFF, STEINBERGER, SHERMAN, 1971).

A técnica de conservação do sêmen humano é, desde então, uma realidade inquestionável.

Desde os primeiros anos da década de sessenta, não houve nenhum avanço técnico importante nesse campo, porém a técnica foi aperfeiçoada e simplificada por Schoysman; a ação do meio crioprotetor e do congelamento sobre o espermatozóide tornou-se melhor conhecida e sua aplicação prática viu-se difundida em todo mundo (SCHOYSMAN, 1964; SCHOYSMAN & DROUART, 1972).

Na tabela 19 estão resumidos os eventos mais importantes na técnica de congelamento do sêmen.

TABELA 19. EVOLUÇÃO DA TÉCNICA DE CONGELAMENTO DE SÊMEN

AUTORES	ANO	AVANÇOS
Jahnell	1938	Demonstra a resistência do espermatozóide humano a temperatura de dióxido de carbono sólido (-79°C).
Polge, Smith e Parkes	1949	Demonstram o efeito crioprotetor de glicerol sobre os espermatozoides de mamíferos.
Bunge e Sherman	1953	Conseguem as primeiras gestações humanas utilizando espermatozoides congelados a - 79°C
Iizuka & Sawada	1958	Introduzem como meio crioprotetor glicerol, gema de ovo-citrato de sódio.
Sherman	1963	Substitui o dióxido de carbono (-79°C) por Nitrogênio líquido (-196,5°C).
Perloff, Steinberger e Sherman	1964	Conseguem as primeiras gestações humanas com espermatozoides congelados em Nitrogênio líquido.
Schoysman, R.	1964	Simplificam e difundem a técnica da Europa
Fundação CECOS	1989	

Atualmente, os casais com desejos frustrados de descendentes, por uma causa masculina irreversível, podem dispor de uma técnica apropriada - a inseminação artificial com sêmen congelado de doador, o que lhe permite conseguir o filho desejado.

7.2. Doadores de sêmen

Sabe-se que a atitude dos doadores de sêmen apresenta pouca importância; embora sejam muitos os autores que a consideram de aspecto fundamental. Tanto as receptoras como o médico devem ter confiança absoluta que o sêmen a ser utilizado tenha sido obtido aplicando os níveis máximos de atenção médica, tanto no que se refere a sua procedência como na análise da própria amostra.

Muito tem se comentado sobre os motivos da doação. Inclusive o motivo mais inocente - o de uma compensação econômica, comparando-se com os doadores mercenários de sangue, citando-se inclusive a falsificação dos antecedentes patológicos para assegurar a cobrança pela doação.

Os doadores de sêmen tem sido considerados de distintas maneiras, desde aqueles "representando uma atitude irresponsável ante uma capacidade de procriação que Deus lhe tem dado", até "carentes de moral". Ademais foi observado entre eles, uma considerável proporção de psicopatas, até indivíduos com determinadas tendências sexuais e atitudes mentais aberrantes. Como se desconhece se estes caracteres são hereditários, estas

críticas tem indubitável importância. Assim mesmo, tem havido denúncias sobre a falta de responsabilidade por parte do doador a respeito de sua descendência biológica, embora haja argumentos contra esta atitude, uma vez que os filhos, por parte de seus pais biológicos, constituem uma atitude cultural ocidental já que, em sociedades africanas e australianas, são os familiares próximos os que se encarregam de cuidar da prole (KLAUS & QUINN, 1977).

Outras acusações que são lançadas contra os doadores é que, ou o fazem por egocentrismo, para a consecução de um determinado objetivo, ou como compensação a um físico totalmente carente de atrativo.

Entretanto, tem-se constatado que todos os doadores participantes deste trabalho constituem pessoas física e psiquicamente equilibradas, cuja motivação não foi outra que a de ajudar a um casal que tem problemas de fertilidade, à parte da motivação do aspecto econômico.

A procedência e seleção dos doadores de sêmen constituem uns dos aspectos mais discutidos do método. A Associação Americana de Fertilidade (AFS) tem publicado guias para a utilização de sêmen de doador (AFS, 1986) que de alguma maneira nos permite nortear este trabalho.

O ideal seria dispor de doadores entre os homens com fertilidade demonstrada e tenham tido filhos saudáveis. Estamos falando, por exemplo, da captação de doadores, nas maternidades, entre indivíduos que acabam de ser pais ou entre aqueles cujos casais foram tratados de infertilidade por fator feminino, recentemente com êxito, assim como aqueles que tiveram seu sêmen congelado antes de serem submetido a uma vasectomia. Em alguns

países, os profissionais das áreas de saúde que, conhecendo o problema, tornam-se doadores de sêmen, procedimento este proibido em nosso país por Resolução do Conselho Federal de Medicina (Anexo). De qualquer maneira em todos esses casos devem ser seguidas as regras da AFS e OMS.

Em algumas ocasiões, os casais insistem em que se adicione o sêmen do cônjuge com o do doador para a inseminação. Isto não é aconselhável pois, desta maneira diminuem as possibilidades de êxito, pois é possível existência de anticorpos antiespermáticos no sêmen do cônjuge que poderia alterar a qualidade do produto inseminado de tal sorte que, além de desaconselhar a mistura de sêmen, aconselha-se também a abstinência sexual do casal nos períodos férteis dos ciclos tratados com IAD.

7.3. Seleção de doadores

O doador em geral foi maior de idade, menor de 30 anos, voluntário, anônimo, física e psiquicamente sadio, com um nível de inteligência normal e sem antecedentes patológicos pessoais nem familiares.

Em geral se exigiu que os doadores fossem universitários para garantir um coeficiente intelectual ao menos superior ao da média.

A seleção dos doadores se fez por anamnese familiar e pessoal, exploração dos genitais, análises de sangue, espermograma e teste de congelamento.

A anamnese familiar foi orientada a detectar o estado de saúde dos familiares próximos assim como o grau de consangüinidade existente. Investigou-se em particular doenças de base hereditária. Durante a anamnese procurou-se descartar enfermidades como por exemplo mongolismo, surdomudez, esquizofrenia, coréia de Huntington, enfermidade de Tay Sachs, fibrose cística, distrofias musculares e as enfermidades ligadas ao cromossoma X. No estudo dos familiares do possível doador, foram considerados casos de afecções como a diabetes, as cardiopatias, a hipertensão, as malformações congênitas, motivos que levaram ao descarte do mesmo.

Na anamnese pessoal estudou os antecedentes patológicos do doador, as enfermidade sofridas na infância e adolescência descartando de entrada aqueles doadores que apresentassem histórias pessoais de enfermidade de entidade como a tuberculose infantil, hepatites virais, cardiopatias, malformações congênitas, transtornos neurológicos como a epilepsia e uso de drogas.

Levou-se em conta também os defeitos oculares tais como a miopia, hipermetropia as quais foram avaliadas individualmente.

A vida sexual do futuro doador foi observada descartando aqueles doadores que "desfrutam" de numerosas parceiras ou aqueles apresentavam parceiro estável, soropositivo para o HIV.

A própria anamnese em si, nos facilita muita informação sobre a capacidade intelectual dos doadores. É importante verificar como contestam a nossas perguntas e como comportam frente suas dúvidas e reflexões.

A exploração clínica foi encaminhada a detectar qualquer patologia de caráter hereditário, infeccioso que pode afetar a fertilidade como a varicocele, a criptorquidia, etc.

Em geral o próprio doador aceitou de bom grado uma cuidadosa exploração física. Neste tempo, registraram-se as características físicas do doador:

- Peso
- Altura
- Cor da pele
- Cor dos olhos
- Cor do cabelo
- Textura do cabelo

Características todas estas que levamos em conta na hora de selecionar um doador para um determinado casal, procurando aquele cujas características físicas sejam mais parecidas possível.

Existem outros tipos de características que podem ser observadas tais como a aparência (magro, normal, obeso...), o caráter (nervoso, normal, tranqüilo...) que poderiam ser consideradas, mas que no nosso estudo não tiveram interesse.

Determinação de

- **Grupo sanguíneo**
- **Fator Rh**

O tipo sanguíneo, em alguns grupos, é considerado fator prioritário de eleição para a aceitação de doador. No nosso grupo somente se a mulher fosse Rh negativo, a escolha do doador era feita em primeiro lugar pelo grupo sanguíneo apropriado, caso contrário, elegíamos o doador segundo as características físicas do marido.

