



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Métodos não-cirúrgicos de contraceção masculina: progressos e perspectivas

Bruno Miguel Morgado Morrão

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutora Sílvia Cristina Cruz Marques Socorro
Co-orientador: Prof. Doutor José Eduardo Brites Cavaco

Covilhã, Junho de 2011

Agradecimentos

Qualquer trabalho na nossa vida deve ser marcado pela componente humanista, por isso quero agradecer:

Aos meus pais por todo o apoio emocional e logístico ao longo do meu processo de aprendizagem.

Á minha namorada por ter aturado as minhas distrações e falta de tempo para com ela.

Á minha orientadora e co-orientador pelos conhecimentos, prontidão e celeridade facultadas.

Aos meus colegas por tanto me ajudaram a manter a sanidade mental necessária para a conclusão deste trabalho.

A todos eles o meu mais profundo obrigado.

Prefácio

"A verdadeira sabedoria consiste em saber como aumentar o bem-estar do mundo."

Benjamin Franklin

Penso que podemos dividir a população em dois tipos: aqueles que vêm ao mundo para arranjar problemas e aqueles que vêm ao mundo para os resolver. Enquadro-me no segundo grupo. Um grupo que dispensa horas a fio em busca da sabedoria necessária para transformar este mundo num local melhor para viver. Pessoas que não procuram a fama mas que procuram a harmonia do conhecimento e do equilíbrio. Alunos humildes e laboriosos da vida que não querem possuir a verdade absoluta mas que desejam transmitir o pouco que sabem para poder multiplicar a sabedoria que gozam. Uma sabedoria correcta, aprofundada, capaz de responder aos desafios inerentes da sociedade e da realidade envolvente. A ânsia de ir mais longe exposta através das letras, das palavras, das frases num mundo onde as possibilidades de comunicação são infinitas mas o entendimento fica aquém do pretendido.

Bruno Morrão

Resumo

Desde sempre que a responsabilidade na contracepção e planeamento familiar tem recaído no elemento feminino do casal. No entanto, a partilha de responsabilidades no seio do casal é cada vez mais equitativa, e o homem desempenha nos dias de hoje um papel activo no controlo da natalidade. É deste modo de fundamental importância encontrar alternativas para os métodos contraceptivos masculinos existentes. Um estudo de 2005 revelou que cerca de 60 % dos homens na Alemanha, Espanha, Brasil e México desejam usar um novo método contraceptivo masculino e, um outro realizado na Inglaterra demonstrou que 80% dos homens colocam uma hipotética pílula masculina no topo das suas preferências no que concerne à contracepção. Nos últimos dez anos, têm surgido numerosos estudos de investigação na tentativa de compreender a fisiologia da espermatogénese, bem como alguns trabalhos epidemiológicos, cujo objectivo é encontrar métodos eficazes que permitam anular a formação do espermatozóide, e atingir a contracepção desejada de forma eficaz, reversível e segura. Com recurso a livros de texto de referência na área da biologia celular e da biologia e fisiologia da reprodução, assim como em artigos de revistas científicas da especialidade, a presente monografia sintetiza a informação existente sobre os últimos avanços no campo da contracepção masculina. Fornece uma base para a compreensão de todo o processo que leva a formação do espermatozóide e enfatiza as investigações mais promissoras ao nível dos locais de possível intervenção no processo. Nas espermatogónias a presença do factor neutrofílico derivado de uma linha da célula da glia é crucial na proliferação mitótica, e a sua descoberta ao nível do testículo humano vem trazer perspectivas interessantes para o desenvolvimento de um método que permita bloquear numa etapa muito precoce o processo de espermatogénese. No que toca às células de Sertoli as junções de oclusão são de particular interesse pois em conjunto formam a barreira hematotesticular, a zona que protege as células germinativas de qualquer agressão externa e interna. Os análogos da Lonidamina e o péptido de ocludina permitem quebrar essa barreira. Ao nível de actuação no epidímio a proteína eppin parece ser a mais promissora, dada a sua extrema importância na manutenção da fertilidade. No espermatozóide as possibilidades existentes vão de encontro às alterações estruturais do mesmo. A Planta *Ruta Graveolens* liofilizada e o Reversible Inhibition of Sperm Under Guidance permitem, respectivamente, alterar a mobilidade e desintegrar o espermatozóide. Na ejaculação, pode-se intervir ao nível da contractilidade do músculo liso das estruturas envolvidas no transporte e emissão do espermatozóide. A tansolusina afecta esse sistema levando a disfunções ejaculatórias. A nível hormonal existem estudos promissores com a combinação Dianogest com Decanoato de Testosterona, e a molécula (S)-N-(4-ciaano-3-trifluorometil-phenil)-3-(3-fluoro,4-clorofeenoxi)-2-hidroxi-2-metilpropanamida (que revelam eficácia, reversibilidade e poucos efeitos adversos) nos mamíferos. Comenta de igual forma os trabalhos epidemiológicos mais recentes na área da contracepção masculina.

São apresentados os trabalhos existentes que demonstram a aplicabilidade prática das combinações de etonogestrel com Undecanoato de Testosterona e testosterona com acetato de medroxiprogesterona, e a utilização isolada de 7 α -Methyl-19-Nortestosterona. Apesar de todos eles terem aspectos positivos e negativos, o estudo feito com a combinação de testosterona com acetato de medroxiprogesterona é o mais promissor pois revela reprodutibilidade (foi testada a capacidade de fertilização por parte do homem), eficácia (índice de falha entre 0-8%) e reversibilidade (contagens de espermatozóides acima dos 20 milhões/ml). No fim concluímos que apesar do avanço no conhecimento da espermatogénese e identificação de possíveis alvos de actuação para alcançar a contracepção masculina, muito mais há a fazer para atingir um método contraceptivo reversível, eficaz e seguro.

Palavras-chave

Contracepção masculina; testículo; espermatogénese; espermiogénese; espermatozóide; células germinativas; células de Sertoli; epídimo; hormonas.

Abstract

The concern with contraception and family planning has been over the years a responsibility of the feminine element of the couple. However, the sharing of responsibilities within a couple is actually more equitable, and men play nowadays an active role in birth control. Therefore, it is of fundamental importance to find out alternatives for the existing male contraceptive methods. A 2005 study found that approximately 60% of men in Germany, Spain, Brazil and Mexico want to use a new male contraceptive method. Another report conducted in England showed that 80% of men pose a hypothetical male pill on top of their preferences with regard to contraception. Over the past decade, there have been numerous research studies in an attempt to understand the physiology of spermatogenesis, as well as some epidemiological studies, whose aim to find effective methods that allow nullify the formation of sperm, and achieve the desired contraception effectively and reversibly. Using reference textbooks of biology and cellular biology and physiology of reproduction, as well as articles in scientific journals specialized in the area, this monograph summarizes the available information on the latest advances in male contraception. It provides the basis for the understanding of the process that leads to the formation of sperm, and emphasizes the most promising investigations envisaging the sites of possible intervention in order to achieve contraception. The glial cell line-derived neurotrophic factor is a crucial molecule in the mitotic proliferation of spermatogonia and its discovery in human testis has brought interesting perspectives for the development of a method allowing disruption of spermatogenesis at earlier steps. With regard to Sertoli cell, tight junctions are of particular interest because together they form the testis barrier, the structure that protects the germ cells of any external aggression and internal. Analogues of lonidamine and occludin peptide help to break this barrier. At the level of epididymis the eppin protein is the most promising, as it was shown its extreme importance maintaining fertility. The possibilities in the sperm will meet essential actions on structural changes. The lyophilized *Ruta Graveolens* and Reversible Inhibition of Sperm Under Guidance allows to change sperm mobility and cell structural integrity, respectively. Concerning ejaculation, interventions can be considered on smooth muscle contractility of structures involved in sperm transport and emission. . The tansolusin affect this system leading to ejaculatory dysfunction. Studies manipulating hormonal levels are promising and the combination of Dianogest with Testosterone Decanoate, and the molecule (S)-N-(4-cyano-3-trifluoromethyl-phenyl)-3-(3-fluoro, 4-chlorophenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-propanamide shows effectiveness, reversibility, and few adverse effects in mammals. Recent epidemiological studies in the field of male contraception also are commented. These studies demonstrate the practical applicability of the combinations of etonogestrel and testosterone with Testosterone Undecanoate, with medroxyprogesterone acetate, and the isolated use of 7 α -Methyl-19-Nortestosterone. Although they all have positive and negative aspects, the use of the testosterone and

medroxyprogesterone acetate combination is the most promising one since it shows reproducibility (we tested the ability of fertilization by the male), efficacy (failure rate between 0 -8%) and reversibility (sperm counts above 20 million / ml). In conclusion, despite the advances deepening our knowledge of spermatogenic process, and the identification of new possible intervention targets , much more has be done in order to achieve a reversible, safe and effective contraceptive method.

Keywords

Male contraception; testis; spermatogenesis; spermiogenesis; sperm; germ cells; Sertoli cells; epididymis; hormones.

