



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO  
INTEGRADO EM MEDICINA**

**JOÃO ANDRÉ NETO PARRA ROCHA GONÇALVES**

***AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO TRATAMENTO DE  
QUIMIOTERAPIA NA FERTILIDADE MASCULINA***

**PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE REPRODUÇÃO HUMANA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
PROF. DOUTORA ANA TERESA ALMEIDA SANTOS  
DR. BELMIRO ATAÍDE DA COSTA PARADA**

**MARÇO/2010**

## Resumo

O cancro do testículo (CT) é a neoplasia maligna mais frequente em homens em idade reprodutiva e a sua incidência está a aumentar. Os avanços no tratamento desta patologia permitem, actualmente, uma sobrevida média de 95% aos cinco anos. Face ao bom prognóstico da doença, o desafio que se impõe à clínica, no presente, consiste em minimizar os efeitos secundários a longo prazo induzidos pela terapêutica, nomeadamente a esterilidade, dado que os estudos actuais mostram que a possibilidade de paternidade futura é uma das principais preocupações dos doentes que sobrevivem ao CT.

No que concerne à fertilidade, os doentes com CT representam um desafio particular uma vez que a sua capacidade reprodutiva não é afectada apenas pelo tratamento (cirurgia, quimio e radioterapia), mas também pelo próprio tumor que se associa à infertilidade, pelo que ambos são incluídos, por alguns autores, na síndrome de disgenesia testicular.

A quimioterapia à base de cisplatina induz na maioria dos doentes azoospermia temporária, sendo que a recuperação da espermatogénese tende a ocorrer com o decorrer do tempo. O número de doentes com recuperação da espermatogénese tende a aumentar num período de pelo menos cinco anos. A probabilidade de melhoria da espermatogénese após a quimioterapia, bem como a sua extensão e velocidade, dependem do citostático usado, da dose administrada e da função testicular de base anterior ao tratamento. Contudo, 15% a 30% dos indivíduos vêm a sua função reprodutiva afectada de forma permanente e ainda que o efeito final da quimioterapia seja dependente da dose é actualmente impossível prever quais os doentes que serão afectados definitivamente.

Actualmente, o único método capaz de preservar a capacidade reprodutiva dos doentes submetidos a terapêuticas gonadotóxicas é a criopreservação de espermatozoides. Se o doente pretender procriar após ter sobrevivido ao cancro e caso apresente insuficiência gonadal

induzida pelos citostáticos, o sêmen preservado previamente pode ser usado em técnicas de procriação medicamente assistida (PMA), normalmente a Fecundação *in Vitro* (FIV) e a Injecção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), sendo que as taxas de gestações obtidas por cada técnica rondam os 24% e os 33%, respectivamente.

O objectivo do presente estudo consiste em verificar o efeito prejudicial da quimioterapia sobre a fertilidade masculina avaliando os parâmetros seminais e as hormonas reprodutivas em doentes com CT antes e após serem submetidos a quimioterapia.

Após a colheita de amostras de sêmen antes e após a quimioterapia, serão avaliadas a concentração e mobilidade espermáticas de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), enquanto a morfologia e a integridade da cromatina serão medidas com recurso a um método de coloração do tipo *Diff-Quik*. A integridade do ácido desoxirribonucleico (ADN) tem sido indicada como sendo um marcador importante da infertilidade masculina e tendo em conta que os parâmetros seminais clássicos não permitem avaliar o estado da cromatina nuclear, torna-se importante determinar o grau de fragmentação do ADN dos espermatozóides e de descondensação da cromatina para uma completa avaliação da qualidade espermática. É de esperar que a maioria dos doentes com CT apresente diminuição da qualidade espermática antes da quimioterapia e que esta agrave com o tratamento. Dois anos após a quimioterapia prevê-se que cerca de metade dos doentes apresente recuperação da espermatogénese.

Nos mesmos períodos, serão obtidas amostras de sangue periférico para determinação das hormonas reprodutivas incluindo a hormona luteinizante (LH), a hormona folículo estimulante (FSH), a inibina B, a testosterona total e a testosterona livre. De acordo com a literatura prevê-se que haja diminuição dos níveis séricos de inibina B e de FSH indicando lesão do epitélio germinativo. Embora as células de Leydig sejam mais resistentes aos fármacos citostáticos, os níveis de LH tendem a estar elevados após a quimioterapia, sinal de

disfunção endócrina. O aumento dos níveis de LH e de FSH permitem manter os níveis de testosterona nos limites da normalidade.

Finalmente, com este projecto pretende-se demonstrar o efeito deletério da quimioterapia sobre a função gonadal de forma a sensibilizar médicos e doentes para a necessidade da criopreservação de esperma antes do início de uma terapêutica gonadotóxica.

## **Abstract**

Testicular cancer (TC) is the most common cancer affecting men in reproductive age and its incidence is increasing. Advances in the treatment of this disease have allowed a survival rate of over 95% after 5 year. With the good prognosis, the clinical challenge nowadays is to minimize the long-term side effects of the cancer treatment, mainly sterility, since studies have shown that the future possibility of parenthood is a major concern between TC survivors.

In terms of fertility, patients with TC represent a particular challenge not only because the reproductive function is affected by the treatment given (surgery, radiotherapy and chemotherapy) but also because TC is known to be associated with male infertility, both included in the testicular dygenesis syndrome, by some authors.

Cisplatin-based chemotherapy results in temporary azoospermia in most patients with a time dependent recovery of spermatogenesis. The proportion of patients with recovery increases for at least 5 years after treatment. The chance of spermatogenesis improvement following cytotoxic insult, as well as the extent and speed of recovery are related to the drug used, the dose received and the baseline testis function prior to therapy. However, 15% to 30% of survivors remain permanently affected and although the final effect is likely to be dose dependent, it is currently impossible to predict who will be affected definitively.