7.4. "Screening" microbiológico dos doadores

Em cada doador que superou as provas de avaliação do sêmen foi realizado em continuação uma bateria de provas microbiológicas que detalhamos a seguir e com as quais se pretendeu descartar sobretudo aquelas patologias de origem microbiológica que pudessem afetar tanto a mãe como o feto em suas etapas mais precoces. Foram realizadas as seguintes provas:

Sorológicas

- Lues (VDRL)
- Hepatites B,C
- Anticorpos de HIV 1 e 2
- Herpes simplex

- Citomegalovirus

No ejaculado

- Cultura
- Micoplasma
- Clamydia

Devido a presença de doenças de transmissão sexual e a demonstração de sobrevivência de bactérias e vírus em nitrogênio líquido, a seleção de doadores de sêmen tem se tornado mais difícil.

As enfermidades virais e muito especialmente o HIV e o vírus humano linfotrófico celular T HTLV-1, tem sido um grave problema após a publicação de dados de exemplos de transmissão desses vírus através de sêmen congelado (STEWART, 1985).

Os candidatos a doadores devem estar isentos de história de enfermidades de transmissão sexual incluindo o herpes genital e/ou afecções venéreas. Homens com alto risco de infecção pelo HIV foram excluídos da doação. Ademais também foram excluídos indivíduos com numerosos parceiros sexuais, os consumidores de drogas por via parenteral, assim como aqueles candidatos cujas parceiras fossem HIV positivos.

A comprovação sorológica foi realizada antes da coleta da primeira amostra de sêmen e foi repetida invariavelmente a cada três meses, sendo que as amostras recolhidas e congeladas neste intervalo em nenhum caso foram utilizadas antes de seis meses, tendo cada uma delas no mínimo três sorologias negativas.

Esta política de atuação é a recomendada pela Associação Americana de Bancos de Tecidos (AATB) assim como pela Sociedade Americana de Fertilidade (AFS, 1993) para qual foi proposto que o tempo transcorrido entre a infecção com HIV e o aparecimento de anticorpos séricos é geralmente de 60 a 120 dias.

Atuando desta forma cobrimos sobremaneira o período janela imunológica que fizemos referência.

Tem-se demonstrado que a hepatite B e C e outras formas de hepatites não A e B podem ser transmissíveis sexualmente e portanto todos aqueles homens que apresentaram estes marcadores positivos não foram aceitos como doadores.

Por outro lado, como não existem testes práticos para a determinação de herpes vírus II ou para vírus do papiloma, todos indivíduos com história clínica de herpes genital ou lesões venéreas devem ser excluídos da doação.

Outras alterações que podem surgir na análise microbiológica, devem ser individualizadas. O aparecimento de colônias nas culturas devem ser quantificadas para diferenciar uma contaminação de uma verdadeira infecção. Se considerarmos que existe uma infecção ainda que assintomática, podemos suspender temporariamente as doações e tratar primeiro a infecção com o antibiótico de eleição identificado pelo antibiograma. Após o tratamento, repetimos a análise microbiológica para comprovar a cura, podendo então reiniciar com a coleta de amostras de sêmen.

Quanto as amostras que tínhamos desse doador, elas devem ser eliminadas até a comprovação da cura da paciente.

7.5. Avaliação seminal

As anomalias no sêmen constituem a causa mais comum de eliminação de um doador já que o nível exigido supera o que se considera normal para o resto dos homens férteis.

Começamos a avaliação seminal, indicando a nosso doador que nos fornecesse uma amostra de ejaculado após 3 dias pelo menos, de abstinência sexual, colhido mediante masturbação, em recipiente estéril e conduzido ao laboratório em um intervalo que não excedesse 30 minutos. Esta primeira amostra era então examinada realizando-se um espermograma. Os requisitos exigidos ao espermograma de um doador são, no mínimo, os referidos na Tabela 20.

Solicitou-se do doador que trouxesse uma segunda amostra 7 dias após a primeira. Esta segunda amostra nos dava uma idéia da regularidade de sua qualidade ao compará-la com a primeira e esta foi a utilizada para a prova de congelação.

TABELA 20: ESPERMOGRAMA NORMAL SEGUNDO A OMS (1987)

Volume	2 ml ou mais
pH	7.2 - 8
Concentração espermática	20 milhões espermatozoides ou mais
Total espermatozoides no ejaculado	40 milhões esptzs/ejaculado ou mais
Motilidade	50% ou mais com motilidade progressiva (Categoria A + B) ou 25% ou mais com progressão rápida (Categoria A)
Morfologia	50% ou mais com formas normais
Vitalidade	50% ou mais vivos
Leucócitos	Menos de 1×10^6 /ml
Immunobead Test	Menos de 10% de espermatozoides com partículas aderentes
MAR-Test	Menos de 10% de espermatozoides com partículas aderentes

Quando se dispõe de banco de sêmen deve-se realizar o teste de congelação/descongelação já que o comportamento do sêmen ante a congelação nem sempre é o mesmo, uma vez que a fresco, as amostras de sêmen tem uma excelente qualidade, porém ao serem congeladas e posteriormente ao se descongelarem perdem grande parte de suas características de qualidade. É esperado que depois do teste de congelação/descongelação, possamos obter uma mobilidade progressiva (A + B) de 40%.

Cada vez que o banco de sêmen entregava uma amostra congelada, era verificado a motilidade espermática de uma parte desta alíquota. Se após a descongelação fosse observado motilidade progressiva maior de 40% da que se tinha a fresco, procedia-se a realização da bateria de provas microbiológicas.

Uma vez aprovado e aceito o doador, uma série de documentos legais devem ser lhe entregue para o preenchimento.

- **Ficha de filiação do doador**, na que figuram seus dados pessoais: o número da carteira de identidade, CPF, endereço, telefone, as características físicas e as referências pessoais e familiares.
- **Documento de compromisso** assinado pelo doador no qual aparecem suas obrigações com o banco de sêmen, tais como regularidade em suas entregas, pontualidade no horário, dias de abstinência, disciplina com as análises, microbiológicas e tratamentos indicados e, a certeza de que não está doando amostras em outro banco de sêmen.
- **Documento de renúncia do doador** impedindo-o de realizar qualquer reclamação sobre as amostras doadas, sobre a possível paternidade das gestações obtidas com as mesmas, deixando a responsabilidade nas mãos do banco de sêmen, o destino do material doado.

Ao mesmo tempo, o banco de sêmen informou aos doadores que se responsabilizaria pelo seu anonimato e que sua identidade como das suas amostras nunca serão reveladas, salvo exigência judicial. Os doadores são informados que o banco de sêmen poderia prescindir de seus serviços quando conseguidas com seu material o número de gestações determinados pela lei. As variações de seus espermogramas e de suas análises sorológicas são comunicadas aos doadores, quando se fizer necessário, da mesma maneira os possíveis tratamentos que possam ser recomendados.

Do mesmo modo, todo indivíduo interessado em ser doador cujo espermograma resultou patológico foi orientado para se submeter a estudo diagnóstico com a possibilidade de receber uma terapêutica adequada.

7.6. "Screening" genético dos doadores de sêmen

Este "screening" tem como objetivo minimizar as possibilidades de transmissão de algumas enfermidades genéticas considerando as diretrizes adotadas pelo banco de sêmen que deve ser suficientemente realistas para permitir o recrutamento dos doadores.

O esquema desse "screening" foi publicado reiteradas vezes na bibliografia da American Fertility Society com contínuas atualizações (a última delas é de 1993).

A avaliação da fibrose cística do pâncreas, por exemplo, pode ser realizada através da "Polimerase Chain Reactive" (PCR) que é detectado em, aproximadamente 20% dos portadores. Já a enfermidade de Tay Sachs que ocorre praticamente de forma exclusiva na população de origem judia deve ser estudada nos possíveis doadores desta população. Deve-se procurar identificar também os portadores de deficiência de alfa-1-Antitripsina.

Os doadores de raça negra e de origem mediterrânea devem ser submetidos a uma eletroforese hemoglobínica para diagnosticar a presença de anormalidades como "sickle cells" ou thalassemias.

Como o estudo do cariótipo é muito caro e por outro lado não oferece segurança diagnóstica a respeito dos diferentes problemas genéticos que podem ser encontrados, não foram aceitos doadores com história familiar de retardamento mental, hemofilia, fibrose cística de pâncreas, distrofias musculares, anomalias poligênicas multifatoriais como diabetes, isquemia miocárdica precoce, alcoolismo e hipertensão arterial.