Índice

1. Introdução	1
2. Metodologia de Pesquisa	3
3. Organização Histo-Funcional do Testículo	5
4. Da Espermatogénese à Ejaculação	
4.1 Fase Proliferativa ou Espermatogócita	9
4.2 Fase Meiótica	10
4.3 Espermiogénese	10
4.4 Maturação	11
4.5 Capacitação	12
4.6 Ejaculação	12
5. Controlo Hormonal da Espermatogénese	
5.1 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Células de Leydig	13
5.2 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Túbulo Seminífero	13
6. Locais de possível intervenção	
6.1 Nas espermatogónias	15
6.2 Nas células de Sertoli	15
6.3 Na espermiogénese	16
6.4 No epididimio	18
6.5 No espermatozóide	19
6.6 Na ejaculação	20
6.7 Nas hormonas	21
7. Da teoria à prática: estudos epidemiológicos	23
8. Conclusão e perspectivas futuras	25
9. Referencias Bibliográficas	27

Lista de Figuras

Figura 1	Organização Histo-Funcional do Testículo	5
Figura 2	Vias para a biossíntese de esteróides sexuais no testículo	6
Figura 3	Esquema do epitélio germinal do testículo demonstrando localização das junções de oclusão	8
Figura 4	Diagrama mostrando o desenvolvimento das células da linha germinativa com formação do espermatozóide	10
Figura 5	Diferenciação do espermatideo, da esquerda para a direita	11
Figura 6	Esquema representativo do eixo hipotálamo-hipofise-células de Leydig e do eixo hipotálamo-hipófise-túbulo seminífero	14
Figura 7	Imunolocalização das TSSK no esperma humano.	17
Figura 8	Imunolocalização das TSSK em esperma de rato.	17
Figura 9	Imagens 3 D de microscopia de força atômica mostrando a relação espermatozóide-RISUG	20
Figura 10	Secções histológicas representativas dos testículos de ratos coradas com hematoxilina e eosina	21
Figura 11	Concentrações de esperma testicular.	22

Lista de Acrónimos

DHT	5 α - dihidrotestosterona
DHEA	Desidroepiandrosterona
ABP	Proteína de Ligação aos Androgénios
GDNF	Factor Neutrófilico Derivado de uma Linha da Célula da Glia
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
TSSK	<i>Testis-Specific Kinase Substrate</i>
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
PSA	Antigénio Específico da Próstata
SGL	Semenogelina I
GnRH	Hormona Libertadora de Gonadotrofina
LH	Hormona Luteinizante
FSH	Hormona Estimuladora do Folículo
AF-2364	<i>1-(2,4-dichlorobenzyl)-indazole-3-carbohydrazide</i>
AF-2785	<i>1-(2,4-dichlorobenzyl)-indazole-3-acrylic acid</i>
AST	Aspartato Aminotransferase
ALT	Alanina Transaminase
FA	Fosfatase Alcalina
Δ FSH	FSH mutante
CID	Contraste por Interferência Diferencial
RGL	Planta <i>Ruta Graveolens</i>
RISUG	Reversible Inhibition of Sperm Under Guidance
EAM	Estireno Anidrido Maleico
DMSO	Dimetil Sulfóxido
MFA	Microscopia de Força Atómica
DT	Decanoato de Testosterona
HDL	Lipoproteínas de Elevada Densidade
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
SARM	Modulador Selectivo de Receptor de Androgénios
S23	(S)-N-(4-ciaano-3-trifluorometil-phenil)-3-(3-fluoro, 4-clorofeenoxi)-2-hidroxi-2-metil-propanamida
BE	Benzoato de Estradiol
UT	Undecanoato de Testosterona
GFR α -1	Receptor para GDNF
MENT	7 α -Methyl-19-Nortestosterona

1.Introdução

Vivemos numa época em que os papéis sociais e a sua distribuição por sexos se equiparam, bem como a partilha de responsabilidades no seio de um casal, sendo cada vez mais equitativa em todas as áreas [1]. O planeamento familiar não foge a esta regra principalmente no que concerne à contracepção. Estudos feitos em diversos países demonstram que os homens desempenham cada vez mais um papel activo no controlo da natalidade. Um em cada vinte casais em todo o mundo utiliza a vasectomia como meio de contracepção preferido, e cerca de 13 % utilizam o preservativo [2]. Estes números não são maiores, devido a dois problemas inerentes a cada um dos métodos: i) a vasectomia, na esmagadora maioria das vezes, é irreversível; ii) o preservativo possui uma reduzida taxa de eficácia na prevenção da gravidez [3]. Um estudo de 2005 revelou que cerca de 60 % dos homens na Alemanha, Espanha, Brasil e México desejam usar um novo método contraceptivo masculino [4] e, um outro realizado na Inglaterra demonstrou que 80% dos homens colocam uma hipotética pílula masculina no topo das suas preferências no que concerne à contracepção [5]. Com base nestes números e não só, são vários os argumentos favoráveis à produção de um novo método contraceptivo masculino que possa suplantar os obstáculos dos métodos existentes (irreversibilidade e reduzida taxa de eficácia) e satisfazer as necessidades dos casais para um planeamento familiar harmonioso.

Só nos últimos dez anos foram publicados mais de cem trabalhos na área da contracepção masculina. Desde a investigação sobre os mecanismos moleculares e celulares da espermatogénese, passando pelos trabalhos de experimentação animal, até aos estudos realizados em populações humanas, a investigação galopou numa busca incessante pelo anti-concepcional ideal. O objectivo da presente tese é rever e sistematizar a informação existente sobre esta temática, proporcionando um meio rápido e simples de aceder à mesma.

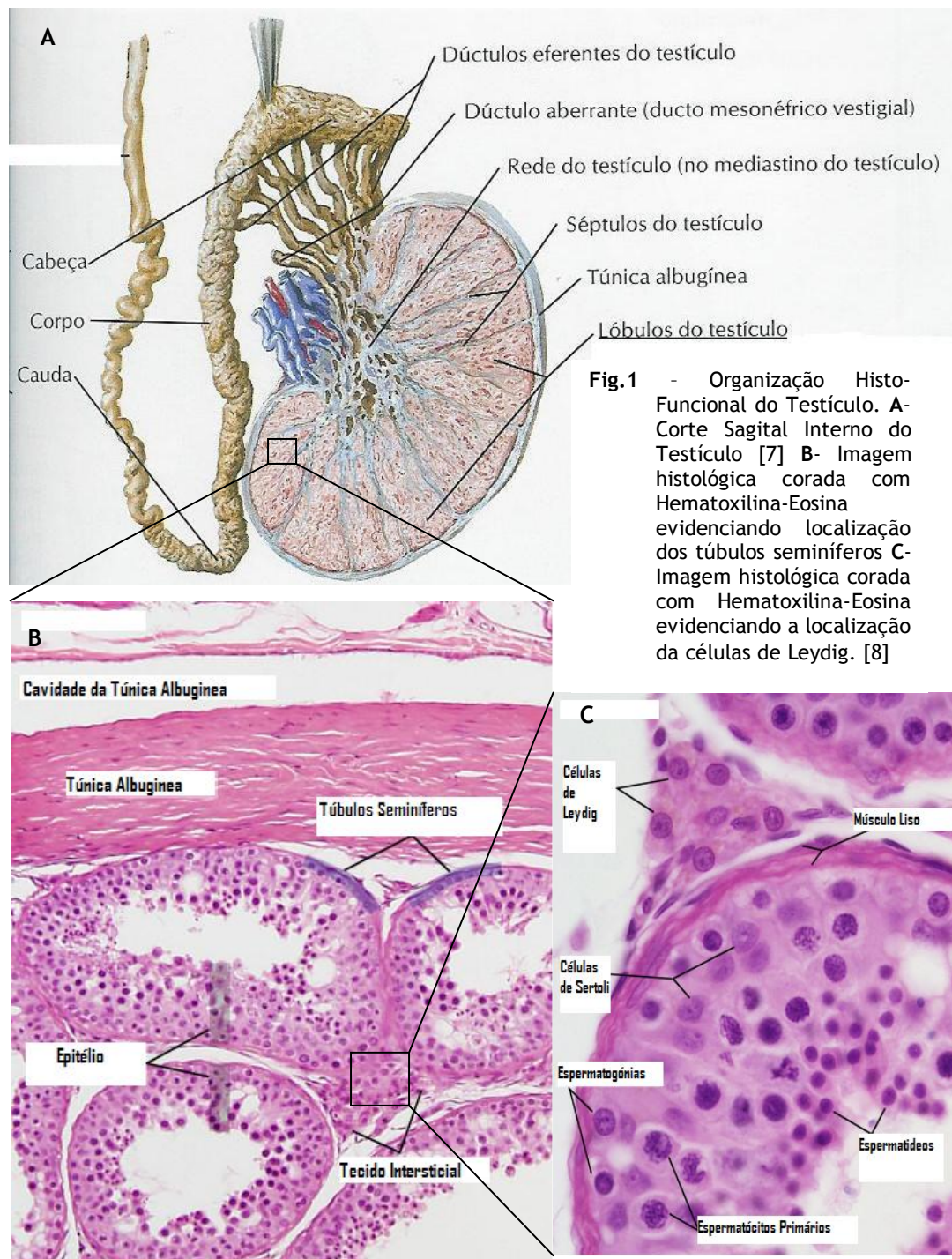
A primeira parte será pautada pela percepção da anatomia e histologia do testículo, assim como pela descrição da fisiologia da espermatogénese e do seu controlo hormonal. Esta informação foi organizada, de forma a proporcionar a qualquer estudante, os conhecimentos básicos para compreender a formação dos espermatozóides e a sua maturação funcional. A segunda parte dará a conhecer os trabalhos existentes que mostram possíveis locais de intervenção ao longo do processo de espermatogénese, permitindo que investigadores de diversas áreas científicas possam aquiescer aos últimos avanços ao nível da análise laboratorial. Por fim, e atendendo a uma visão mais pragmática o trabalho incidirá na investigação ao nível da população humana, possibilitando a clínicos noções e perspectivas de aplicabilidade de fármacos na sua prática quotidiana.

2. Metodologia de Pesquisa

A informação utilizada na elaboração da presente monografia foi obtida em livros de texto de referência na área da biologia celular e da biologia e fisiologia da reprodução, e em artigos de revistas científicas da especialidade. Para tal utilizou-se a base de dados científica de biomedicina, a Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>) usando como critérios de busca as seguintes palavras-chave, “male”, “contraception” e “spermatogenesis”, isoladamente e/ou nas diferentes combinações possíveis. A pesquisa foi efectuada maioritariamente de Agosto a Dezembro de 2010. Houve no entanto, alguma outra informação que foi recolhida pontualmente até Abril de 2011. Procedeu-se posteriormente à análise e selecção dos artigos mais relevantes incluindo ensaios clínicos, estudos prospectivos e de investigação, os quais foram agrupados por tema abordado reflectindo as diferentes formas de abordagem para actuação ao nível da contracepção masculina.