Nowadays, the unique established method used to preserve the male reproductive potential is sperm cryopreservation. If the patient wants to father a child after surviving cancer and if the gonadotoxic treatment has resulted in spermatogenic failure, banked semen can be used for artificial reproductive techniques, usually *in Vitro* Fertilization (IVF) and Intracytoplasmic sperm injection (ICSI), with pregnancy rates being around 24% and 33%, respectively.

The aim of this study is to assess the impairing effect of chemotherapy in the fertility potential by monitoring semen parameters and reproductive hormones from TC patients, before and after chemotherapy.

After collection of semen sample before and after chemotherapy, sperm concentration and motility will be assessed according to the World Health Organization (WHO), while sperm morphology and chromatin integrity will be both evaluated using a Diff-Quik like assay. As DNA integrity has been pointed out as an important marker of male infertility and considering that routine semen parameters are not able to assess sperm nuclear status, the evaluation of sperm deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation and chromatin decondensation seem to be important for a complete evaluation of sperm quality. We predict that the majority of patients with testicular tumors will have reduced sperm quality before chemotherapy and that this will further deteriorate after treatment. Spermatogenesis and sperm concentration are expected to recover in 50% of patients after 2 years of treatment.

In the same periods, peripheral blood samples will be obtained for analysis of reproductive hormones including luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), inhibin B, total and free testosterone. In accordance to the literature we expect to find declining levels of inhibin B and increasing serum FSH levels meaning dysfunction of the germinal epithelium. Although the Leydig cells of the testis are more resistant to cytotoxic

damage, LH levels tend to be elevated after chemotherapy. The increased levels of LH and FSH are suggested to maintain normal testosterone levels.

Finally, with this project we hope to demonstrate the deleterious effects of chemotherapy in testicular function in order to sensitize physician and patients to the necessity of sperm cryopreservation before the beginning of

## **Objectivos**

Considerando a crescente incidência do cancro do testículo na população jovem e o facto de os actuais tratamentos permitirem a sobrevivência destes doentes, torna-se imperioso avaliar o impacto destes na fertilidade.

O presente estudo tem como propósito avaliar os efeitos da quimioterapia na fertilidade masculina em doentes com cancro do testículo, comparando a qualidade espermática nos períodos pré e pós quimioterapia, nomeadamente os parâmetros seminais clássicos e a integridade da cromatina dos espermatozóides, bem como a eventual lesão e recuperação da esteroidogénese testicular condicionada pela quimioterapia.

Pretende-se também desenhar um modelo de prognóstico da recuperação da função testicular após a quimioterapia que permita definir quais os doentes que beneficiarão em recorrer a técnicas de preservação da fertilidade (congelamento de esperma).

Com a realização deste estudo pretende-se ainda avaliar as actuais práticas médicas no que concerne à criopreservação de esperma e contribuir para a sensibilização de médicos e doentes para os efeitos gonadotóxicos da quimioterapia e para a necessidade da criopreservação de sémen, antes de realizar uma terapêutica citotóxica.

## **Estado da arte**

Cerca de 24.000 novos casos de cancro do testículo são diagnosticados anualmente na Europa (1). O cancro do testículo é o tumor de órgão sólido mais comum em homens em idade reprodutiva, constituindo cerca de 17% de todas as neoplasias malignas diagnosticadas em homens com idade inferior a 45 anos (2,3), estando a sua incidência a aumentar no mundo ocidental (4). A sobrevida destes doentes, actualmente estimada em 95% ao fim de cinco anos, melhorou consideravelmente nas últimas décadas, em parte devido à introdução da cisplatina nos protocolos de quimioterapia usados no tratamento do cancro do testículo (5,6,7). Segundo Einhorn e colaboradores (1990) cerca de 80% dos doentes com formas disseminadas de cancro do testículo ficam livres de doença quando tratados com o esquema BEP (bleomicina, etoposido e cisplatina) de quimioterapia (8). Contudo, e apesar do prognóstico favorável da doença, a esterilidade é uma sequela comum em doentes que sobrevivem ao cancro do testículo (9) pelo que o ênfase já não é posto apenas na quantidade mas também na qualidade dos anos de vida ganhos, onde naturalmente se inclui a necessidade de preservação da fertilidade (10). Segundo Saito e colaboradores (2005) o risco de esterilidade constitui mesmo o principal factor de preocupação para os doentes com cancro do testículo quando submetidos a quimioterapia (11).

O cancro, bem como as suas diferentes modalidades de tratamento – cirurgia, quimio e radioterapia – têm um forte impacto deletério na reprodução humana, podendo condicionar um estado de esterilidade transitório ou, mais raramente, definitivo (12). Diferentes mecanismos locais (destruição tecidual directa) e sistémicos (libertação de citocinas e de factores imunológicos) têm sido propostos na tentativa de explicar o efeito negativo do cancro sobre a fertilidade (13). Há mesmo autores que sugerem que o cancro do testículo e a esterilidade terão uma etiologia comum, genética e/ou multifactorial, de tal forma que



englobam estas duas entidades na chamada síndrome de disgenesia testicular (14). Tal associação tem por base, por um lado, uma maior incidência de tumores do testículo em doentes estéreis (15,16) e, por outro, uma percentagem maior de oligo/azoospermia em doentes com cancro do testículo não tratados quando comparados com indivíduos saudáveis (17). A degradação da espermatogénese observada antes mesmo do início do tratamento não se relaciona com o estadio inicial da doença nem com a duração ou severidade dos sintomas atribuíveis ao cancro do testículo (17,2,18,19,20).

A quimioterapia, terapêutica adjuvante comum no tratamento do cancro do testículo, associa-se a múltiplos efeitos secundários, nomeadamente a uma diminuição da qualidade espermática que, por sua vez, condiciona um período mais ou menos longo de infertilidade (2,21). A escolha e a combinação dos fármacos citostáticos, bem como as suas doses cumulativas, determinam a natureza e a extensão da lesão gonadal (13,12).