Não obstante, o casal receptor de sêmen de doador deve entender que, apesar do esforço, não é possível prevenir de forma completa a transmissão de anormalidades genéticas.

Os doadores de sêmenes que não se ajustaram a todos parâmetros citados anteriormente, foram eliminados do processo de doação.

Em nossa opinião, devemos adaptar as diretrizes do banco de sêmen às características populacionais locais.

7.8. Escolha do sêmen

A maioria das mulheres que procuram a técnica de inseminação artificial com sêmen de doador são casadas. Entretanto, há um grupo cada dia mais numeroso de mulheres solteiras que querem ver satisfeito seu desejo de maternidade sem envolvimento emocional ou legal com um homem. No primeiro caso, o das mulheres casadas, o sêmen deve ser eleito dentre os doadores cujo fenótipo se assemelhe mais ao de seu companheiro, salvo naqueles casos nos quais em que se requer alguma característica física determinada por eles. O sêmen

a ser utilizado deve ser Rh compatível com a receptora. Desta forma evita-se prováveis isoimunizações materno-fetais. Quando a receptora é Rh positivo, deve-se selecionar um sêmen com um determinado tipo sanguíneo para que a futura criança tenha um grupo sanguíneo que combine com o dos pais.

Classicamente o parâmetro do Rh e o grupo sanguíneo é critério prioritário de seleção por muitos grupos de reprodução assistida. Entretanto, no serviço onde foi realizado esse estudo, salvo a compatibilidade do fator Rh, o maior critério considerado foram as características físicas do doador, que devem ser as mais parecidas possível ao do cônjuge.

No caso de mulheres solteiras entre as quais estão incluídas o grupo das lésbicas, há uma polêmica quanto sua aceitação nos programas de IAD. Em geral se aceitam estas candidatas, a medida que se aceita a homossexualidade na sociedade.

É importante assinalar que a orientação sexual das crianças nascidas e educadas por uma mãe lésbica em nada se diferencia daquelas crianças nascidas e educadas no seio de uma família convencional. Neste caso a eleição de doador se baseará nos traços físicos que a paciente solicita e que o fator Rh seja compatível com o dela.

7.9. Congelação do sêmen

A primeira experiência de congelação de espermatozóides que se obteve com êxito foi há 43 anos, com esperma de gado bovino. BUNGE & SHERMAN (1953), relatam a primeira gestação humana obtida de sêmen congelado em neve carbônica a - 79° C. Em

1964, obteve-se as primeiras gestações com inseminação artificial de sêmen congelado em nitrogênio líquido (PERLOFF et al., 1964). A partir deste momento, começam a aparecer bancos de sêmen em todo mundo.

Os bancos de sêmen facilitaram bastante a IAD ao disporem das amostras no momento que se considera oportuno. Também elimina a possibilidade de inseminar com produto contaminado. Da mesma maneira, o banco de sêmen pode ser usado para armazenar material de inseminações artificiais homólogas.

O sêmen humano nem sempre pode ser congelado adequadamente já que se comporta de maneira diferente, segundo os indivíduos e, inclusive, entre as distintas amostras de um mesmo indivíduo. Os processos de congelação e de descongelação afetam sempre, a qualidade do sêmen, ainda que se empreguem meios crioprotetores. Alterações ultra-estruturais do acrossoma (PEDERSEN & LEBE, 1971), da peça intermediária (ACKERMAN & BEHRMAN, 1975), e a motilidade do espermatozóide, que pode reduzir-se até 50%, tem sido comprovados. Entretanto, a alteração do mapa genético não pode ser demonstrado (SHERMAN & CHAR, 1974).

Os meios crioprotetores tentam diminuir os efeitos nocivos resultantes da congelação e descongelação, uma vez que não existe um produto com características que proteja absolutamente o espermatozóide.

Os elementos básicos do meio crioprotetor são a glicerina, que impede ou reduz a formação de cristais de gelo, e a gema de ovo que recobre a membrana plasmática do espermatozóide. Outros crioconservadores estudados são diversos açúcares, o

dimetilsulfóxido e recentemente soluções diluídas de formaldeído, ainda que não se tenha demonstrado que sejam mais eficazes que o glicerol. Embora, os estudos de recuperação da motilidade espermática, das enzimas e os estudos com microscópio eletrônico de transmissão ou de varredura (ALEXANDER, 1977) tem propiciado grande ajuda, as conclusões sobre o melhor método para conservar a capacidade de fertilização dos espermatozóides são dificultadas pelas variantes inerentes à prática médica, uma vez que não se deve usar material humano em pesquisa que comprovem a capacidade de fertilização do espermatozóide.

Qualquer que seja o método de congelação eleito, é de capital importância evitar a contaminação, devendo-se incorporar ao protocolo, diversos passos de filtração e adição de antibióticos para assegurar a esterilidade tanto do sêmen fresco como do congelado.

Os resultados dependem não só das características do sêmen como também das variações técnicas. Podemos distinguir no processo de criopreservação várias etapas onde o produto pode sofrer alterações graves:

1. **Choque térmico:** É a passagem da temperatura ambiente até a temperatura de 5 °C. A esta temperatura, aumenta a permeabilidade da membrana espermática, diminui a motilidade e se reduz o metabolismo.
2. **Calor latente de cristalização:** Entre 5 e -5oC começa a formação de cristais de gelo.
3. **Cristalização:** De -5 a -15oC produz-se uma desidratação do preparado.

4. **Recristalização:** De -15 a -79°C aumentam de novo os cristais de gelo, podendo lesar as membranas celulares.

5. **Armazenamento:** Entre -80 e -196°C.

Quando ocorre a descongelação, os passos são os mesmos, porém no sentido inverso.

Quanto ao material necessário para a congelação dos espermatozóides, além do meio crioprotetor, deve-se incluir as palhetas ou criotubos de plástico para armazenamento das amostras e os tambores de nitrogênio líquido, com capacidade variável para seu armazenamento e transporte.

As diferentes opções para o envase do sêmen a ser congelado (palhetas, criotubos e esferas) apresentam vantagens e desvantagens.

A congelação em palhetas tem a vantagem de que pode-se congelar volumes menores que com os criotubos. Também com este método, a variação da temperatura é mais homogênea em toda a superfície, sendo a absorção de calor ou frio do plástico insignificante. O armazenamento em palhetas, por outro lado, exige maior espaço no recipiente do banco de sêmen, questão esta muito importante, considerando que em muitas ocasiões é necessário manter um determinado volume de amostras congeladas.

As vantagens de se congelar em criotubo são fundamentadas essencialmente em sua comodidade uma vez que para carregar os criotubos é necessário somente uma seringa. Os criotubos são mais resistentes que as palhetas, porém também absorvem mais

temperatura. Assim mesmo, temos de considerar como desvantagens, que se perde mais material pela superfície de contato do tubo e que ocupam mais espaço no banco de sêmen em relação ao mesmo número de palhetas. Já a congelação em esferas resulta na metade do caminho entre as duas modalidades antes mencionadas.

7.10. Técnica de congelação do sêmen

Procedeu-se da seguinte maneira:

1. O sêmen foi recolhido em um frasco estéril após um período de abstinência sexual de 3 a 5 dias. A liquefação ocorreu no recipiente à temperatura ambiente cerca de 20 a 30 minutos. Após adição e mistura do meio criopreservador ao sêmen na proporção de 1:1, o material foi colocado em geladeira a 4 ° C durante 1 hora.
2. Decorrido esse período, alíquotas de 0.5 ml foram separadas para o preenchimento das palhetas e de 1 ml para preenchimento dos tubos de congelação.
3. Essas palhetas e os tubos foram depositadas em uma caixa contendo vapores de nitrogênio (10 cm acima da superfície do nitrogênio) durante 10 minutos.
4. Decorrido esse período as doses foram imersas em nitrogênio líquido.
5. Das doses congeladas, separou-se uma, que foi descongelada, observando-se a motilidade espermática.

6. O resto da amostra congelada foi colocada em posição preestabelecida dentro do container de nitrogênio líquido.

Atualmente a congelação do sêmen é realizada mediante o emprego de computador. A programação por computador permite uma melhor recuperação da motilidade espermática, apesar de ocorrer maior consumo de nitrogênio e sobretudo mais tempo para sua realização. Esta técnica permite congelar sêmen de pacientes que vão ser tratados com químico ou radioterapia, como também nos casos em que os indivíduos desejam preservar seu sêmen antes de realizar uma vasectomia.