3. Organização histo-funcional do testículo

Os testículos (Fig.1A) desempenham duas funções importantes, a espermatogénese, ou seja a produção de gâmetas masculinos (espermatozóides), e a esteróidogenese, produção de hormonas esteróides sexuais. Esta dupla função é mantida por dois componentes estruturalmente distintos: as células de Leydig e os túbulos seminíferos (Fig.1B e 1C) [6].



As células de Leydig, ou células intersticiais, constituem a principal componente endócrina do testículo e localizam-se no espaço intersticial dos testículos [9]. Ocasionalmente, podem identificar-se no interior da túnica albuginea e inclusive no cordão espermático. Com um diâmetro de 15-20 μm podem aparecer como uma célula isolada ou em pequenas aglomerações proporcionando um aspecto de um complexo epitelial [10]. São responsáveis pela produção dos esteróides gonadais a saber: 5 α -dihidrotestosterona (DHT), desidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona, estradiol, estrona, pregnenolona, progesterona, 17 α -hidroxipregnenolona e 17 α -hidoxiprogesterona. Na figura 2 mostra-se a complexa cadeia de reacções enzimáticas envolvidas na biossíntese de esteróides sexuais [6].

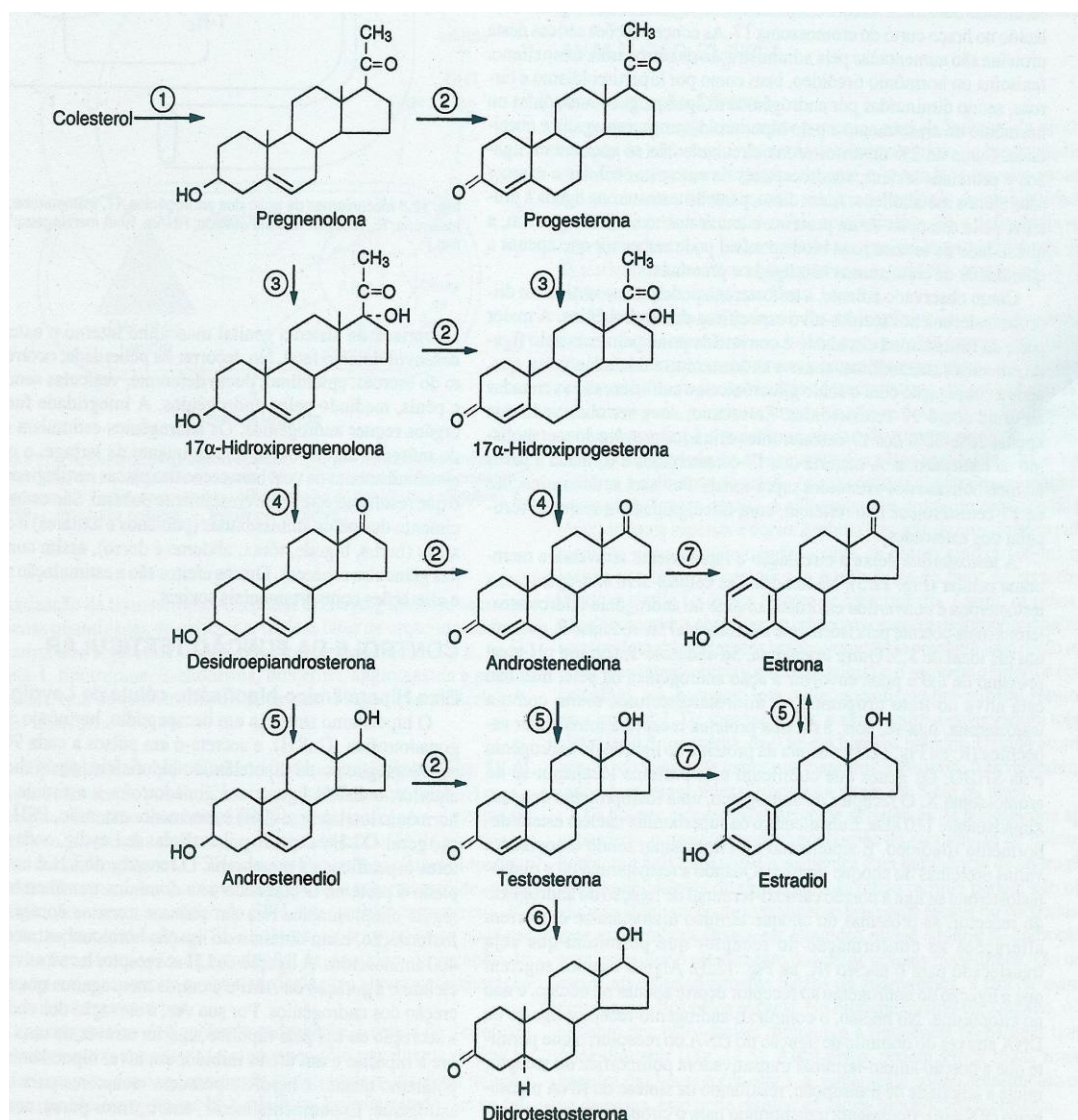


Fig.2 - Vias para a biossíntese de esteróides sexuais no testículo. As setas grandes indicam as vias principais. Os números dentro dos círculos representam as enzimas envolvidas: ①20,22-desmolase (P-450cc); ② 3 β -hidroesteróide desidrogenase e Δ^5 , Δ^4 - isomerase; ③17-hidroxilase (P-450c17); ④ 17,20-desmolase (P-450c17); ⑤17-cetorreductase; ⑥ 5 α reductase; ⑦ aromatase [6].

Os túbulos seminíferos constituem o volume dos testículos e são responsáveis pela produção de aproximadamente 30 milhões de espermatozóides por dia durante a vida reprodutiva masculina [9]. A parede dos túbulos é constituída por várias camadas de células alongadas com as mesmas características imunohistoquímicas de células de músculo liso e fibroblastos [11]. Em conjunto são denominadas células peritubulares do testículo humano [12]. No interior, os túbulos seminíferos são compostos por células de Sertoli, células estaminais, espermatogónias e pelos restantes tipos de células da linha germinativa (Fig. 1C). As células de Sertoli (Fig.1C) revestem a membrana basal e encontram-se firmemente acopladas entre si, devido à presença de junções de oclusão entre células adjacentes (Fig. 3) [6]. Estas junções são constituídas por uma rede de fibrilas intermembranas [9] e diversas proteínas como é o caso da ocludina [13]. Esta proteína integral é constituída por quatro domínios transmembranares, dois domínios citoplasmáticos, duas sequências de aminoácidos extracelulares e uma sequência intra-celular [14], sendo fundamental na manutenção da integridade da junção de oclusão [15].

As junções de oclusão impedem a passagem de proteínas do espaço intersticial para o lúmen dos túbulos seminíferos, estabelecendo assim a barreira hematotesticular. Esta barreira é crucial pois permite a separação física entre as novas células formadas e as células apresentadoras de antigénios, conferindo assim protecção imune relativa a antigénios endógenos [16]. Através da extensão dos processos citoplasmáticos, as células de Sertoli circundam as espermatogónias em desenvolvimento e proporcionam um ambiente essencial e primordial à diferenciação das mesmas [6]. As células de Sertoli são de importância crucial no desenvolvimento de um espermatozóide funcional. São responsáveis pela produção de diversos constituintes do fluido luminal que circunda as diferentes células da linha germinativa e permitem o normal processo de espermatogénese [17]. Intervêm na endocitose e degradação dos corpos residuais, e das células apoptóticas da linha germinativa [18]. Além disso, são responsáveis pelo movimento das espermatogónias da base do túbulo para o lúmen e pela libertação de espermatozóides maduros. [6] Em ratos o movimento das espermatogónias provoca desarranjos e posteriores rearranjos das junções de oclusão da barreira hematotesticular acima referidos [19]. As células de Sertoli são igualmente responsáveis pela secreção de diversas substâncias. Entre elas a mais importante, no que concerne à espermatogénese, é a proteína de ligação aos androgénios (ABP, Androgen Biding Protein) cuja função será explicada mais a frente [6].

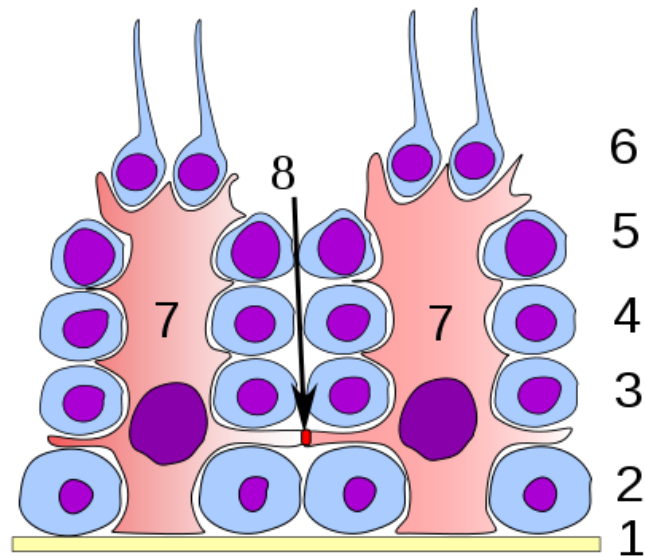


Fig. 3 - Esquema do epitélio germinal do testículo demonstrando localização das junções de oclusão. 1. Lâmina Basal 2. Espermatogônia 3. Espermatócito de 1ª ordem 4. Espermatócito de 2ª ordem 5. Espermatídeo 6. Espermatídeo maduro 7. Célula de Sertoli 8. Junção de oclusão [20].

4. Da Espermatogénese à Ejaculação

Desde a formação das células da linha germinativa até a saída do espermatozóide do organismo ocorrem cinco fases de transformação, que após produzirem um espermatozóide maduro funcional, irão permitir a fecundação e a geração de um novo ser vivo. As primeiras três ocorrem nos túbulos seminíferos dependendo da actividade das células de Sertoli, e as restantes ao longo das vias espermáticas e no tracto genital feminino.