Entre as células germinativas, as células estaminais espermatogoniais e as espermatogónias são o alvo preferencial dos fármacos citostáticos uma vez que apresentam intensa actividade proliferativa (22). Pelo contrário, as espermátides e os espermatozóides são relativamente resistentes aos citotóxicos pelo que o efeito deletério da quimioterapia sobre a fertilidade não é, por norma, imediato mas diferido, manifestando-se habitualmente ao fim de três meses (semi-vida média dos espermatozóides) após o início do tratamento (2).

A cisplatina, fármaco muito utilizado nos protocolos de quimioterapia para tratamento do cancro do testículo, associa-se ao desenvolvimento de azoospermia após o tratamento (2,12). Peterson e colaboradores (1994) demonstraram que a cisplatina apresenta um perfil de toxicidade dependente da dose, sendo que, para doses cumulativas superiores a 400-600 mg/m<sup>2</sup>, condiciona estados de oligozoospermia severos, enquanto se usada em doses mais baixas apenas condiciona lesão transitória da espermatogénese (23). Por outro lado, o recurso a esquemas terapêuticos com menor toxicidade, como os que têm por base a carboplatina,

confere uma probabilidade maior de recuperação da capacidade reprodutiva, permitindo mesmo manter concentrações espermáticas no limite da normalidade após vários ciclos de quimioterapia (2,20).

O restabelecimento da espermatogénese vai depender da existência de células estaminais espermatogoniais nos tubos seminíferos com capacidade proliferativa e de diferenciação em espermatozóides (2,22). Um ano após a quimioterapia cerca de metade dos doentes com cancro do testículo apresentam recuperação da concentração espermática, percentagem que ultrapassa os 80% ao fim de cinco anos (20,24). Contudo, cerca de 15 a 30% dos sobreviventes desenvolvem azoospermia permanente (5). Os factores que mais condicionam a recuperação da espermatogénese são a qualidade espermática anterior ao tratamento e o tipo e dose do fármaco citostático usado (2,20).

Estudos em animais sugerem que os citostáticos podem induzir mutações no genoma das células germinativas passíveis de serem transmitidas à descendência (2,4). Contudo, em humanos, tal evidência é ainda controversa, havendo ensaios que apontam para a existência de um risco acrescido de mutações no genoma dos espermatozóides até algumas semanas após o fim da quimioterapia, em oposição a outros que referem não haver diferenças significativas na frequência de alterações cromossómicas estruturais ou numéricas antes e após a realização da terapêutica (2,25,4).

O sistema reprodutor masculino é regulado por três hormonas principais: a FSH, a LH e a testosterona que se encontra na forma livre ou ligada à globulina transportadora das hormonas sexuais. A testosterona pode ser convertida em 17- $\beta$ -estradiol, sendo que o equilíbrio que se estabelece entre os androgénios e os estrogénios é essencial para o normal desenrolar da espermatogénese. Todos estes processos são regulados por mecanismos de *feedback* negativo exercidos sobre a glândula pituitária quer pela testosterona que inibe a

libertação de LH quer pela inibina B, hormona produzida pelas células de Sertoli e que frena a libertação de FSH (12,13).

Os tratamentos de quimioterapia parecem afectar os níveis das hormonas reprodutivas. De facto, os níveis séricos de FSH parecem aumentar imediatamente após o início da quimioterapia, indicando disfunção precoce do epitélio germinativo (19,6,26,27,28,29). Embora as células de Leydig sejam mais resistentes à citotoxicidade, quando comparadas com as células germinativas, o aumento dos níveis de LH sugere que existe também um certo grau de disfunção endócrina. Tal aumento representa provavelmente um mecanismo compensatório em resposta a uma diminuição do efeito de *feedback* negativo exercido pela testosterona sobre o eixo hipotálamo-hipofisário, consequência de uma menor produção desta hormona pelas células intersticiais (6,27,29). Contudo, a elevação da LH e da FSH permite manter concentrações normais de testosterona (6,27,29,30). A avaliação do impacto da quimioterapia sobre a esteroidogénese testicular foi substancialmente melhorada com a descoberta de novos marcadores endócrinos da espermatogénese de que é exemplo a inibina B (31,32). Os níveis séricos desta hormona antes do início do tratamento, frequentemente diminuídos em consequência da lesão do epitélio germinativo condicionada pelos citostáticos, revelaram ser o marcador que melhor prediz a probabilidade de recuperação da espermatogénese (2,21,33). Já os níveis de FSH pré-quimioterapia não mostraram grande vantagem como preditores da melhoria da espermatogénese tendo em conta a marcada variabilidade inter-individual dos níveis séricos basais desta hormona (2).

Não existe actualmente nenhum método farmacológico que permita reduzir o impacto da quimioterapia sobre a fertilidade. Apesar dos resultados promissores dos análogos das hormonas libertadoras das gonadotrofinas em roedores, estes não revelaram ser eficazes em humanos (22,34).

Embora se aceite que o efeito final da quimioterapia sobre a fertilidade masculina seja, por norma, dependente da dose, é actualmente difícil de prever quais os doentes que verão afectada a sua capacidade reprodutiva de forma permanente após o tratamento, pelo que a criopreservação de sémen deve ser oferecida a todos os doentes com cancro que sejam submetidos a terapêuticas gonadotóxicas (5,12,24,35). Saito e colaboradores (2005) demonstraram que a criopreservação de sémen ajuda a mitigar o impacto psicológico negativo que o cancro representa para o doente (11).

A prevenção da esterilidade no contexto da doença oncológica deve começar por um diálogo franco entre o médico e o doente sobre a ameaça potencial que o cancro e o seu tratamento representam para a fertilidade futura (12), independentemente da idade do doente (9). Esta problemática urge ser encarada antes mesmo da escolha e do início da terapêutica do cancro, devendo as medidas preventivas ser tomadas numa abordagem multidisciplinar que envolva médicos oncologistas, urologistas e especialistas em medicina da reprodução (12).