Os bancos de sêmen devem dispor a qualquer momento de sêmen congelado dos diferentes grupos sanguíneos e fenótipos em quantidade suficientes para abastecer a demanda dos ginecólogos que trabalhem habitualmente com ele. O ginecologista comunicará a demanda ao banco de sêmen, o qual colocará a sua disposição, as amostras solicitadas em tambores de transporte com nitrogênio líquido. Esta maneira de transporte oferece autonomia de 3 a 7 dias de tal maneira, que podem ser abastecidos ginecologistas de populações mais ou menos distantes do banco de sêmen. É importante os resultados das inseminações sejam sempre comunicado ao banco de sêmen, para que este mantenha um controle estrito de sua qualidade.

7.11. Técnicas de capacitação do sêmen

É fato conhecido que, através do colo e cavidade uterina, o sêmen vai eliminando seu plasma seminal (SUJAN, DANEZIS, SOBRERO, 1963; PERRY,

GLEZERMAN, INSLER, 1977), onde existem substâncias como as prostaglandinas que a nível intra-uterino, pode provocar a contração da musculatura miometrial e, em consequência, dificultar o trânsito do ovócito. Também, nesta porção uterina, são eliminadas partículas, detritos celulares e células, assim como os espermatozóides imóveis ou com má motilidade, de tal modo que só ultrapassarão a barreira, aqueles espermatozóides que possuam uma melhor "qualidade".

Em que pese os conhecimentos da função depuradora e seletiva da cérvix, e tendo em conta nosso protocolo, foram realizadas somente inseminações intra-uterinas, superando a barreira da cérvix.

No caso desse trabalho, o sêmen foi congelado e capacitado. Recordemos que o sêmen foi congelado com todos os seus componentes a fresco, agregando-lhe tão só o meio criopreservador.

É necessário eliminar tanto os elementos próprios do sêmen fresco, como os restos do meio crioprotetor, para que sejam recuperados somente os melhores espermatozóides da amostra, isento de elementos estranhos.

Uma vez selecionado o doador e extraída a amostra do depósito de nitrogênio líquido, foi realizada a descongelação tal qual se detalha no capítulo correspondente a Sujeitos e Métodos.

São muitas as técnicas empregadas para a capacitação da amostra, conforme detalhamos a seguir:

Métodos de migração

Como o Swim-up, a Self Migration, o Swim-Down ou a migração por sedimentação se baseiam na capacidade dos espermatozoides mais móveis se deslocarem para o meio de cultura e em consequência separar-se do resto.

a) Swim-Up

No Swim-up, após a lavagem do ejaculado através da centrifugação, adiciona-se de 0.3 a 0,5 ml de meio de cultura ao pellet, resvalando cuidadosamente pela parede do tubo, deixando na incubadora durante 45 minutos a 37°C e recuperando o sobrenadante. O SWIM-UP é o método mais classicamente empregado para recuperação espermática.

b) Self-Migration

Segundo a descrição de Wikland (WIKLAND et al., 1987), coloca-se o sêmen no extremo de uma pipeta Pasteur fechada ao fogo e adiciona-se meio de cultura deixando a pipeta na posição horizontal. Desta maneira os espermatozoides nadarão para a porção onde se encontra o meio de cultura. Com esta técnica recupera-se um maior número de espermatozoides móveis que com o SWIM-UP. Porém, as taxas de gestação com este método não são maiores (KARLSTRÖM et al., 1993).

c) Swim-Down

Por último, a técnica de Swim-down é parecida ao Swim-up só que, neste caso, coloca-se o meio de cultura na posição inferior ao sêmen, de tal maneira que os espermatozóides, ao invés de nadarem para cima, como no Swim-up, nadam para baixo. São recuperados os espermatozóides de maior motilidade e em menor tempo (RAYMOND et al., 1991; GONZALES & PELLA, 1993).

Pode-se aumentar o número de espermatozóides recuperados nos métodos por migração, aumentando a velocidade na centrifugação durante os lavados, porém este procedimento prejudica notadamente a qualidade espermática (BERR, 1983).

d) Migração por Sedimentação

Da mesma maneira que os métodos precedentes, a migração por sedimentação é baseada na capacidade de deslocamento dos espermatozóides. Neste caso, utiliza-se um sistema de tubos concêntricos onde situam o meio e o sêmen. Os espermatozóides nadarão para o meio de cultura e se depositarão no fundo do tubo interno (TEA, JONDET, SCHOLLER, 1983; LUCENA et al., 1989).

Em que pese os métodos de migração por sedimentação sejam fáceis de realização e necessitam de um simples aparelho, oferecendo excelentes resultados com doadores normozoospermicos, ele não foi empregado nesse estudo. Porém para os sêmenes

oligozoospermicos e astenozoospermicos, o método não apresenta uma boa recuperação espermática.

Métodos de filtração

a) Filtração em Fibra de Vidro

Este método é fundamentado na capacidade do material empregado em captar os espermatozoides mortos ou com defeitos. Para isso é utilizado uma malha de fibra de vidro (cdg. 112 Johns Manville, Oak Brook II USA) em porções de 15-20 mg, que é colocada no interior de uma seringa de insulina até a divisão 0.06 ml. Em seguida, lava-se este filtro com 2-3 ml de meio de cultura para eliminar as partículas de fibra de vidro que poderiam estar livres, procedendo a seguir a filtração de aproximadamente 0.5 ml de sêmen fresco ou previamente lavado. Depois da filtração do sêmen, lava-se o filtro novamente com 0.2-0.3 ml de meio de cultura para liberar os possíveis espermatozoides de boa qualidade que poderiam ainda estar presos nele (PAULSEN & POLAKOSKI, 1977).

Tem-se pensado que este método de recuperação espermática possa danificar a ultra-estrutura do espermatozoide (SHERMAN, PAULSEN, LIU, 1981), entretanto, trabalhos posteriores, em que se estudou a ultra-estrutura do espermatozoide tratado com fibra de vidro em comparação com os gradientes de Percoll, sugerem que esta hipótese é infundada (RHEMREV et al., 1989).

b) Filtração Em Colunas Sperm-Prep

Para esta técnica realiza-se previamente uma centrifugação com um gradiente de Percoll de 40% durante 10 minutos a 300 G. Em seguida recolhe-se o pellet, diluindo-o e filtrando-o em tubo de Sperm-Prep TM Columns II (Corning, Corning, NY) e diluindo de novo com 4 ml de HAM F-10 (OHASHI et al., 1992).

Em geral, os métodos de filtração são simples e econômicos de serem realizados porém, em sua oposição, tem o fato de que não filtram completamente nem partículas nem elementos celulares.

Métodos de Centrifugação por Gradientes

Centrifugação com Gradientes de Percoll

Um estoque de percoll isotônico é preparado adicionando a 9 ml de percoll (Pharmacia) 1 ml de HAM- F10 (10X concentrado). Uma vez preparado o percoll isotônico, devem ser feitas diluições para obter os diferentes gradientes de 90% (9 partes do percoll isotônico e uma parte de HAM-F10) e de 45% (4.5 partes de percoll isotônico e uma de HAM-F10).

Deposita-se no fundo de um tubo cônico 1 ml do gradiente de 90% escorrendo-o pelas paredes do tubo. Em seguida, deixa-se cair pelas paredes do tubo 1 ml do gradiente de 45% e, por último, 1 ml do sêmen fresco. Centrifuga-se a 300 G durante 15 a 30 minutos e, a seguir, resgata-se o pellet com pipeta Pasteur, levando-o a outro tubo onde se lava por

duas vezes com meio de cultura em proporção 1:5, centrifugando a 600 G durante 5 minutos. Nos lavados, elimina-se o sobrenadante e ressuspende-se o centrifugado.

Ao final do segundo lavado, ressuspende o centrifugado em 0.5 ml de meio de cultura avaliando-se a concentração e a motilidade da amostra.

O fundamento básico desta técnica é que a seleção de espermatozóides ocorre porque somente os melhores espermatozóides poderão atravessar as dificuldades criadas com os diferentes gradientes, para chegar até o fundo do tubo onde deverão ser recolhidos com pipeta Pasteur.

Este método requer um equipamento pouco mais complexo que os demais e, além de consumir maior tempo para sua realização, mesmo assim, tem a vantagem de que a recuperação espermática é muito boa sobretudo em sêmenes patológicos, apesar de apresentar alguns elementos celulares.