4.1 Fase Proliferativa ou Espermatogócita

O espermatozóide origina-se através de um conjunto de células primordiais denominadas espermatogónias [21]. As espermatogónias estão localizadas ao longo da membrana basal dos túbulos seminíferos [22]. No homem é possível distinguir três tipos de espermatogónias: tipo A escuro, tipo A claro e tipo B, sendo o tipo A escuro considerada a progenitora. Estas células apresentam-se aos pares e através de divisões mitóticas dividem-se em espermatogónias tipo A escuro e espermatogónias tipo A claro. Estas últimas darão origem através da mitose a espermatogónias tipo B. Cada espermatogónia tipo B através de mais uma mitose e diferenciação celular forma dois espermatócitos primários [9]. (Fig.4) O processo de mitose em ratos é controlado pelo Factor Neutrófilico derivado de uma linha de Células da Glia (GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor) que é produzido pelas células de Sertoli [23]. Este factor é uma pequena proteína que promove a sobrevivência de vários tipos de neurónios e que desempenha um papel importante na regulação da divisão e diferenciação das espermatogónias [24]. Actua através da activação de um receptor multicomponente na membrana da espermatogónia composto por um co-receptor GFR α -1 e por uma âncora GPI que após a activação levam ao recrutamento de receptores transmembranares RET produzindo um sinal complexo. A activação posterior destes receptores induz a autofosforilação de tirosinas e a produção de um sinal intracelular que desencadeia a proliferação das espermatogónias através de mitoses sucessivas [23].

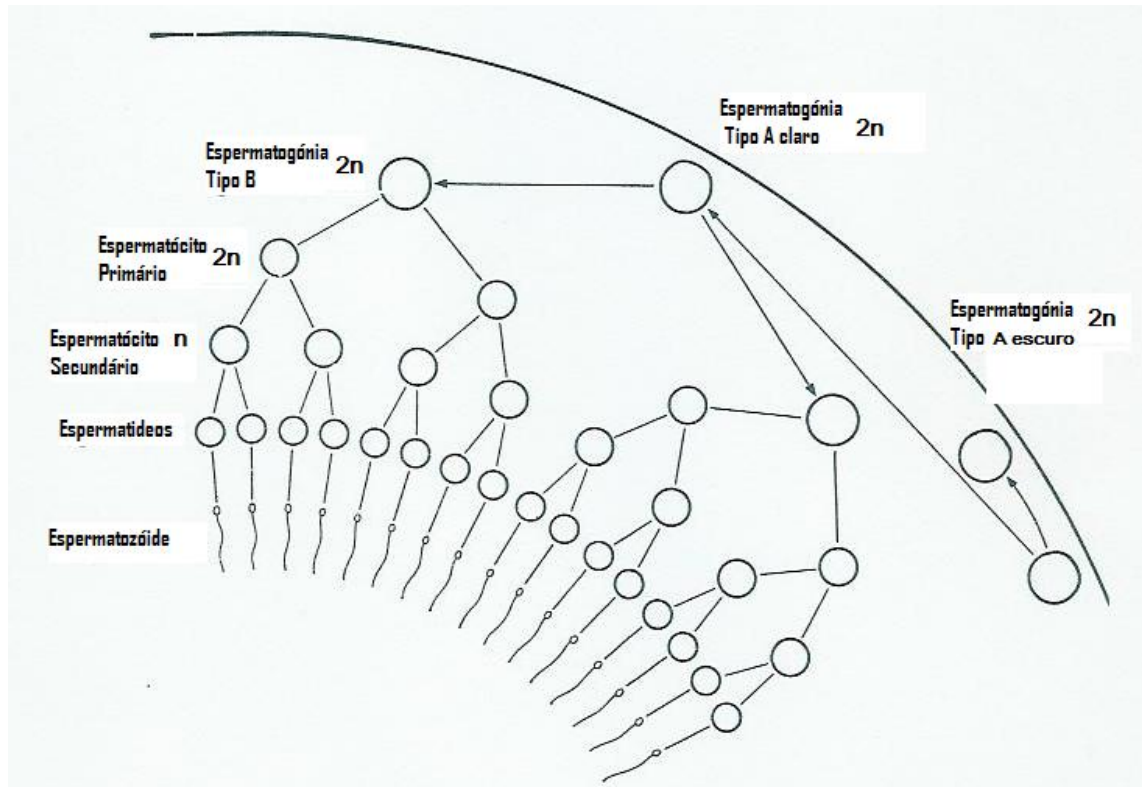


Fig.4 - Diagrama mostrando o desenvolvimento das células da linha germinativa com formação do espermatozóide [9].

4.2 Fase Meiótica

Após a formação do espermatócito primário diplóide, este divide-se através de uma primeira divisão meiótica dando origem a um espermatócito secundário [9]. Este por sua vez sofrerá nova meiose e forma o espermatídeo haplóide [21], [22] e [25].

4.3 Espermiogénese

Nesta terceira fase irão ocorrer as alterações que permitem a formação do espermatozóide (Fig.5). Ocorrem várias modificações intra-celulares de modo a que, o espermatídeo redondo originado do espermatócito secundário, se diferencie num espermatídeo alongado e posteriormente num espermatozóide imaturo [22]. O complexo de Golgi composto por um complexo de vesículas vai coalescer para formar uma única vesícula acrossomal anterior à célula. Os microtúbulos desenvolvem-se num arranjo cónico perinuclear denominando manchete. Os centríolos em número de dois separam-se. Um mantém-se sem alterações enquanto o outro se transforma no corpo basal do espermatozóide. As fibrilhas axiais desenvolvem-se a partir do corpo basal estendendo-se caudalmente no interior do citoplasma da célula tornando-se mais alongadas. Apenas a parte proximal fica rodeada por citoplasma para dar origem à parte média do espermatozóide. Nesta zona as mitocôndrias dos espermatídeos rearranjam-se para formar uma bainha helicoidal [9]. A cromatina condensa-se [22] e na parte final da espermiogénese algum do citoplasma é separado como um corpo residual [9]. (Fig.5)

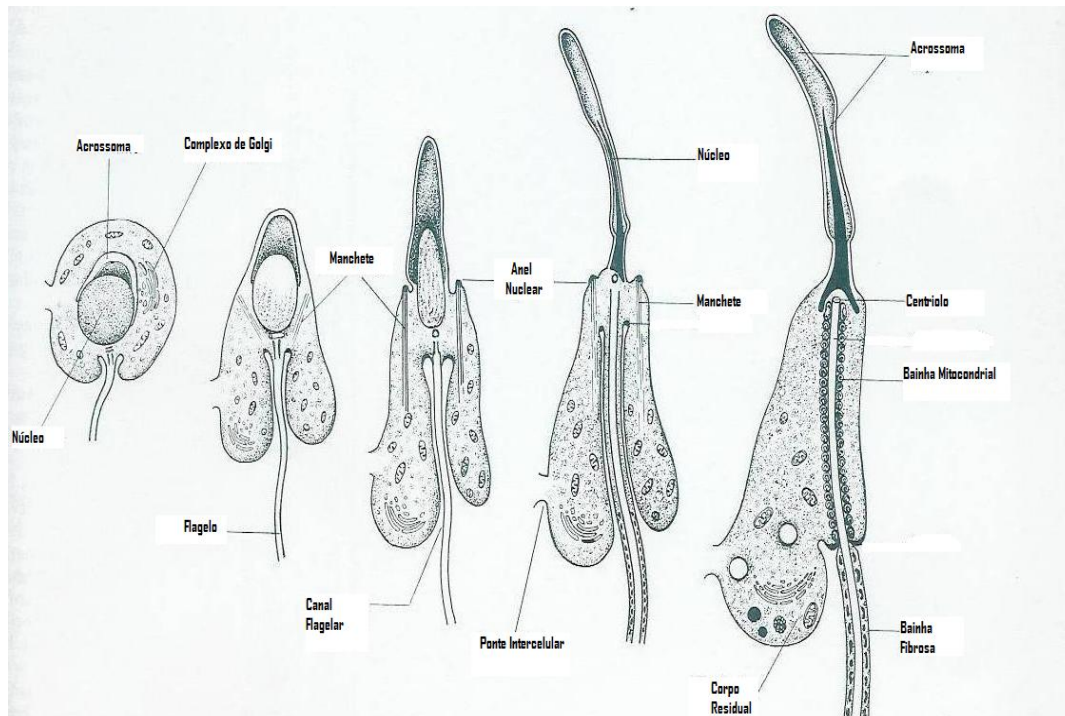


Fig.5- Diferenciação do espermátide, da esquerda para a direita. [9]

No fim teremos um espermatozóide imaturo pronto a ser secretado para uma rede anastomósica altamente convoluta de ductos denominada rede testicular (Fig.1A). Até ao momento da secreção os espermatozóides estão firmemente fixos às células de Sertoli. O processo pelo qual estes se libertam denomina-se espermição. Os espermatozóides são de seguida transportados através dos ductos eferentes para o epidídimo por pressão do líquido testicular, movimento ciliar e contracção dos ductos eferentes (Fig. 1C) [6].

Em ratos a espermiogénese é regulada tanto por alterações na tradução como na transcrição génica [26,27 e 28]. O controlo ao nível destes dois processos é efectuado através de um conjunto de proteínas envolvidas no metabolismo dos RNA mensageiros (mRNA) e na regulação de vias envolvendo pequenos RNAs denominado de corpo cromatideo [25]. No interior desse corpo foram identificadas um conjunto de serino-proteases denominadas TSSK (testis-specific kinase substrate) que são essenciais para a normal citodiferenciação dos espermátides. [29]

4.4 Maturação

Os espermatozóides imaturos não têm a capacidade de movimento, ou seja, são libertados numa forma inerte e ainda sem qualquer capacidade de proceder à fertilização do óvulo. Ao longo do percurso através do epidídimo vão sendo incorporadas várias proteínas que permitem adquirir essa capacidade, processo ao qual se denomina de maturação [30]. De entre elas encontramos vários tipos de proteases como a procatepsina L, enzima conversora

de angiotensina (ECA) e serino-proteases [31]. Concomitantemente com a expressão destas ocorre a expressão dos seus inibidores: α 2-macroglobulina, cistaina c e eppin. [32,33].