A criopreservação de esperma, técnica simples e acessível, é actualmente o único método que permite preservar a capacidade reprodutiva dos doentes oncológicos submetidos a terapêuticas gonadotóxicas (5,21,36,37). Idealmente, a criopreservação de espermatozóides deve ser feita antes mesmo do início do tratamento e, se possível, múltiplas amostras de sémen devem ser preservadas (12). Petersen e colaboradores (1994) sugerem que os doentes com cancro do testículo devem congelar o seu sémen antes de serem submetidos a orquidectomia (38).

Apesar do efeito nocivo que o cancro e a sua terapêutica representam para a fertilidade e ainda que a criopreservação de sémen seja hoje um procedimento de rotina num grande número de centros de oncologia, apenas um pequeno número de doentes recorre a esta técnica (5,39). Frequentemente, os doentes não são informados sobre a congelação de esperma e

mesmo entre os que se dizem devidamente informados, 42% a 54% optam por não criopreservar o seu esperma (21,40).

Em aproximadamente 11% dos doentes com cancro não é possível proceder à criopreservação de sémen devido à ausência de espermatozóides móveis ou a uma insuficiência da sua produção (21). Em doentes pré-púberes, dada a imaturidade das suas gónadas a criopreservação de sémen é impraticável, pelo que hoje se estudam alternativas como a criopreservação de tecido testicular (41).

Dos doentes que decidem criopreservar o seu sémen, apenas uma minoria, cerca de 10%, tem necessidade de recorrer aos espermatozóides criopreservados, seja porque conseguem procriar por meios naturais ou com recurso a técnicas de PMA usando os seus ejaculados oligozoospermicos, ou porque simplesmente optam por não procriar após o tratamento (21,37,12,5,11).

A percentagem de gestações obtidas através da FIV e da ICSI recorrendo a esperma criopreservado ronda os 24% e os 33%, respectivamente (37,42). Mesmo em doentes com baixa qualidade espermática, a criopreservação deve ser encorajada uma vez que para o sucesso da ICSI apenas são necessárias pequenas quantidades de espermatozóides viáveis (21,4).

## **Tarefas**

### **Tarefa 1**

#### **Designação da tarefa**

Seleção e caracterização dos indivíduos que serão incluídos no estudo.

#### **Descrição da tarefa**

O objectivo da primeira tarefa consiste na selecção dos indivíduos a serem incluídos no presente estudo.

Durante um período de três anos, os participantes serão recrutados de forma voluntária no âmbito da consulta de Hospital de Dia do Serviço de Urologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC). No estudo serão incluídos doentes com cancro do testículo propostos para quimioterapia, após a obtenção do seu consentimento livre e esclarecido, declarado por preenchimento de formulário próprio em concordância com os requisitos definidos pelos HUC para a investigação clínica (anexo 1). Os indivíduos serão informados de que as amostras obtidas não serão usadas para além do âmbito do estudo proposto e será solicitada a aprovação do estudo pela Comissão de Ética dos HUC.

Deverão ser excluídos os doentes submetidos a radioterapia abdominal e/ou pélvica ainda que no contexto do tratamento da sua doença oncológica ou que desenvolvam doença recidivante durante o estudo, uma vez que as radiações ionizantes, tal como o cancro, condicionam por si só degradação da qualidade espermática. De igual modo não serão incluídos no estudo doentes previamente submetidos a vasectomia, portadores de doenças crónicas que condicionem reconhecidamente estados de sub-fertilidade, como por exemplo a fibrose quística, ou que não tenham iniciado ainda o seu desenvolvimento pubertário, dado

não existir, actualmente, nenhum método eficaz que permita preservar a fertilidade em indivíduos pré-puberes.

Os doentes deverão responder a um questionário (anexo 2) elaborado com o intuito de fazer um levantamento adequado de outras variáveis que, para além da quimioterapia, possam condicionar a qualidade espermática. A realização de tal inquérito permitirá ainda avaliar a existência de antecedentes pessoais de esterilidade. Os doentes serão ainda inquiridos sobre a sua opção face à criopreservação de esperma antes do início da quimioterapia, bem como sobre a atitude do seu médico assistente perante esta mesma problemática.

### **Resultados esperados**

Tendo em conta o número médio de doentes com cancro do testículo que anualmente são submetidos a quimioterapia no Serviço de Urologia dos HUC é de esperar que ao fim de três anos de recrutamento se obtenha uma amostra de aproximadamente 40 indivíduos.

No que se refere ao padrão histológico do tumor testicular prevê-se que cerca de 70% dos doentes sejam portadores de tumores não seminomatosos e que os restantes 30% apresentem tumores do tipo seminomatoso.

## **Tarefa 2**

### **Designação da tarefa**

Avaliação da qualidade espermática.

### **Descrição da tarefa**

A presente tarefa permitirá determinar a influência da quimioterapia sobre a qualidade espermática, através do estudo de amostras de sémen de doentes com cancro do testículo obtidas antes e depois da realização do referido tratamento.

A colheita e análise das amostras serão feitas no Serviço de Reprodução Humana dos HUC. As amostras de esperma serão colhidas antes do início do tratamento e seis, doze e vinte e quatro meses após o termo do mesmo. Os doentes deverão cumprir um período de abstinência sexual de três a cinco dias imediatamente antes da colheita do sémen. Os ejaculados serão obtidos por masturbação e armazenados em recipiente próprio e esterilizado, devendo ser processados até uma hora após a sua colheita.

Após a liquefacção da amostra, que ocorre cerca de meia hora após a colheita, proceder-se-à à realização de um espermograma que consiste na avaliação macroscópica (cor, aparência, viscosidade, volume e pH) e microscópica (concentração, mobilidade, morfologia e viabilidade espermáticas, e presença de leucócitos e/ou aglutinados) do sémen.