7.12. Fim das doações

Geralmente, cerca de três quartos dos doadores são eliminados por diferentes motivos. Aqueles que são finalmente admitidos como doadores, manterão esta colaboração que só se rescindirá pelos seguintes motivos:

- **Exclusão voluntária do doador.** Quando o doador por seu desejo expresso, comunique ao banco de sêmen.

- **Mal entendimento entre o doador e o banco de sêmen.** Naqueles casos que embora sendo a qualidade seminal ótima, o doador não respeita as datas, a pontualidade nas análises sorológicas e microbiológicas estabelecidas pelo banco de sêmen.
- **Perda de qualidade do sêmen.** Tanto a fresco como após descongelação tornando-se impossível realizar inseminações com as garantias que sejam consideradas suficientes.
- **A não obtenção de gestações após inseminações repetidas e em diferentes casais.** Demonstra que este sêmen não tem a fecundidade esperada. Neste caso o doador deve ser excluído podendo oferecer o estudo individual de seu caso como paciente de andrologia.
- **Alterações na análise sorológica/microbiológica suficientemente significativas.** São aqueles casos nos quais se produz uma soroconversão HIV, Herpes vírus, Citomegalovírus, Hepatite viral e Lues. O doador neste caso deverá ser informado podendo ser indicado o tratamento adequado. Caso especial é da soroconversão para HIV em que após um teste de Western Blot confirmando o diagnóstico, o mesmo deverá ser encaminhado a um centro de referência para prosseguir as investigações.
- **Em caso de comprovação de patologia na descendência do doador de sêmen.**
- **Por obtenção do número máximo de gestações determinadas pela lei** (na legislação brasileira se admite um máximo de 4 gestações para cada doador). Atuando desta maneira o risco de consangüinidade pela possibilidade de matrimônio entre irmãos de pais é desprezível: 1 em 25 anos se um só doador origina 10 gestações (MOSER, 1979). A este respeito se tem sugerido a possibilidade de intercâmbio de sêmen entre diferentes populações ampliando assim o âmbito da população receptora e com isso reduzindo ainda mais o risco de consangüinidade.

ANEXO

8. ANEXO

REPRODUÇÃO ASSISTIDA: REGRAS VÁLIDAS

Estamos republicando, nesta edição, a Resolução no. 1.358/92, que estabeleceu as regras éticas para utilização da Reprodução Assistida. A resolução, publicada no No. 31, saiu com algumas incorreções, por erro técnico na remessa de material para a gráfica. Alertamos os leitores para que considerem como válido o texto ora publicado, descartando o texto da edição passada. Esta, portanto, é a íntegra da Resolução no. 1.358/92.

RESOLUÇÃO CFM No. 1358/92

O Conselho Federal de Medicina, no uso das atribuições que lhe confere a Lei no. 3.268, de 30 de setembro de 1957, regulamentada pelo Decreto no. 44.045, de 19 de julho de 1958 e,

Considerando a importância da infertilidade humana como um problema de saúde, com implicações médicas e psicológicas, e a legitimidade do anseio de superá-la;

Considerando que o avanço do conhecimento científico já permite solucionar vários dos casos de infertilidade humana;

Considerando que as técnicas de Reprodução Assistida têm possibilitado a procriação em diversas circunstâncias em que isto não era possível pelos procedimentos tradicionais;

Considerando a necessidade de harmonizar o uso destas técnicas com os princípios da ética médica;

Considerando, finalmente, o que ficou decidido na Sessão Plenária do Conselho Federal de Medicina realizada em 11 de novembro de 1992;

RESOLVE:

Art. 1º - Adotar as Normas Éticas para Utilização das Técnicas de Reprodução Assistida, anexas à presente Resolução, como dispositivo deontológico a ser seguido pelos médicos.

Art. 2º - Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

São Paulo-SP, 11 de novembro de 1992.

Ivan de Araújo Moura Fé

Presidente

Hércules Sidnei Pires Liberal

Secretário-Geral

I - Princípios Gerais

1. As técnicas de Reprodução Assistida (RA) têm o papel de auxiliar na resolução dos problemas de infertilidade, facilitando o processo de procriação quando outras terapêuticas tenham sido ineficazes ou ineficientes para a solução da situação atual de infertilidade.
2. As técnicas de RA podem ser utilizadas desde que exista probabilidade efetiva de sucesso e não se incorra em risco grave de saúde para a paciente ou o possível descendente.
3. O consentimento informado será obrigatório e extensivo aos pacientes inférteis e doadores. Os aspectos médicos envolvendo todas as circunstâncias da aplicação de uma técnica de RA serão detalhadamente expostos, assim como os resultados já obtidos naquela unidade de tratamento com a técnica proposta. As informações devem também atingir dados de caráter biológico, jurídico, ético e econômico. O documento de consentimento informado será em formulário especial, e estará completo com a concordância, por escrito, da paciente ou do casal infértil.
4. As técnicas de RA não devem ser aplicadas com a intenção de selecionar o sexo ou qualquer outra característica biológica do futuro filho, exceto quando se trate de evitar doenças ligadas ao sexo do filho que venha nascer.
5. É proibida a fecundação de oócitos humanos, com qualquer outra finalidade que não seja a procriação humana.
6. O número ideal de oócitos e pré-embriões a serem transferidos para a receptora não deve ser superior a quatro, com o intuito de não aumentar os riscos já existentes de multiparidade.
7. Em caso de gravidez múltipla, decorrente do uso de técnicas de RA, é proibida a utilização de procedimentos que visem a redução embrionária.

II - Usuários das Técnicas de RA

1. Toda mulher, capaz nos termos da lei, que tenha solicitado e cuja indicação não se afaste dos limites desta resolução, pode ser receptora das técnicas de RA, desde que tenha concordado de maneira livre e consciente em documento de consentimento informado.
2. Estando casada ou em união estável, será necessária a aprovação do cônjuge ou do companheiro, após processo semelhante de consentimento informado.

III - Referente às clínicas, centros ou serviços que aplicam técnicas de RA

As clínicas, centros ou serviços que aplicam técnicas de RA são responsáveis pelo controle de doenças infecto-contagiosas, coleta, manuseio, conservação, distribuição e transferência de material biológico humano para a usuária de técnicas de RA, devendo apresentar como requisitos mínimos:

1. Um responsável por todos os procedimentos médicos e laboratoriais executados, que será, obrigatoriamente, um médico.
2. Um registro permanente (obtido através de informações observadas ou relatadas por fonte competente) das gestações, nascimentos e malformações de fetos ou recém-nascidos, provenientes das diferentes técnicas de RA aplicadas na unidade em apreço, bem como dos procedimentos laboratoriais na manipulação de gametas e pré-embriões.
3. Um registro permanente das provas diagnósticas a que é submetido o material biológico humano que será transferido aos usuários das técnicas de RA, com a finalidade precípua de evitar a transmissão de doenças.

IV - Doação de gametas ou pré-embriões

1. A doação nunca será caráter lucrativo ou comercial.
2. Os doadores não devem conhecer a identidade dos receptores e vice-versa.

3. Obrigatoriamente será mantido o sigilo sobre a identidade dos doadores de gametas e pré-embriões, assim como dos receptores. Em situações especiais, as informações sobre doadores, por motivação médica, podem ser fornecidas exclusivamente para médicos, resguardando-se a identidade civil do doador.
4. As clínicas, centros ou serviços que empregam a doação devem manter, de forma permanente, um registro de dados clínicos de caráter geral, características fenotípicas e uma amostra de material celular dos doadores.
5. Na região de localização da unidade, o registro das gestações evitará que um doador tenha produzido mais que 2 (duas) gestações, de sexos diferentes, numa área de um milhão de habitantes.
6. A escolha dos doadores é de responsabilidade da unidade. Dentro do possível deverá garantir que o doador tenha a maior semelhança fenotípica e imunológica e a máxima possibilidade de compatibilidade com a receptora.
7. Não será permitido ao médico responsável pelas clínicas unidades ou serviços, nem aos integrantes da equipe multidisciplinar que nelas prestam serviços, participarem como doadores nos programas de RA.

V - Criopreservação de gametas ou pré-embriões

1. As clínicas, centros ou serviços podem criopreservar espermatozoides, óvulos e pré-embriões.
2. O número total de pré-embriões produzidos em laboratório será comunicado aos pacientes, para que se decida quantos pré-embriões serão transferidos a fresco, devendo o excedente ser criopreservado, não podendo ser descartado ou destruído.
3. No momento da criopreservação, os cônjuges ou companheiros devem expressar sua vontade, por escrito, quanto ao destino que será dado aos pré-embriões criopreservados, em caso de divórcio, doenças graves ou de falecimento de um deles ou de ambos, e quando desejam doá-los.