Durante a ejaculação os espermatozoides recebem líquido das vesículas seminais e da próstata. Do primeiro serão incorporados vários componentes tais como frutose, fosforilcolina, ergotioneina, ácido ascórbico, flavinas e prostanglandinas [6]. Na uretra irão ser incorporados os constituintes do líquido proveniente da próstata como a espermina, ácido cítrico, colesterol, fosfolípidios, fibrinolizina, fibrinogénio, zinco, fosfatase ácida e antigénio-específico da próstata (PSA) [34]. A interação dos constituintes de ambas as fases (pré e pós ejaculatórias) permite a formação de um coágulo que mantém o espermatozóide num estado imóvel até ao momento de entrada no tracto genital feminino [35].

Neste percurso também se dão alterações estruturais no espermatozóide. Partículas de citoplasma movem-se da base da cabeça do espermatozóide para a parte média do flagelo [34] e ocorrem alterações no tamanho, forma e estrutura interna do acrossoma [36].

4.5 Capacitação

Esta etapa final é caracterizada por um conjunto de alterações estruturais e funcionais no espermatozóide imaturo que permitem a fertilização do oócito [31]. Estas alterações ocorrem no tracto genital feminino e compreendem dois fenómenos essenciais. Por um lado a remoção dos factores de estabilização adquiridos pelo espermatozóide no tracto genital masculino [37] permitindo a liquefação do coágulo [35], e, por outro a aquisição da capacidade por parte do mesmo para se ligar aos receptores da zona pelúcida [37].

Muito dos factores de estabilização correspondem a proteínas presentes no coágulo como é o caso da Semenogelina I (SG I) [38]. Ainda na fase de maturação esta proteína liga-se a um inibidor de proteases proveniente do epidídimo, o Eppin, formando um complexo que confere protecção microbiana ao espermatozóide [39] e que permite a clivagem da SG I pelo PSA [40].

4.6 Ejaculação

Para existir ejaculação é necessário que o espermatozóide saia do sistema reprodutor masculino para o sistema reprodutor feminino. Este processo de emissão de sémen denomina-se de ejaculação. Quando o homem atinge certo ponto de estimulação e sobre o controlo do sistema nervoso simpático [41], o espermatozóide é libertado através da contracção rítmica dos músculos lisos do perineo e dos órgãos sexuais acessórios como é o caso das vesículas seminais e próstata [42]. Todo o processo que leva à ejaculação é mediado pelo sistema nervoso simpático através de receptores α -1 adrenérgico [43].

5. Controlo Hormonal da Espermatogénese

O controlo hormonal da espermatogénese é um processo complexo que envolve várias glândulas endócrinas, ambientes e órgãos, e que culmina na regulação da função reprodutiva masculina. Apresentam-se de seguida os dois principais eixos hormonais que controlam a formação do espermatozóide.

5.1 Eixo hipotálamo-hipofise-células de Leydig

O Hipotálamo sintetiza um decapeptido, a hormona libertadora da gonadotrofina (GnRH), e secreta-o para o sangue portal hipotalâmico-hipofisário em pulsos a cada 90-120 minutos. Após chegada à hipófise anterior, a GnRH estimula a libertação pelos gonadotrofos para a circulação geral, de hormona luteinizante (LH) e, em menor extensão, de hormona estimuladora do folículo (FSH) [6]. A LH liga-se a receptores específicos da membrana nas células de Leydig, os quais levam à activação da adenil ciclase e à geração de AMPc e outros mensageiros, o que resulta na estimulação da secreção de esteróides sexuais [9]. Os três esteróides de importância primária na função reprodutiva são a testosterona, DHT e o estradiol. Do ponto de vista quantitativo o androgénio mais importante é a testosterona sendo mais de 95% secretado pelas células de Leydig [6]. A testosterona é necessária para a inibição do processo de apoptose nas células germinativas [44] e para completar a fase meiótica no processo da espermatogénese [45].

A elevação dos androgénios inibe a secreção de LH pela hipófise anterior através de uma acção directa sobre a hipófise e um efeito inibidor a nível hipotalâmico (Fig. 5) [6]. Tanto o hipotálamo como a hipófise possuem receptores de androgénios e estrogénios. Experimentalmente os androgénios puros como a DHT reduzem a frequência pulsátil da LH enquanto o estradiol reduz a amplitude pulsátil. [46]

5.2 Eixo hipotálamo-hipofise-túbulo seminífero

Após estimulação pela GnRH, os gonadotrofos secretam FSH para a circulação sistémica. Esta hormona de natureza glicoproteica liga-se a receptores específicos nas células de Sertoli e estimula a produção de dois factores: a ABP, que permite a manutenção de uma elevada concentração intratubular de testosterona [6]; e a glicoproteína dimérica inibina que, como o próprio nome indica funciona como um inibidor selectivo da secreção de FSH pela hipófise (Fig. 6) [47]. Esta última desempenha um papel importante no processo de espermatogénese humano pois a sua produção é exclusiva das células de Sertoli [48]. Níveis reduzidos desta hormona predizem um mau funcionamento das respectivas células produtoras em homens inférteis [49].

Estudos realizados em ratinhos demonstram que a FSH desempenha um papel crucial na espermatogénese através da manutenção do tamanho normal do testículo [50], no controlo da secreção de fluido tubular através das células de Sertoli e na manutenção da população de espermatogónias [51].

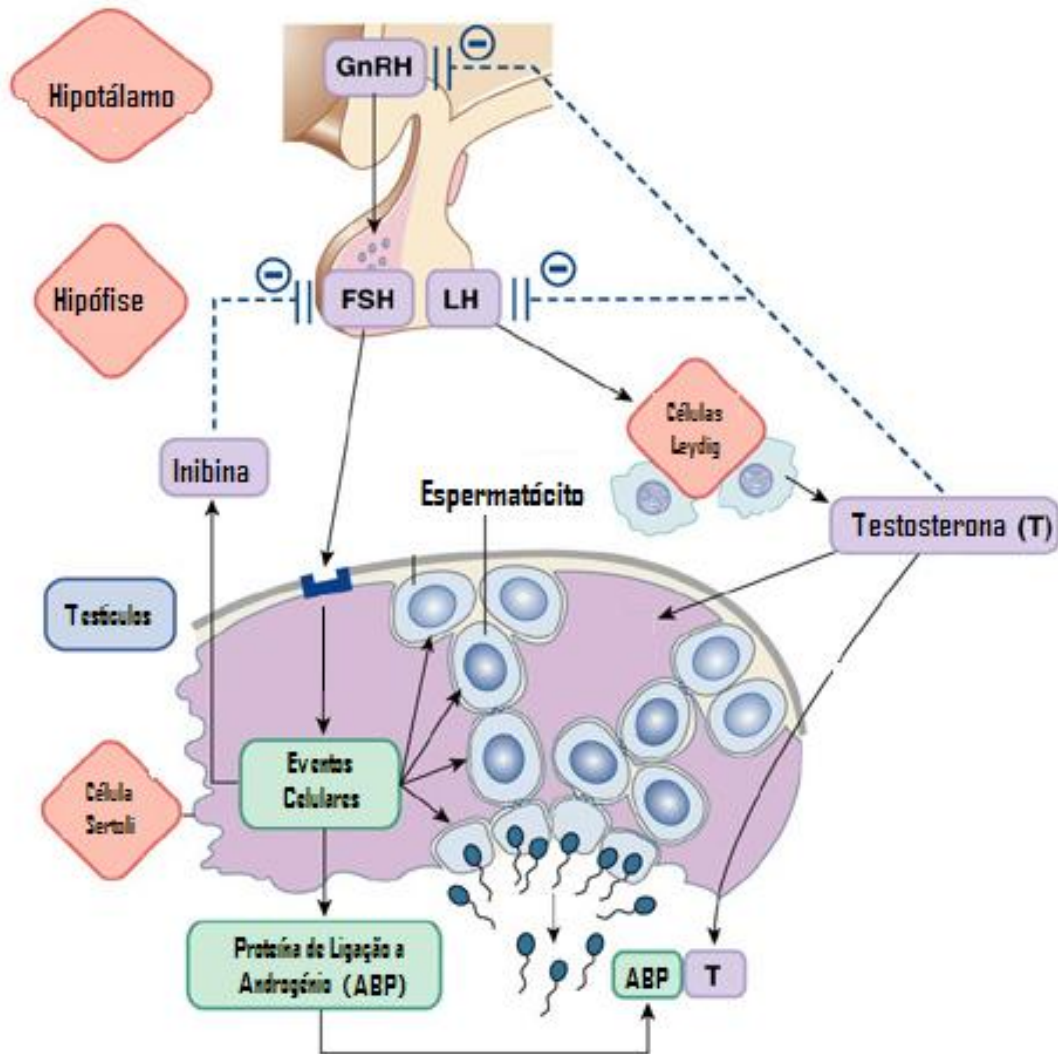


Fig.6 - Esquema representativo do eixo Hipotálamo-hipofise-células de Leydig e do Eixo Hipotálamo-hipofise-túbulo seminífero [52]

6. Locais de possível intervenção

6.1 Nas Espermatogónias

Em 2005 um grupo de investigadores concluiu que GDNF (Factor Neurofílico Derivado de uma Linha da Célula da Glia) desempenha um papel primordial no processo de regeneração das espermatogónias e conseqüentemente das restantes células da linha germinativa. Utilizando uma técnica de recombinação homóloga em células estaminais embrionárias com deleção de exões geraram ratinhos *knock out* para o GDNF e GFR α -1 (receptor para GDNF). Para evitar a letalidade neonatal associada à ausência destas moléculas efectuaram o transplante de todo o testículo dos ratinhos *knock out* para animais castrados de idade mais avançada. Ao fim de 8 semanas, e através de análises imunohistoquímicas, verificaram a completa ausência de células da linha germinativa (espermatogónias, espermatócitos, espermatídeos e espermatozóides) nos testículos dos ratinhos transplantados [53]. Após esta descoberta promissora, o passo lógico seguinte seria comprovar a presença do GDNF no testículo humano. Um estudo realizado em 2010 demonstrou não só a presença do GDNF nos testículos como comprovou também a sua produção constitutiva pelas células peritubulares. Através da análise imunohistoquímica de amostras provenientes de biópsias de testículos humanos verificaram a presença de receptores GFR α -1 nas espermatogónias assim como a presença de GDNF no meio de cultura de células peritubulares [54].