A qualidade espermática aferir-se-à avaliando os parâmetros seminais clássicos, nomeadamente a concentração e a mobilidade espermáticas, de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (43) e a morfologia dos espermatozóides de acordo com os critérios estritos de Krüger (44). A concentração, definida como o número de espermatozóides por mililitro de sémen, será determinada com recurso à câmara de Markler. Em função da concentração espermática os doentes podem ser considerados normozoospermicos



( $\geq 20 \times 10^6$ /mL), oligozoospermicos ( $< 20 \times 10^6$ /mL) ou azoospermicos ( $0 \times 10^6$ /mL). A mobilidade espermática considera-se normal quando metade ou mais dos espermatozóides apresentam mobilidade progressiva (rápida mais lenta). Uma percentagem igual ou superior a 14% de espermatozóides com morfologia normal, segundo os critérios de Krüger, é tida como normal. A viabilidade dos espermatozóides será avaliada usando o método da eosina/nigrosina e será expressa por percentagem de espermatozóides viáveis.

A evidência actual sugere que os parâmetros seminais clássicos não permitem caracterizar com exactidão o estado de fertilidade de um individuo sendo apenas meros indicadores da qualidade espermática e de função do aparelho reprodutor masculino. É hoje consensual que a lesão da cromatina dos gâmetas masculinos influencia negativamente as taxas de fecundidade, pelo que tem sido considerada como um importante marcador da infertilidade masculina (45). A monitorização da integridade da cromatina dos espermatozóides será feita recorrendo a um método de coloração tipo *Diff-Quik*, já implementado na maioria dos laboratórios de Reprodução Humana, para aferir a morfologia espermática e que segundo Sousa e colaboradores (2009) pode ser adaptado como um indicador fiável e reprodutível da integridade da cromatina no espermatozóide humano. A técnica do *Diff-Quik assay* baseia-se nas diferentes intensidades de coloração do núcleo dos espermatozóides, sendo que os núcleos normais apenas coram levemente, enquanto os núcleos com fragmentação do ADN ou descondensação da cromatina tendem a apresentar-se mais escuros. Para o estudo da integridade do ADN espermático deverá proceder-se à realização de um esfregaço seguida de fixação com metanol e de coloração sequencial com eosina (que cora de vermelho as proteínas carregadas positivamente) e com azul de metileno (que cora o ADN de azul). Ainda de acordo com o estudo anterior, considera-se haver repercussão sobre a fertilidade quando a percentagem de espermatozóides com lesão do ADN é igual ou superior a 33% do total (45).

## **Resultados esperados**

Com base na literatura actual é de esperar que ainda antes do início da quimioterapia haja degradação mais ou menos marcada dos parâmetros seminais clássicos, em cerca de 50-70% dos doentes com cancro do testículo, explicada pela existência de disfunção gonadal prévia, frequentemente associada à génese do cancro do testículo, e pelo efeito deletério da orquidectomia. Os doentes com cancro do testículo tendem a apresentar concentrações espermáticas mais baixas em comparação com portadores de outras neoplasias malignas.

Espera-se que os parâmetros seminais clássicos registem uma melhoria progressiva nas amostras obtidas após a quimioterapia de tal forma que ao fim de dois anos cerca de metade dos doentes apresentem recuperação da espermatogénese, ainda que parcial.

No que se refere à integridade da cromatina, Spermon e colaboradores (2006) verificaram que a percentagem de espermatozóides com lesão da cromatina é elevada, quer antes quer após a quimioterapia, em doentes com cancro do testículo (6). Contudo, é de esperar que a percentagem de espermatozóides com lesão da integridade do ADN diminua em função do tempo decorrido após a realização da quimioterapia adjuvante, ainda que não para níveis semelhantes aos registados antes do tratamento.

### **Tarefa 3**

#### **Designação da tarefa**

Análise dos níveis séricos das hormonas reprodutivas.

#### **Descrição da tarefa**

O objectivo da presente tarefa consiste em determinar o efeito da quimioterapia nos níveis séricos das hormonas reprodutivas, condicionado pela interferência dos fármacos citostáticos no eixo hipotálamo-hipofiso-gonadal.

Neste projecto, proceder-se-à à realização dos doseamentos plasmáticos de FSH, LH, inibina B, testosterona total e testosterona livre em amostras de sangue que deverão ser obtidas nos dias da colheita do sémen. Os níveis séricos das referidas hormonas serão determinados usando técnicas de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) e RIA (Radio Immuno Assay) e serão realizados no Serviço de Patologia Clínica dos HUC.

Para além de comparar os níveis séricos hormonais nos períodos pré e pós quimioterapia, existe a intenção de avaliar possíveis correlações entre estes e os parâmetros seminais monitorizados na tarefa anterior de forma a aferir o impacto dos citostáticos na função testicular endócrina e exócrina, respectivamente.

#### **Resultados esperados**

No que se refere ao doseamento dos níveis séricos das gonadotrofinas - FSH e LH – é de esperar que estes se encontrem aumentadas após os ciclos de quimioterapia. O aumento da FSH será tão precoce quanto a lesão do epitélio germinativo e relacionar-se-à inversamente com os níveis de inibina B que tenderão a estar diminuídos. Segundo a literatura é de esperar que os níveis séricos de testosterona estejam dentro dos limites da normalidade, uma vez que

a elevação das gonadotrofinas permitirá compensar a lesão das células intersticiais produtoras de androgénios.

Já no período pré quimioterapia os níveis plasmáticos de inibina B tendem a estar diminuídos. Segundo van Casteren e colaboradores (2010), os doentes com cancro do testículo apresentam, antes mesmo do tratamento gonadotóxico, níveis mais baixos de inibina B quando comparados com portadores de outras neoplasias (21). Ainda que, segundo os mesmos autores, os níveis séricos de FSH surjam frequentemente elevados antes do início da quimioterapia, não parecem existir diferenças estatisticamente significativas entre os doentes com tumores do testículo e outras neoplasias. A inibina B revelou ser o marcador hormonal que melhor se correlaciona com a concentração espermática, antes do início do tratamento, dado que no grupo de doentes com oligo/azoospermia a percentagem de indivíduos com diminuição dos níveis séricos de inibina B e com elevação dos níveis de FSH é de 75% e 38%, respectivamente.