VI - Diagnóstico e tratamento de pré-embriões

1. As técnicas de RA também podem ser utilizadas na prevenção e tratamento de doenças genéticas ou hereditárias, quando perfeitamente indicadas e com suficientes garantias de diagnóstico e terapêutica.
2. Toda intervenção sobre pré-embriões "in vitro", com fins diagnósticos, não poderá ter outra finalidade que a avaliação de sua viabilidade ou detecção de doenças hereditárias, sendo obrigatório o consentimento informado do casal.
3. O tempo máximo de desenvolvimento de pré-embriões "in vitro" será de 14 dias.

VII - Sobre a gestação de substituição (doação temporária do útero)

As clínicas, centros ou serviços de reprodução humana podem usar técnicas de RA para criarem a situação identificada como gestação de substituição, desde que exista um problema médico que impeça ou contra-indique a gestação na doadora genética.

1. As doadoras temporárias do útero devem pertencer à família da doadora genética, num parentesco até o segundo grau, sendo os demais casos sujeitos à autorização do Conselho Regional de Medicina.
2. A doação temporária do útero não poderá ter caráter lucrativo ou comercial.

SUMMARY

9. SUMMARY

In order to evaluate the outcome pregnancy rate of the IAD program were performed a observational clinic study on Institut Valenciano de Infertilidad - Valencia - Spain from 1990 to 1994. 480 infertiles couples had 1429 cycles of IUI inseminations resulting 253 pregnancies. Among this couples, 235 were patients whose husbands presented azoospermia and 245 couples whose husbands presented infertility of severe male cause. The couples presented and average history of infertility of 4.6 ± 1.1 years. The women average was 31.8 ± 4.2 years old. For this analysis we used the Statical model from Kaplan-Meier, using $P < 0,05$. The pregnancy rate per patient were 52.7% and the accumulated rate of pregnancy in 6 cycles of 67,1%. We observed pregnancy rate significative higher in the ovarian stimulation (namely in the FSHhp group) who compared with natural cycles. Similar outcome pregnancy rate were obtained after 3 and 6 inseminations cycles. We observed the differences between the results obtained in couples with azoosperm partners and with oligoasthenosperm partners just in the natural cycles group. The age factor had no influence in the results. We concluded that the pregnancy rate were superior in the group that received ovarian stimulation rather than the natural cycles, obtained with FSHhp higher pregnancy rate and similar rates pregnancy with 3 and 6 cycles were observed.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ACKERMAN, D.R. & BEHRMAN, S.J. - Artificial insemination and preservation of human semen. In: ACKERMAN, D.R. & BEHRMAN, S.J. - **Progress in Infertility**. Little, Brown, Boston, 1975. p.765-72.
- AFS (THE AMERICAN FERTILITY SOCIETY). - New guidelines for the use of semen-donor insemination. **Fertil. Steril.**, **46(Suppl 2):95S-110S**, 1986.
- AFS (THE AMERICAN FERTILITY SOCIETY). - Revised new guidelines for the use of semen-donor insemination. **Fertil. Steril.** **49:211**, 1988.
- AFS (THE AMERICAN FERTILITY SOCIETY). - New guidelines for the use of semen donor insemination. **Fertil. Steril.**, **53(Suppl 1)**, 1990.
- AFS (THE AMERICAN FERTILITY SOCIETY) - Guidelines for gamete donation. **Fertil. Steril.**, **59:1S-4S**, 1993.
- ALEXANDER, N.J.- Surface structure of spermatozoa frozen for artificial insemination. **Andrologia**, **9:155-65**, 1977.
- ANDREOTTI, R.F. - Endovaginal and transabdominal sonograph of ovarian follicles. **J. Ultras. Med.** , **8:555-60**, 1990.
- BARRAT, C.L.; COOKE, S.; CHAUHAN, M.; COOKE, I.D. - A prospective randomized controlled trial comparing urinary luteinising hormone dipsticks and basal body temperature charts with timed donor insemination. **Fertil. Steril.**, **52:394-7**, 1989
- BERR, A. - **A establishment of methods for improving human sperm quality**. Tel Aviv, 1983, M.D. Thesis, Tel Aviv University.

* HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses. BIREME, São Paulo, 1991. 45p.

- BONILLA-MUSOES, F.; PARDO, G.; PEREZ, G.M.; SERRA, V.; PELLICER, A. - Abdominal ultrasonography versus Transvaginal scanning: Accuracy in follicular development evaluation and prediction for oocyte retrieval in stimulated cycles. **J Clin. Ultras.**, 17:469-73, 1989.
- BONILLA-MUSOLES, F. - Endosonografía y infertilidad. In: JOSÉ REMOHI, ANTONIO PELLICER Y FERNANDO BONILLA-MUSOLES. DIAZ DE SANTOS (ed) - **Avances en Reproducción Asistida**, 1992, p.401-34.
- BRADSHAW, K.D.; GUZICK, D.S.; GRUN, B.; JOHNSON, N.; ACKERMAN, G. - Cumulative pregnancy rates for donor insemination according to ovulatory function and tubal status. **Fertil. Steril.**, 48:1051-4, 1987.
- BROWN, J. B. - Pituitary control of ovarian function: concepts from gonadotropin therapy. **Aust. NZ J. Obstet. Gynaecol.**, 18:46-54, 1978.
- BROWN, C.A.; BOONE, W.R.; HAPIRO, S.S. - Improved cryopreserved semen fecundability in an alternating fresh-frozen artificial insemination program. **Fertil. Steril.**, 50:825-9, 1988.
- BUNGE, R.G. & SHERMAN, J.K. - Fertilizing capacity of frozen spermatozoa. **Nature**, 172:767-72, 1953.
- BYRD, W.; BRADSHAW, K.; CARR, B.; EDMAN, C.; ODOM, J.; ACKERMAN, G. - A prospective randomized study of pregnancy rates following intra uterine and intracervical insemination using frozen donors sperm. **Fertil. Steril.**, 53:521-7, 1990.
- CASTELVÍ, R.M.; GÓMEZ, E.; DE LOS SANTOS, M.J.; REMOHI, J.; PELLICER, A. - Factores determinantes de embarazos multiples en mujeres sometidas a inseminación artificial con estímulo simultaneo de desarrollo folicular múltiple. **Clin. Invest. Gin. Obstet.**, 19:76-81, 1992.
- CEFALU, E.; CITTADINI, E.; BALMÁCEDA, J.P.; GUASTELLA, G.; ORD, T.; ROJAS, F.J.; ASCH, R.H. - Successful gamete intrafallopian transfer following failed artificial insemination by donor: evidence for a defect in gamete transport? **Fertil. Steril.**, 50:279-82, 1988.
- CENTOLA, G.M.; MATTOX, J.H.; RAUBERTAS, R.F. - Pregnancy rates after double versus single insemination with frozen donor semen. **Fertil. Steril.**, 54:1089-92, 1990.
- CHAFFKIN, L.M. NULSEN, J.C.; LUCIANO, A.A.; METZGER, D.A. - A comparative analysis of the cycle fecundity rates associated with combined human menopausal gonadotropin (hMG) and intrauterine insemination (IUI) versus either hMG or IUI alone. **Fertil. Steril.**, 55:252:67, 1991.