6.2 Nas células de Sertoli

Desde 1986 que se sabe existirem produtos químicos que causam o rompimento das junções de oclusão entre células de Sertoli e células germinativas, e, que levam à cessação do processo de espermatogénese e conseqüentemente à secreção prematura de células germinativas [55]. Em teoria estas células devido à sua imaturidade serão incapazes de fertilizar o óvulo. A Lonidamina (1- [2,4-diclorobenzil]-indazole-3-ácido carboxílico, um derivado do 1H-indazole) é um fármaco anti-neoplásico [56] que quando administrado a ratos [110], causa vacuolação e retracção na membrana citoplasmática apical da célula de Sertoli levando à secreção de espermatídeos imaturos. Um estudo mais recente com análogos da Lonidamina - 1-(2,4-diclorobenzil)-indazole-3-carbohidrazida (AF-2364) e 1-(2,4-diclorobenzil)-indazole-3-ácido acrílico (AF-2785) - demonstrou que ao fim de 14 dias de administração de uma dose única via oral (50 mg/kg de peso total) de cada um destes compostos, ocorria a depleção de espermatídeos alongados e do número de espermatócitos no tecido testicular. Para além disso, verificou que os níveis das hormonas do eixo hipotálamo-hipófise (FSH, LH e Testosterona) não sofreram alterações assim como os

parâmetros de Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Transaminase (ALT), Fosfatase Alcalina (FA), ureia, creatinina, albumina, γ -globulina, sódio e potássio [57]. Apesar de ser um grande avanço prospectivo na área da contracepção continuam a faltar estudos que demonstrem dois aspectos. Primeiro, que os arranjos e rearranjos da barreira hemato testicular também ocorrem no ser humano. Segundo, que os análogos da Lonidamina provocam semelhantes efeitos nos seres humanos.

Para além dos produtos químicos, existem compostos biológicos que também possuem a capacidade de romper a barreira hematotesticular como é o caso do péptido da ocludina. Este péptido sintético é análogo à segunda sequência extra-celular da proteína ocludina presente na junção de oclusão [58], a qual foi investigada de uma forma mais pormenorizada em 2007. Nessa investigação foi administrado a ratos por injeção intraperitoneal o péptido de ocludina conjugado com a molécula de FSH mutante (Δ FSH). Através da análise por imunofluorescência verificaram, ao fim de 3 semanas e para doses de 40 μ g, uma redução na expressão de proteínas das junções de oclusão. Para além disso, demonstraram que com uma dose maior (150 μ g) e no mesmo período de tempo, nenhum espermatideo alongado era identificado no epitélio dos túbulos seminíferos [59]. Resultados interessantes mas que carecem de reprodutibilidade. Apesar de se ter demonstrado a quebra das ligações proteicas das zonas de oclusão, nada se pode prever relativamente a infertilidade dos elementos da população testados, já que não sujeitaram os ratos, por exemplo, a um processo de acasalamento com as respectivas fêmeas. Outro aspecto a salientar prende-se com os potenciais efeitos adversos que este conjugado poderá exercer em outros órgãos como por exemplo o fígado ou os rins, essenciais na depuração de substâncias exógenas, cuja função não foi testada. Uma ilação muito interessante a retirar deste estudo prende-se com a constatação que o conjugado é capaz de quebrar a barreira hematotesticular, e que em conjugação com outra substância, poderá atingir as células germinais e travar o processo de espermatogénese. No entanto desconhece-se qualquer substância que seja capaz de o fazer.

6.3 Na espermiogénese

O interesse pelas TSSK (serino proteases constituintes do corpo cromatideo e essenciais na citodiferenciação dos espermatideos) na contracepção masculina foi recentemente evidenciado, quando pela primeira vez um estudo demonstrou o paralelismo entre a localização destas proteínas no espermatozóide de ratinhos e do homem. Através de análise por imunofluorescência identificou-se um grupo de tirosino-kinases (TSSK1, TSSK2 e TSSK6) utilizando anticorpos contra TSSK. Concluiu-se que em ambas as espécies a TSSK1 é expressa na cabeça e no flagelo do espermatozóide, a TSSK2 é expressa num local específico da cabeça e a TSSK6 é expressa apenas na peça média (Fig.7) e (Fig.8) [21].

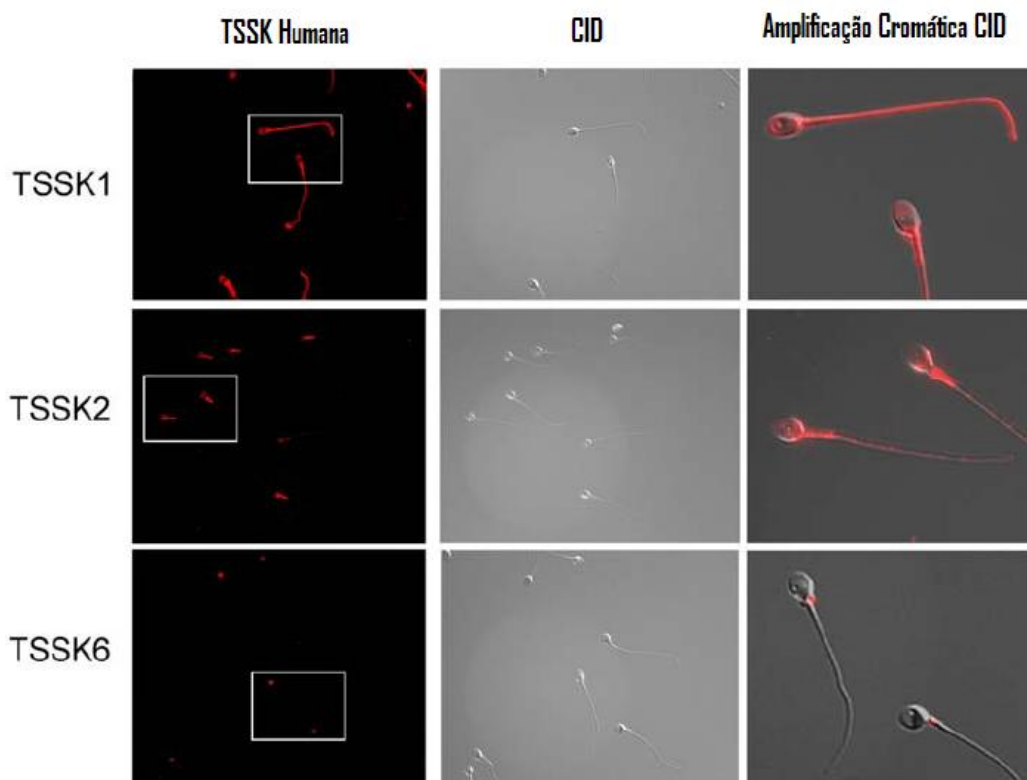


Fig. 7 - Imunolocalização das TSSK no esperma humano. Imagens microscópicas através de Contraste por Interferência Diferencial (CID) [21].

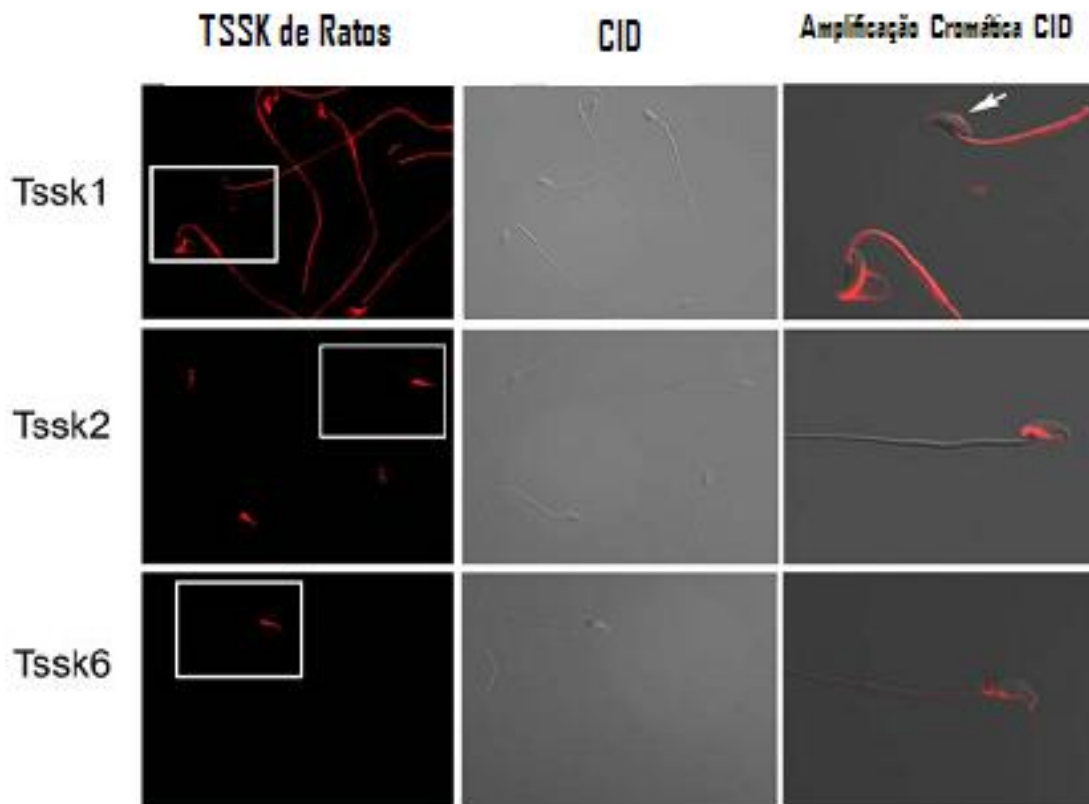


Fig. 8 - Imunolocalização das TSSK em esperma de rato. Imagens microscópicas através de Contraste por Interferência Diferencial (CID) [21].