Nos doentes em que se observe uma recuperação progressiva da espermatogénese é de esperar que os níveis séricos das hormonas sexuais tendam a normalizar, uma vez que as alterações encontradas apresentam como substrato histológico a destruição do epitélio germinativo e das células de Leydig.

## **Tarefa 4**

### **Designação da tarefa**

Sensibilização de médicos e doentes para as vantagens da criopreservação de esperma na abordagem do doente com cancro.

### **Descrição da tarefa**

Face aos resultados esperados, descritos anteriormente, e segundo a literatura, parece evidente a necessidade de sensibilizar os responsáveis hospitalares, em geral, e os médicos oncologistas, em particular, para a necessidade de incluir a criopreservação de esperma na abordagem do doente oncológico. Para tal, proceder-se-à à divulgação dos resultados obtidos com o presente projecto de investigação junto de diferentes instituições hospitalares como forma de sensibilizar os seus responsáveis para a importância de incluir a criopreservação de sémen nos protocolos terapêuticos dos doentes com cancro. Considera-se também a possibilidade de realização de acções de formação junto do pessoal médico com destaque para as actuais perspectivas de preservação da fertilidade.

Também os doentes serão alvo de acções de sensibilização, nomeadamente através da distribuição de panfletos em que se procurará explicar os efeitos nocivos que o cancro e o seu tratamento constituem para a fertilidade e sobre como os prevenir.

### **Resultados esperados**

Com este estudo, pensamos poder contribuir para a sensibilização dos médicos e doentes para os efeitos gonadotóxicos da quimioterapia e para a necessidade da criopreservação de sémen, antes de realizar uma terapêutica citotóxica, como forma de preservar a fertilidade.

## Orçamento previsto para e execução do projecto

Tarefas	Encargos	Preço/Unidade	Total
<b>1</b>	Inquéritos	0,15€	6€
	Consentimento informado	0,03€	1,20€
<b>2</b>	Espermograma	85€	13600€
<b>3</b>	Doseamento dos níveis séricos das hormonas reprodutivas	40€	6400€
<b>4</b>	Formador	-	200€
	Panfletos/Divulgação	-	100€

Custo total previsto: 20307,2€

## **Bibliografia**

1. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Kaatsch P, Berrino F, Coebergh JW (2004) ACCIS Scientific Committee. Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since the 1970s (the ACCIS project): an epidemiological study. *Lancet* 364:2097-105.
2. Trottmann M, Becker AJ, Stadler T, Straub J, Soljanik I, *et al* (2007) Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation. *European Urology* 52: 355-367.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74-108.
4. Stahl O, Eberhard J, Jepson K, Spano M, *et al* (2004) The impact of testicular carcinoma and its treatment on sperm DNA integrity. *Cancer* 100(6): 1137-1144.
5. Achille MA, Rosberger Z, Robitaille R, Lebel S, *et al* (2006) Facilitators and obstacles to sperm banking in young men receiving gonadotoxic chemotherapy for cancer: the perspective of survivors and health care professionals. *Hum Reprod* 21(12): 3206-3216.
6. Spermon JR, Ramos L, Wetzels AMM, Sweep CG, Braat DDM, *et al* (2006) Sperm integrity pre and post-chemotherapy in men with testicular germ cell cancer. *Hum Reprod* 21(7): 1781-1786.
7. Einhorn LH, Donohue JP (1998) Advanced testicular cancer: update for urologists. *J Urol* 160,1964-1969.
8. Einhorn LH (1990) Treatment of testicular cancer. A new and improved model. *J Clin Oncol* 8:1777-1781.

9. Mancini J, Rey D, Préau M, Malavolti L, *et al* (2008) Infertility induced by cancer treatment: inappropriate or no information provided to majority of french survivors of cancer. *Fertil Steril* 90(5): 1616-1625.
10. Andersen RA (2008) Fertility preservation techniques: laboratory and clinical progress and current issues. *Reproduction* 163: 667-669.
11. Saito K, Suzuki K, Iwasaki A, Yumura Y, Kubota Y (2005) Sperm cryopreservation before cancer chemotherapy helps in the emotional battle against cancer. *Cancer* 104: 521-524.
12. Magelssen H, Brydoy M, Fossa SD (2006) The effects of cancer and cancer treatments on male reproductive function. *Nature Clinical Practice Urology* 3(6): 312-322.
13. Mitwally MFM (2007) Effect of cancer and cancer treatment on human reproduction. *Expert Rev Anticancer Ther.* 7(6): 811-822.
14. Paduch DA (2006) Testicular cancer and male infertility. *Curr Opin Urol* 16: 419-427.
15. Doria-Rose VP, Biggs ML, Weiss NS (2005) Subfertility and the risk of testicular germ cell tumors. *Cancer Causes and Control* 16:651-656.
16. Raman JD, Nobert CF, Goldstein M (2005) Increased incidence of testicular cancer in men presenting with infertility and abnormal semen analysis. *J Urol* 174,1819-1822.
17. Lambert SM, Fisch H (2007) Infertility and testis cancer. *Urol Clin Am* 34: 269-277.
18. Agarwal A, Allamaneni SS (2005) Disruption of spermatogenesis by the cancer disease process. *J Natl Cancer Inst Monogr* 34:9-12.
19. Hendry WF, Stedronska J, Jones CR, Blackmore CA, *et al* (1983) Semen analysis in testicular cancer and Hodgkin's disease: pre and post-treatment findings and implications for cryopreservation. *British Journal of Urology* 55: 769-773.
20. Lampe H, Horwich A, Norman A, Nicholls J, Dearnaley DP (1997) Fertility after chemotherapy for testicular germ cell cancers. *J Clin Oncol* 15: 239-245.