- CHAUHAN, M.; BARRAT, C.L.; COOKE, S.M.; COOKE, I.D. - Differences in the fertility of donor insemination recipients - A study to provide prognostic guidelines as to its success and outcome. **Fertil. Steril.**, **51**:815-19, 1989.
- CLARAZ, E.; FROBERT C.; BREMOND, A.; COTTINET, D. - Significance of hCG injection for ovulation induction and of ovulation prediction in the practice of artificial insemination using donor sperm. A randomized study. **J. Obstet. Biol. Reprod.**, **18**:1049-54, 1989.
- DE LAS HARAS J.; VISCASILLAS, P.; BRASSESCO, M.; RAJMIL, O.; CALAF, J. - Nuestros resultados en la IAC. XVIII Congreso de la Sociedad Espanola de Fertilidad, Marsella, 1987.
- DEUTINGER, J.; ET AL.: Vaginal sonography: An Improvement for daily follicular mensurement **Hum. Reprod.**, **1(Suppl 2)**:7, 1986.
- DIAMOND, M.P.; WENTZ, A.C. - Ovulation induction with human menopausal gonadotrophins. **Obstet. Gynecol. Surv.**, **41**:480, 1986.
- DICKEY, R.P.; OLAR, T.T.; TAYLOS, S.N.; CUROLE, D.N.; RYE, PH.; MATULICH, E.M. - Relationship of follicle number, serum estradiol, and other factors to birth rate and multiparity in human menopausal gonadotropin-induced intrauterine insemination cycles. **Fertil. Steril.**, **57**:613-19, 1992.
- DICKEY, R.P.; OLAR, T.T.; TAYLOR, S.N.; CUROLE, D.N.; RYE, P.H. - Sequential clomiphene citrate and human menopausal gonadotrophin for ovulation induction: comparison to clomiphene citrate alone and human menopausal gonadotrophin alone. **Hum. Reprod.**, **8**:56-9, 1993.
- DODSON, W.C.; HANEY, A.F. - Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of infertility. **Fertil. Steril.**, **55**:457, 1991.
- DUNSTAN, G.W. - Artificial insemination. In: 4th STUDY GROUP OF THE ROYAL COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNAECOLOGISTS. **Abstracts**, London, 1976.
- EDVINSSON, A.; FORSSMAN, L.; MILSOM, I.; NORDFORDS, G. - Factors in the infertile couple influencing the success of artificial insemination with donor semen. **Fertil. Steril.**, **53(1)**:81, 1990.
- EMPERAIRE, J.C.; GAUZERE, E.; AUDEBERT, A.J.M. - Female fertility and donor insemination. **Lancet**, **8183**:1423, 1980.
- EMPERAIRE, J.C.; GAUZERE, E.; AUDEBERT, A.J.M. - Female fertility and donor insemination. **Fertil. Steril.**, **1**:37-90, 1982.

- FILICORI, M.; FLAMIGNI, C - Ovulation Induction. Basic science and clinical advances. International Congress Series 1046. **Excerpta medica.**,11-43, 1994.
- FISCH, P.; CASPER, R.F.; BROWN, S.E.; WRIXON, W.; COLLINS, J.A.; REID, R.L.; SIMPSON, C. - Unexplained infertility: evaluation of treatment with clomiphene citrate and human chorionic gonadotrophin. **Fertil. Steril.**, **51**:828-33, 1989.
- FEDERATION CECOS., LANNOU, D.L. & LANSAC, J. - Artificial procreation with frozen donor semen: experience of the French Federation CECOS. **Hum. Rep.**, **4**:757, 1989.
- GEMZELL, C.A.; DICZFALUZY, E.; TILLINGER, K.G. - Clinical effect of human pituitary follicle stimulating hormone. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **18**:1333, 1958.
- GOMEZ, E.; RUIZ, A; REMOHI, J.; PELLICER, A.; TARIN, J.J. - Millones de espermatozoides móviles y tasa de embarazo en inseminación artificial con semen de donante. **Obst Gynecol Espan III**:99-101, 1994..
- GONZALES, G.F.; PELLA, R.E. - Swim-down: a rapid and easy method to select motile spermatozoa. **Arch-Androl.**, **30**:29-34, 1993.
- GORUS, F.K. & PIPELLEERS, D.G. - A rapid method for the fraction of human spermatozoa according to their progressive motility. **Fertil. Steril.**, **35**:662-8, 1981.
- GOULD, J.E.L; OBESTREET, J.W.; HANSON, F.W. - Assessment of human sperm function after recovery from the female reproductive tract. **Biol. Reprod.**, **31**:888-94, 1984.
- GREGOIRE, A.T. & MAYER, R.C. - The impregnations. **Fertil. Steril.**, **16**:130, 1965.
- GREENBLATT, R.B. - Chemical induction of ovulation. **Fertil. Steril.**, **12**:402-04, 1961.
- HUMEL, W.P.; TALBERT, L.M. - Current management of donor insemination program. **Fertil. Steril.**, **51**:919-30, 1989.
- HURD, W.W.; RANDOLPH, J.F.; ANSBACHER, R.; MENGE, A.C.; OHL, D.A.; BROWN, A.N. - Comparison of intracervical, intrauterine, and intratubal techniques for donor insemination. **Fertil. Steril.**, **2 (59)**:339-42, 1993.
- IIZUKA, R. & SAWADA, Y. - Successful artificial inseminations with frozen.-pooled human semen. **Jap. J. Fertil. Steril.**, **3**:241, 1958.
- JAHNELL, F. - Uber die Widerstandsfahigkeit von menschilchen Spermatozoen gegenuber starker Kalte. **Klin. Wscher.** **17**:1273, 1938.

- ITSKOVITZ, J.; BOLDES, R.; LEVRON, J.; THALER, I. - Transvaginal sonography in the diagnosis and treatment of infertility. **J. Clin. Ultrasound.**, **18**:248-56, 1990.
- KARLSTROM, P.O.; BAKOS, O.; BERGH, T.; LUNDKVIST, O. - A prospective randomized trial of artificial insemination versus intercourse in cycles stimulated with human menopausal gonadotrophin or clomiphene citrate. **Fertil. Steril.**, **59**:554-9, 1993.
- KEEL, B.A. & WEBSTER, B.W. - Semen analysis data from fresh and cryopreserved donor ejaculates: comparison of cryoprotectants and pregnancy rates. **Fertil. Steril.**, **52**(1):100-05, 1989.
- KEMMANN, E.; BOHRER, M.; SHELDEN, R.; FIASCONARO, G.; BEARDSLEY, L. - Active ovulation management increases the monthly probability of pregnancy occurrence in ovulatory women who receive intrauterine insemination. **Fertil. Steril.**, **48**:916-20, 1987.
- KHALIFA, Y.; REDGMENT, C.J.; TISRIGOTIS, M.; GRUDZINSKAS, J.G.; CRAFT, I.L. - The value of single versus repeated insemination in intrauterine donor insemination cycles. **Hum. Reprod.**, **10**(1):153-154, 1995.
- KLAUS, J. & QUINN, P.E.. - Human artificial insemination. Some social and legal issues. **Medical Journal of Australia**, **1**:710, 1977.
- KREMER, J.; JAGER, S.; KUIKEN, J. - Treatment of infertility caused by antisperm antibodies. **Int. J. Fertil.**, **23**:270, 1978.
- KRUGER, T.F.; ACOSTA, A.A.; SIMMONS, K.F.; SWANSON, R.J; MATTA, J.F.; OERINGHER, S. - Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. **Fertil. Steril.**, **49**:112-7, 1988.
- LE LANNOU, D.L.; LANSAC, J. - Artificial procreation with frozen donor semen: experience of the French Federation CECOS. **Hum. Reprod.**, **4**:757, 1989.
- LAVY, G.; PELLICER, A.; DIAMOND, M.; DE CHERNEY, A.H. - Ovarian stimulation for IVF, human menopausal gonadotrophin versus pure follicle-stimulating hormone: a randomized prospective study. **Fertil. Steril.**, **50**:74, 1988.
- LEVIE, G.H. - Donor insemination in Holland. **World Medical Journal**, **19**:90, 1972.
- LUCENA, E.; LUCENA, C.; GOMEZ, M.; ORTIZ, J.A.; RUIZ, J.; AVAGNO, A.; DIAZ, C.; BEUERMANN, C. - Recovery of motile sperm using the migration-sedimentation technique in an in vitro fertilization embryo transfer. **Hum. Reprod.**, **4**:163-5, 1989.
- LUNEFELD, B.; MENZI, A.; VOLET, B. - Clinical effects of human menopausal gonadotrophin. **Acta Endocrinol. (Copenh)**, **51**(Suppl):587, 1960.