Esta investigação, assume particular interesse, quando num estudo experimental em ratos, se verificou que uma completa ausência de TSSK1, TSSK2 e TSSK6, conduzia a um processo de infertilidade total [29].

Fazendo uma analogia entre a localização das proteínas em ambas as espécies poderemos prever que a utilização de agentes que permitam anular a função destas poderia levar a um método de contracepção eficaz no homem. No entanto, muitas dúvidas se mantêm: i) seria preciso avaliar a função das proteínas no processo de espermatogénese no homem; ii) seria necessário perceber, se as TSSK apenas são transcritas somente no sistema reprodutor masculino ou estarão presentes noutros sistemas. Mais investigação nesta área é requerida.

6.4 No epidídimo

A proteína inibidora de proteases presente no epidídimo e denominada Eppin, ganhou relevância em 2004 como possível alvo de contracepção. Um grupo de investigadores imunizou uma população de nove macacos comprovadamente férteis (*M. Radiata*) com proteína Eppin recombinante de origem humana. A resposta imune do organismo foi testada através da medição dos títulos de anticorpos no sangue a partir do dia 126 pós-imunização até que os níveis de titulação fossem superiores a 1:1000. A partir desse nível de titulação todos os macacos machos acasalaram com a respectiva fêmea em três ciclos ovulatórios diferentes. Nenhum dos macacos foi capaz de fecundar qualquer das fêmeas. No grupo controlo cerca de 67% (4 em 6) procedeu a fertilização. Este estudo demonstrou uma eficácia de 78% (2 macacos foram retirados do estudo devido a titulações de anticorpos inferiores a 1:400) na contracepção numa pequena população de macacos. Para além disso, demonstrou que o processo é reversível pois cerca de 71% da população recuperou a fertilidade após 451 dias de paragem na administração de eppin recombinante [60]. Por fim, demonstrou a manutenção dos níveis de testosterona e do número de espermatozóides no grupo imunizado. É provavelmente o estudo mais arrojado no que consta ao processo de imunocontracepção, pois pela primeira vez a população em estudo é composta por uma espécie bastante próxima do homem a nível filogenético, e porque obteve uma eficácia a nível de contracepção muito elevada. Apesar destes resultados promissores, existem muitos aspectos negativos a considerar. Começando pela escolha do tamanho da amostra, verifica-se que é extremamente pequeno, pois nove elementos não constituem um grupo fiável que permita, com segurança, generalizar os resultados. Não foi explicado por exemplo a forma, frequência e dose de administração da proteína Eppin recombinante. Não foram esclarecedores quanto à razão de escolha de determinado nível de titulação de anticorpos tanto para exclusão do estudo (<1:400) como para início do acasalamento (>1:1000). Fica a dúvida, se os efeitos colaterais e indesejáveis não foram mencionados por não existirem, ou por não terem sido alvo de estudo.

Por outro lado, também não ficou demonstrado qual é o mecanismo de acção fisiológico na aquisição da infertilidade.

6.5 No espermatozóide

Para ocorrer a fertilização é necessário que o espermatozóide se movimente ao longo do tracto feminino. Se inibirmos esta capacidade poderemos em teoria promover a contracepção. Em 2007 um grupo de investigadores debruçou-se sobre os efeitos contraceptivos da planta *Ruta Graveolens* L (RGL) nos espermatozoides. Concluíram que com doses de 100mg/ml, do extracto aquoso de RGL liofilizada, aplicadas directamente no sémen levaram a imobilização completa dos mesmos. Mais curioso, será constatar que a membrana plasmática se manteve íntegra e, não houve desnaturação da cromatina do núcleo e as mitocôndrias mantiveram-se funcionais. Verificou-se também a reversibilidade do processo [61]. Apesar dos resultados do estudo serem promissores muitas dúvidas prevalecem até poder utilizar este extracto como contraceptivo. É preciso descobrir o mecanismo de acção fisiológico deste liofilizado e as possibilidades de aplicar o mesmo *in vivo*.

Para além das alterações que podemos efectuar ao nível da funcionalidade também poderemos actuar ao nível da estrutura do espermatozóide. O RISUG (um acrónimo para Reversible Inhibition of Sperm Under Guidance) é um copolímero de estireno anidrido maleico (EAM) dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO) que foi estudado em 2006, através de Microscopia de Força Atómica (MFA), descobrindo-se que a sua acção leva à desintegração do sistema membranar do espermatozóide (Fig. 9) [62]. Mais uma vez prevalece o problema do estudo ser executado *in vitro* sem nada se poder afirmar relativamente à aplicação *in vivo*.

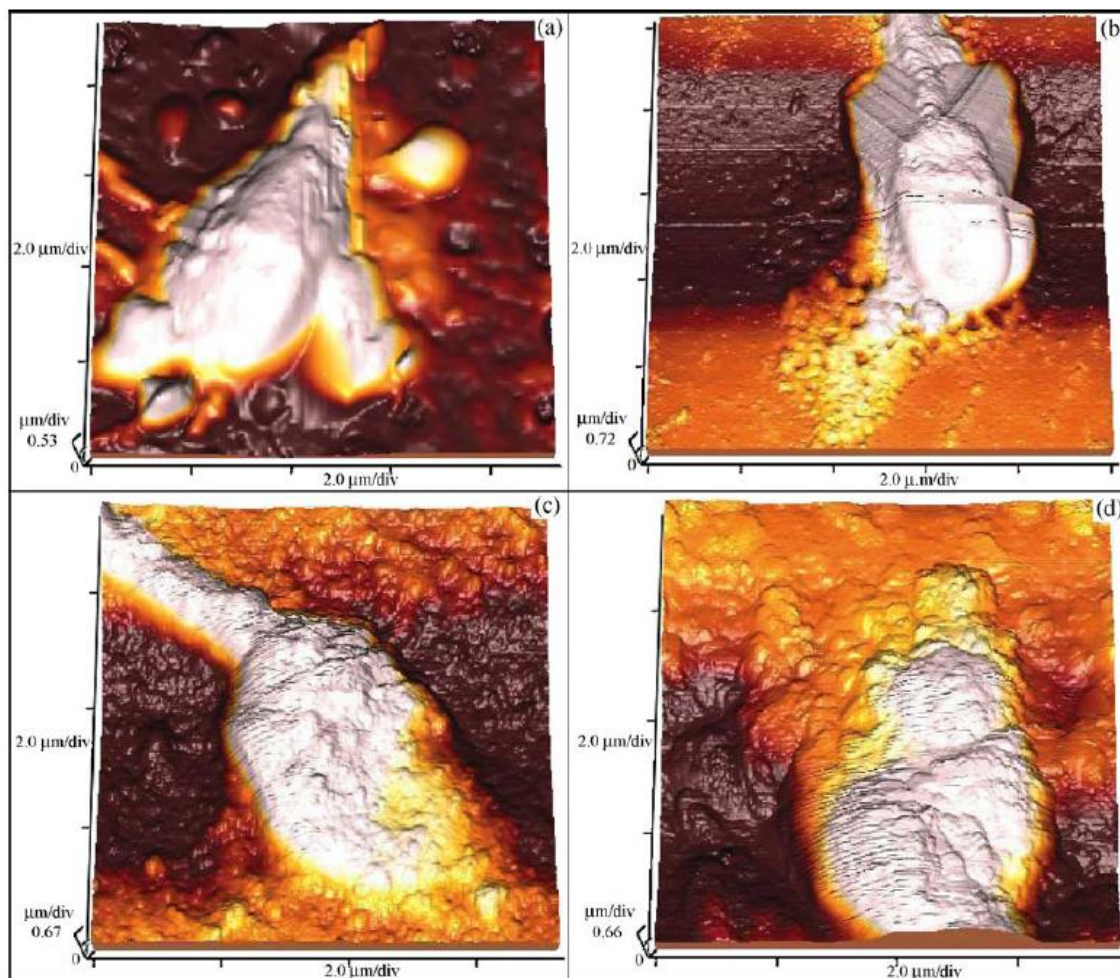


Fig. 9 - Imagens 3 D de microscopia de força atômica mostrando a relação espermatozóide-RISUG a) Blebbing da membrana do acrossoma. b e d) Rutura e liberação das enzimas do acrossoma após 25 minutos de tratamento d) Degradação de toda a cabeça [62].

6.6 Na ejaculação

Na teoria qualquer interferência ao nível da contractilidade do músculo liso dos órgãos sexuais acessórios e vias espermáticas levará ao bloqueio da saída dos espermatozoides do tracto reprodutor masculino evitando a fertilização. Atendendo que o receptor α -1 adrenérgico é o principal mediador neste processo, prevê-se que qualquer substância que bloqueie especificamente este receptor no tracto genital masculino, possa surtir efeito como método contraceptivo. A tansolusina é um antagonista selectivo dos receptores α -1 adrenérgicos usado no tratamento sintomático da hiperplasia benigna da próstata [63]. Este fármaco tem como efeito adverso a disfunção ejaculatória caracterizada por reduzidos volumes de esperma [64]. Em 2006 um grupo de investigadores comparou os efeitos da tansolusina na ejaculação com os efeitos de outro agente antagonista de receptores α -1 adrenérgico. Numa amostra de 48 homens com comprovada manutenção da função sexual, foi administrada por via oral, e durante 5 dias, uma dose diária de 0,8 mg de tansolusina. No fim

desse período de tempo foi medido o volume de ejaculado verificando-se uma diminuição do volume ejaculatório (definido como valor 20% inferior ao valor de base médio para todos os elementos da amostra) em 90% dos participantes que receberam tansolusina e, uma completa ausência de volume ejaculatório (100% inferior ao valor base) em cerca de 35% [65]. Esta investigação apesar de não ter sido realizada com o intuito de estudar um método de contracepção masculino revelou-se mais uma promessa para um possível local de intervenção na contracepção masculina.