21. van Casteren NJ, Boellaard WPA, Rominjn JC, Dohle GR (2010) Gonadal dysfunction in male cancer patients before cytotoxic treatment. *International Journal of Andrology* 33: 73-79.
22. Shetty G, Meistrich ML (2005) Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. *J Natl Cancer Inst Monogr* 34:36-39.
23. Petersen PM, Hansen SW, Giwercman A, Rorth M and Skakkebaek NE (1994) Dose-dependent impairment of testicular function in patients treated with cisplatin-based chemotherapy for germ cell cancer. *Ann Oncol* 5,355-358.
24. Howell SJ, Shalet, SM (2005) Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *J Natl Cancer Monogr Inst* 34: 12-17.
25. Wyrobek AJ, Schmid TE, Marchetti F (2005) Relative susceptibilities of male germ cells to genetic defects induced by cancer chemotherapies. *J Natl Cancer Inst Monogr* 34:31-35.
26. Drasga RE, Einhorn LH, Williams SD, Patel DN, Stevens EE (1983) Fertility after chemotherapy for testicular cancer. *L Clin Oncol* 1(3): 179-183.
27. Hansen SW, Berthelsen JG, von der Maase H (1990) Long term fertility and Leydig cell function in patients treated for germ cell cancer with cisplatin, vinblastine and bleomicine versus surveillance. *J Clin Oncol* 8,1695-1698.
28. Meistrich ML (1986) Relationship between spermatogonial stem cell survival and testis function after cytotoxic therapy. *Br J Cancer Suppl* 7,89-101.
29. Howell SJ, Radford JÁ, Ryder WD, Shalet SM (1999) Testicular function after cytotoxic chemotherapy: evidence of Leydig cell insufficiency. *J Clin Oncol* 17,1493-1498.

30. Nijman JM, Schraffordt Koops H, Kremer J, Sleijfer DT (1987) Gonadal function after surgery and chemotherapy in men with stage II and III nonseminomatous testicular tumors. *J Clin Oncol* 5,651-656.
31. Pierik FH, Vreeburg JTM, Stijnen T, Jong FH, Weber RFA (1998) Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3110-3114.
32. Pierik FH, Burdorf A, Jong FH, Weber RFA (2003) Inhibin B: a novel marker of spermatogenesis. *Ann Med* 35:12-20.
33. Petersen PM, Andersson AM, Rorth M, Daugaard G, Skakkebaek NE (1999). Undetectable inhibin B serum levels in men after testicular irradiation. *J Clin Endocrinol Metab* 84:213-5.
34. Meistrich ML, Shetty G (2008) Hormonal suppression for fertility preservation in males and females. *Reproduction* 136,691-701.
35. Colpi GM, Contalbi GF, Nerva F, Sagone P, Piediferro G (2004) Testicular function following chemo-radiotherapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 113(Suppl 1),S2-S6.
36. Puscheck E, Philipp PA, Jeyendran RS (2004) Male fertility preservation and cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 30,173-180.
37. van Casteren NJ, Santbrink EJP, Inzen W, Romijn JC, *et al* (2008) Use rate and assisted reproduction technologies outcome of cryopreserved semen from 629 cancer patients. *Fertil Steril* 90(6): 2245-2250.
38. Petersen PM, Skakkebaek NE, Rorth M, Giwercman A (1998) Semen quality and reproductive hormones before and after orchiectomy in men with testicular cancer. *The Journal of Urology* 161: 822-826.

39. Schover LR, Brey K, Lichtin A, Lipshultz LI, Jeha S (2002) Knowledge and experience regarding cancer infertility and sperm banking in younger male survivors. *J Clin Oncol* 20(7),1880-1889.
40. Kliesch S, Bergmann M, Hertle L, Nieschlag E, Behre HM (1997) Semen parameters and testicular pathology in men with testicular cancer and contralateral carcinoma in situ or bilateral testicular malignancies. *Human Reprod* 12(12),2830-2835.
41. Revel A, Revel-Vilk S (2008) Pediatric fertility preservation: is it time to offer testicular tissue cryopreservation? *Mol Cell Endocrinol* 282: 143-149.
42. Agarwall A, Ranganathan P, Kattal N, Pasqualloto F, Hallak J, Khayal S, Mascha E (2004) Fertility after cancer: a prospective review of assisted reproductive outcome with banked semen specimens. *Fertility and Sterility* 90,2245-2250.
43. WHO (1999) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University.
44. Krüger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, van der Merwe JP, van Zyl JÁ, Smith K (1986) Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 46:1118-1123.
45. Sousa APM, Tavares RS, Calle JFV, Figueiredo H, *et al* (2009) Dual use of Diff-Quik-like stains for the simultaneous evaluation of human sperm morphology and chromatin status. *Human Reproduction*, 24(1): 28-36.

***AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO TRATAMENTO DE QUIMIOTERAPIA NA  
FERTILIDADE MASCULINA***

**Declaração de consentimento informado**

Eu, abaixo assinado \_\_\_\_\_,  
portador do Bilhete de Identidade nº \_\_\_\_\_, nascido a \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ em \_\_\_\_\_, declaro ter conhecimento dos  
objectivos do estudo “Avaliação do impacto do tratamento de quimioterapia na fertilidade  
masculina” e aceito colaborar no mesmo através da doação de amostras de sangue e sémen  
que serão obtidas antes e após a realização do tratamento de quimioterapia. Declaro ainda ter  
conhecimento de que as amostras biológicas se destinarão exclusivamente à análise da  
qualidade espermática, ao doseamento plasmático de FSH, LH, testosterona e que os  
resultados dos mesmos serão mantidos confidenciais.

Data:    /    /

\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

# INQUÉRITO

Leia atentamente e responda a todas as perguntas que lhe são apresentadas.

Assinale com um X a(s) resposta(s) mais adequada(s) e utilize letras maiúsculas.