- LUNEFELD, B.; SULIMOVICI, S.; RABAU, E.; ESHKOL, A. - L'induction de l'ovulation dans les amenorrhées hypophysaires par un traitement combiné de gonadotrophines urinaires ménopausiques et de gonadotrophines chorioniques. **Compts. Rendus de la Societe Franc. Gynecologie.**, 5:1-5, 1962.
- MARINHO, A.O.; SALLAM, H.N.; GOESSENS, L.K.V.; COLLINS, W.P.; RODECK, C.H.; CAMPBELL, S.C. - Real time pelvic ultrasonography during the periovulatory period of patients attending an artificial donor insemination clinic. **Fertil. Steril.**, 37:633-8, 1982.
- MARTINEZ, A.R.; BERNADUS, R.E.; VOORHOST, F.J.; VERMEIDEN, J.P.W.; SCHOEMAKER, J. - A controlled study of human chorionic gonadotrophin induced ovulation versus urinary luteinizing hormone surge for timing of intrauterine insemination. **Hum. Reprod.**, 1247-51, 1991.
- MATTHEWS, C.D.; BROOK, T.J.; CRANSHAW, K.M.; HOPKINS, R.E.; KERIN, J.F.; SVIGOS, J.M. - The influence of insemination timing and semen characteristics on the efficiency of donor insemination program. **Fertil. Steril.**, 31-45, 1979.
- MCGUIRE, M. & ALEXANDER, N. - Artificial insemination of single women. **Fertil. Steril.**, 43:182-6, 1985.
- MOGHISSI, K.S. - Some reflections of intrauterine insemination. **Fertil. Steril.**, 46:13-8, 1986.
- MORTIMER, D. - Carta al editor. **Fertil. Steril.**, 54: 745-8, 1990.
- MOR-YOSEF, S. & SCHENKER, J.G. - Sperm donation in Israel. **Hum. Reprod.**, 10: 965-7, 1995.
- OHASHI, K.; SAJI, F.; WAKIMOTO, A.; KATO, M.; TSUTSUI, T.; TANIZAWA, O. - Preparation of oligozoospermic and/or asthenozoospermic semen for intrauterine insemination using the SpermPrep semen filtration column. **Fertil. Steril.**, 57:866-70, 1992.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE LA SALUD - **Manual de Laboratório de la OMS para el examen y de la interacción entre el semen y el moco cervical.** Buenos Aires, 1987. 41p.
- PATTON, P.E.; BURRY, K.A.; THURM, O.N.D.A.; NOVY, M.J.; WOLF, D.P. - Intrauterine insemination outperforms intracervical insemination in a randomized, controlled study with frozen, donor semen. **Fertil. Steril.**, 57:559-64, 1992.
- PAULSEN, J.D. & POLAKOSKI, K.L. - A glass wool column procedure for removing extraneous material from human ejaculate. **Fertil. Steril.**, 28:178-84, 1977.

- PEDERSEN, H. & LEBE, P.E. - Ultrastructural changes in the human spermatozoos after freezing for artificial insemination. **Fertil. Steril.**, **22**:125-9, 1971.
- PERLOFF, W.H.; STEINBERGER, E.; SHERMAN, J.K. - Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapour technique. **Fertil. Steril.**, **15**:501, 1964.
- PERRY, G.; GLEZERMAN, M.; INSLER, V. - Selective filtration of abnormal spermatozoa by the cervical mucus in vitro. In: INSLER, G BETTENDORF. - **The Uterine Cervix in Reproduction**. Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 1977, p.118-23.
- PETO, R.; PIKE, M.C.; ARMITAGE, P.; BRESLOW, N.E.; COX, D.R.; HOWARD, S.V.; MATEL, N.; MCPHERSON, K.; PETO, J.; SMITH, P.G. - Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. I. Introduction and Design, **Br. J. Cancer**, **34**:585-612, 1976.
- PETO, R.; PIKE, M.C.; ARMITAGE, P.; BRESLOW, N.E.; COX, D.R.; HOWARD, S.; MATEL, N.; MCPHERSON, K.; PETO, J.; SMITH, P.G. - Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. Analysis and examples, **Br. J. Cancer**, **35**:1-39, 1976.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. - Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature, London**, **164**:666, 1949.
- RAYMOND, M.Y.; DAQIN, L.I.B.; ANGELA, M.; HARDING, B.; WARREN, J. - A comparison of Swim-Down and Swim-up method for extraction of high motility sperm. **Fertil. Steril.**, **55**:817-9, 1991.
- REMOHI, J.; GASTALDI, C.; PATRIZIO, P.; GERLI, S.; ORD, T.; ASCH, R.H.; BALMACEDA, J.P. - Intrauterine insemination and controlled ovarian hyperstimulation in cycles before GIFT. **Hum. Reprod.**, **4**:918-22, 1989.
- REMOHI, J.; GALLARDO, E.; SUZUARREGUI, J.L.; SOUZA, L.R.; GUTIERREZ, A.; CANO, F.; AMOROCHO, B.; MOLERO, M.D.; COBO, A.C.; GOMEZ, E. - Inseminación Artificial con semen de donante. In: REMOHI, J.; SIMÓN, C.; PELLICER, A.; BONILLA-MUSOLES, F. - **Reproducción Humana**, Ed. McGraw-Hill, Interamericana, Madrid, 1995, 319-327.
- RHEMREV, J.; JEYENDRAN, V; VERMEIDEN, J; ZANEVELD, L. - Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation. **Fertil. Steril.**, **989**:51:685-90.
- RICHARDS, J.S. - Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiol. Rev.**, **60**:51-89. 1980.

- RICHTER, M.A.; HANNING, R.V. J.R.; SHAPIRO, S.S. - Artificial Donor Insemination: fresh versus frozen semen; the patient as her own control. **Fertil. Steril.**, **41**:277-80, 1984.
- RONNBERG, L.; YLOSTALO, P.; JOUPPIA, P. - Ultrasound to time insemination. **Lancet**, **i**:669-70, 1978.
- SCHOYSMAN, R. - Essais préliminaires de traitement des oligospermies moyennes par la gonadotrophine humaine extraite de l'urine de femmes ménopausées (HMG). **Bull. Soc. Roy. Belg. Gynecol. Obstet.**, **34**:399-404, 1964.
- SCHOYSMAN, R.; DROUART, J.M. - Progrès récent dans la chirurgie de la stérilité masculine et féminine. **Acta. Chir. Belg.**, **71**:261-6, 1972.
- SCHWARTZ, D.; MAYAUX, M.J.; MARTIN-BOYCE, A.; CZYGLIK, F. - Donor insemination conception rate according to cycle day in series of 821 cycles with single insemination. **Fertil. Steril.**, **31**:226, 1979.
- SERACCHIOLI, E.T. - Pregnancy after direct intraperitoneal insemination. **Hum. Reprod.**, **6**:533-7, 1991.
- SHERMAN, J.K. - Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying. **Fertil. Steril.**, **14**:49-54, 1963.
- SHERMAN, J.K. & CHAR, F. - Stability of Y chromosome fluorescence during freeze thawing and frozen storage of human spermatozoa. **Fertil. Steril.**, **25**:311-6, 1974.
- SHERMAN, J.K.; PAULSON, J.D.; LIU, K.C. - Effect of glass wool filtration on ultrastructure of human spermatozoa. **Fertil. Steril.**, **36**:643-8, 1981.
- SILVERBERG, K.M.; JOHNSON, J.V.; OLIVE, D.L.; BURNS, W.N.; SCHENKEN, R.S. - A prospective, randomized trial comparing two different intrauterine insemination regimens in controlled ovarian hyperstimulation cycles. **Fertil. Steril.**, **57**:357-61, 1992.
- STEWART, G. - Transmission of human T-Cell lymphotropic virus type III (HTLV III) by artificial insemination by donor. **Lancet**, **8**:581-5, 1985.
- SUJAN, S.; DANEZIS, J. SOBRERO, J.A. - Sperm migration and cervical mucus in individual cycles. **J. Reprod. Fertil.**, **6**:87-93, 1963.
- TEA, N.T.; JONDET, M.; SCHOLLER, R. - A migration-gravity sedimentation method for collecting motile spermatozoa from human semen. In: HARRISON RF, BONNAR J, THOMPSON W (eds) - **In vitro fertilization embryo transfer and early pregnancy**. (Themes from the XITH WORLD CONGRESS ON FERTIL. STERIL, Dublin, MTP Press LTD, 1983).

- URRY, R.L.; MIDDLETON, R.G.; JONES, K.; POULSON, M.; WORLEY, R.; KEYE, W.
- Artificial insemination: a comparison of pregnancy rates with intrauterine versus cervical insemination and washed sperm versus serum Swim-up sperm preparations. **Fertil. Steril.**, 49:1036-8, 1988.
- WHELAN, D. - The law and artificial insemination with donor semen (IAD). **Med. J. Australia**, 1:56-9, 1978.
- WHITELAW, M.J. Clomiphene citrate: newer aspects of its use in prevention and treatment of infertility. **Fertil. Steril.**, 14:504-6, 1963.
- WIKLAND M, WILK O, STEEN Y, QVIST K, SODERLUND B, JANSON PO.: A Self-Migration method for preparation of sperm for in vitro fertilization. **Hum. Reprod.**, 2:191-5, 1987.