Nome: \_\_\_\_\_

1. Data de Nascimento:             

2. Altura: \_\_\_\_\_ cm

3. Peso: \_\_\_\_\_ kg

4. Trabalha?     Sim     Não

Se sim, qual a sua actividade principal? \_\_\_\_\_

Se não:     Estudante     Desempregado

5. Na sua actividade profissional encontra-se ou encontrou-se exposto a:

Tintas?     Sim     Não

Solventes?     Sim     Não

Pesticidas?     Sim     Não

Metais?     Sim     Não

Temperaturas elevadas?     Sim     Não

Baixas temperaturas?     Sim     Não

Radiação?     Sim     Não

Poeiras (cimento, amianto, etc)?     Sim     Não

Outros químicos industriais?     Sim     Não    Quais? \_\_\_\_\_

**6. Relativamente aos seus tempos livres fez, nos últimos 6 meses, alguma actividade em que tenha estado em contacto com:**

- |  |                              |   |
|--|------------------------------|---|
| Tintas?  | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não            |
| Solventes?                                       | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não            |
| Pesticidas?                                      | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não            |
| Metais?  | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não            |
| Temperaturas elevadas (sauna, banho turco, etc)? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não            |
| Baixas temperaturas?                             | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não            |
| Radiação?  | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não            |
| Poeiras?   | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não            |
| Outros químicos?                                 | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não Quais? ___ |

**7. Fuma?**  Sim  Não  Ex-fumador

há menos de 3 meses

há mais de 3 meses

Se sim ou se ex-fumador: \_\_\_ cigarros/dia

**8. Consume bebidas alcoólicas?**  Sim  Não

**Se sim**, com que frequência?

Diária Especifique a quantidade/dia \_\_\_\_\_

Ocasional Especifique a quantidade/semana \_\_\_\_\_

**9. Consome ou consumiu drogas nos últimos 6 meses?**

- Sim
- Não
- Ex-toxicodependente

Se ex-toxicodependente, há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Se toxicodependente ou ex-toxicodependente, especifique a(s) droga(s) consumida(s)

\_\_\_\_\_

**10. Toma ou tomou suplementos alimentares nos últimos 6 meses?**  Sim  Não

**Se sim**, contendo:

- |            |                              |                              |
|------------|------------------------------|------------------------------|
| Cobre?     | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| Zinco?     | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| Selénio?   | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| Magnésio?  | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| Ferro?     | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| Vitaminas? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |

Caso não saiba especificar, indique o nome comercial do(s) suplemento(s): \_\_\_\_\_

**11. Anteriormente, já, alguma vez, foi submetido a um tratamento de rádio ou quimioterapia?**

- Sim
- Não

**Se sim**, qual foi a razão? \_\_\_\_\_

**12. Sofre de alguma doença crónica (doença que não é resolvida usualmente em 3 meses)?**

Sim    Não

**Se sim:**

- Osteoarticular    Renal    Otorrinolaringologia    Digestiva  
 Tuberculose    Respiratória    Neurológica    Oftalmológica  
 Genito-urinária    Obesidade    Endócrina    Psíquica  
 Cardíaca    Hepatite    Sanguínea  
 Outra \_\_\_\_\_

**13. Sofre de doenças da tiróide?**    Sim    Não

**Se sim,** toma medicamentos?    Sim    Não

**14. Toma medicamentos, diariamente?**    Sim    Não

**Se sim,** especifique \_\_\_\_\_

**15. Para além dos medicamentos acima referidos, tomou outro(s), nos últimos 3 meses?**

Sim    Não

**Se sim,** especifique \_\_\_\_\_

**16. Submeteu-se a alguma terapia hormonal nos últimos 6 meses?**    Sim    Não

**17. Sofre ou já sofreu de alguma doença sexualmente transmissível?**    Sim    Não

- Se sim,**
- SIDA
  - Gonorreia
  - Sífilis
  - Herpes genital
  - Linfgranuloma venéreo
  - Infecção por clamídia



Outra \_\_\_\_\_

**18. Sofre ou já sofreu de infecções urogenitais?**  Sim  Não

**Se sim,**  Uretrite

Orquite

Epididimite

Prostatite

Outra \_\_\_\_\_

**19. É ou foi portador de anomalias urogenitais?**  Sim  Não

**Se sim,**

Varicocelo (operado?  Sim  Não; **se sim,** com que idade? \_\_\_\_\_)

Criptorquidismo, isto é, testículos fora das bolsas escrotais (idade em que foi operado \_\_\_\_\_)

Hipospadias (posição anormal da uretra)

Hipogonadismo (desenvolvimento insuficiente dos caracteres sexuais)

**20. Alguma vez sofreu uma torção testicular?**  Sim  Não

**Se sim,** foi operado?  Sim  Não; **Se sim,** com que idade? \_\_\_\_\_

**21. Alguma vez sofreu algum traumatismo testicular?**  Sim  Não

**Se sim,** com que idade? \_\_\_\_\_

**22. Sofre ou sofreu de uma hérnia inguinal?**  Sim  Não

**Se sim,** foi operado?  Sim  Não; **Se sim,** com que idade? \_\_\_\_\_

**23. Enquanto adulto, já sofreu de papeira?**  Sim  Não

24. Tem filhos?  Sim  Não

25. Já teve necessidade de se submeter a algum tratamento de fertilidade?  Sim  Não

Se sim,  Fertilização *In Vitro* (FIV)

Injecção Intracitoplásmica de um Espermatozóide (ICSI)

Inseminação Artificial

26. Foi aconselhado pelo seu médico urologista sobre a possibilidade de criopreservar o seu esperma?  Sim  Não

27. Antes de iniciar tratamento de quimioterapia procedeu à congelação de sémen?

Sim  Não

Se sim, onde?  Hospitais da Universidade de Coimbra

Outro; Qual? \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

---

(Assinatura)

## **Agradecimentos**

À Orientadora, Professora Doutora Ana Teresa Almeida Santos, e ao co-Orientador, Dr. Belmiro Parada, que com a sua colaboração conseguiram valorizar este projecto, agradeço a total disponibilidade e o empenho sentido na sua conclusão. Uma palavra de agradecimento à Doutora Ana Paula Sousa (Serviço de Reprodução Humana dos HUC) pela inestimável colaboração que prestou na realização do presente projecto de investigação.