6.7 Nas hormonas

Muitos dos estudos realizados centram-se no controlo hormonal para atingir a contracepção. Tal como o processo de regulação hormonal feminina, no homem a supressão da secreção de das gonadotropinas pituitárias (FSH e LH) através de hormonas exógenas poderá levar à contracepção desejada [66]. Uma das possibilidades, seria inibir a produção de GnRH e consequentemente a produção de LH e FSH. Poderíamos atingir esta situação através de dois processos: utilizando o mecanismo de feedback negativo através da administração de testosterona exógena [67] ou androgénios que mimetizam o efeito da mesma. Utilizando um inibidor da produção de GnRH como é o caso das progestinas e do estradiol, ou uma mistura de ambos [68]. A utilização de testosterona exógena não é suficiente para inibir a produção de LH e FSH [67], já a junção de testosterona com progestinas, tem revelado resultados promissores [68]. Vários métodos hormonais conjuntos têm vindo a ser testados como é o caso da combinação de Dianogest e Decanoato de Testoterona (DT) que em 2009 foram testados pela primeira vez em ratos. A administração através de injeção intramuscular de Dianogest na dose de 40 mg/kg de peso total cada 4 semanas, mais DT na dose de 25mg/kg de peso total cada seis semana, levou à completa abstenção de espermatogénese ao longo de 120 dias (Fig. 10).

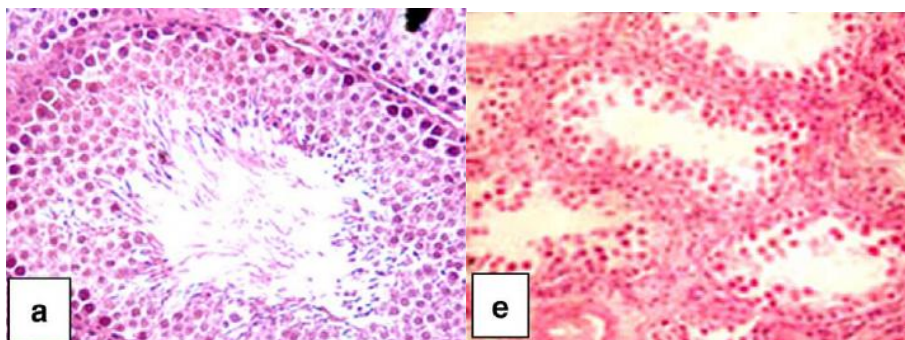


Fig 10 - Secções histológicas representativas dos testículos de ratos coradas com hematoxilina e eosina. a- Espermatogénese em rato normal. e-Espermatogénese com Dianogest na dose de 40 mg/kg de peso total cada 4 semanas mais DT na dose de 25mg/kg de peso total [66].

Este estudo foi inovador pois avaliou também a presença de efeitos secundários na população tratada ao nível de alterações hepáticas (Fosfatase Alcalina, Bilirrubina, AST, ALT) e alterações lipídicas (Triglicerídeos, Colesterol Total, Lipoproteínas de Elevada Densidade (HDL), Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL)) ao fim dos 120 dias de tratamento (Dianogest 40 mg/kg de peso total cada 4 semanas + DT 25 mg/kg de peso total cada 6 semanas). Nenhuma alteração foi verificada. [66]

O Modulador Seletivo de Receptor de Androgénios (SARM), o (S)-N-(4-ciano-3-trifluorometilphenil)-3-(3-fluoro, 4-clorofenoxi)-2-hidroxi-2-metil-propanamida (S23), é um androgénio sintetizado artificialmente que em conjunto com Benzoato de Estradiol (BE), foi testado pela primeira vez em ratos levando à inibição da espermatogénese com doses de 0,1 mg e 0,5 ug por dia respectivamente (Fig. 11).

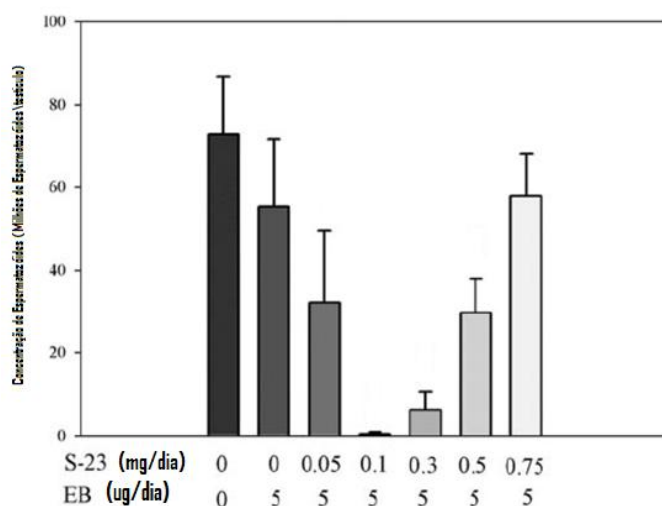


Fig.11 - Concentrações de esperma testicular. Cada barra representa a média \pm desvio padrão da concentração de esperma para cada grupo [69]

Para além desta análise, procederam à medição dos níveis de LH e FSH, os quais se encontravam suprimidos. É de salientar que com este tratamento os animais mantiveram a libido. [69] A transposição destes estudos para uma população humana poderá trazer um método contraceptivo eficaz e sem efeitos secundários.

7. Da teoria à prática: estudos epidemiológicos

Até este ponto os estudos analisados foram efectuados em populações animais ou em laboratório *in vitro*. Todos eles com o intuito de descortinar possíveis locais de intervenção ao longo do processo de espermatogénese. No entanto a necessidade de avançar na investigação em populações humanas é primordial para atingir um método contraceptivo eficaz, reversível e com efeitos secundários com frequência relativamente baixa para poder ser utilizado no quotidiano da prática clínica o mais rapidamente possível. Foi com esse intuito que em 2008, foi realizado o primeiro estudo em larga escala envolvendo cerca de 354 homens de seis países europeus diferentes, em que se definiu um grupo controlo com placebo. Realizado numa população de homens saudáveis, avaliou-se a supressão e reversibilidade do processo de espermatogénese utilizando dois tipos de implantes de etonogestrel combinado com três regimes diferentes de posologia de Undecanoato de Testosterona (UT) via injectável. Verificaram que cerca de 89% dos homens atingiram um valor de espermatozóides inferior a 1 milhão/ml (valor definido pela Organização Mundial de Saúde para definir azoospermia) ou menos após a 16ª semana de tratamento. A reversibilidade foi comprovada em todos os homens ao fim da 65ª semana do término do tratamento. Os valores de LH e FSH mantiveram-se em níveis reduzidos após 1 semana de tratamento retornando a níveis basais após 24 semanas de supressão. Poucos efeitos secundários foram reportados surgindo mais frequentemente a acne (26%), o aumento de peso (24%) e suores nocturnos (27%). Apesar dos resultados promissores não se pode verificar a reprodutibilidade do estudo já que não analisaram por exemplo o número de mulheres que ficaram grávidas durante o período de estudo. Outro aspecto negativo a salientar prende-se com a indefinição do número de implantes subcutâneos utilizados ao longo do estudo [70].

Em 2003 um grupo de investigadores fez o primeiro ensaio clínico com o androgénio sintético 7 α -Methyl-19-Nortestosterona (MENT). Utilizando implantes subdérmicos de etileno vinil acetato (aproximadamente 400 ug por dia por implante) analisaram a eficácia do método através da contagem mensal de espermatozóides, ao longo de 6 meses de tratamento, em 36 homens. Demonstrou que no grupo que recebeu quatro implantes (n=11) cerca de 82% atingiram a oligospermia e cerca de 67% atingiram a azoospermia em menos de 4 meses de tratamento. Para além disso, foi demonstrada a reversibilidade do processo nesse mesmo grupo ao fim de três meses (tempo médio) de suspensão do tratamento (valor da contagem de espermatozóides acima de 20 milhões/ml). Apesar de a eficácia ter ficado aquém do esperado (apenas 67 % atingiram valores de azoospermia), o estudo demonstra o potencial do androgénio sintético em produzir alterações na contagem de espermatozóides, através da simples aplicação de implantes na pele, num período mínimo de 6 meses. Seria pois uma

solução cómoda de utilização por parte do homem. Para além disto, o estudo revelou que não houve alterações significativas tanto no desempenho sexual como no tamanho da próstata [71]. Aspecto positivos quando comparados com o estudo de etonogestrel combinado com UT. Um estudo inovador foi realizado em 2003 que permitiu suplantar um dos aspectos negativos dos dois trabalhos referidos anteriormente: a reprodutibilidade do estudo. Utilizaram-se implantes de testosterona (4 implantes de 200mg cada quatro ou seis meses) em combinação com a progestina acetato de medroxiprogesterona via injectável cada 3 meses (300 mg) até atingir a azoospermia em duas amostras de sémen consecutivas ao longo de dois meses. A partir deste ponto todos os participantes no estudo descontinuaram qualquer método contraceptivo e a taxa de gravidez foi calculada ao longo de 12 meses. O estudo revelou que nenhuma gravidez ocorreu em 426 pessoas-mês tendo um índice de falha entre 0-8% [72]. Valor inferior ao índice de falha do preservativo no primeiro ano de uso (8 - 20%) [73]. Para além do mais o estudo revelou reversibilidade do método (contagens de espermatozóides acima dos 20 milhões/ml) em todos os homens à excepção de um elemento que teve uma patologia testicular. Dos poucos aspectos negativos a salientar neste trabalho encontra-se o facto da fraca caracterização dos efeitos adversos [72].

8. Conclusão e Perspectivas Futuras

O paradigma da actualidade é encontrar uma forma alternativa à contracepção feminina, através da contracepção masculina por métodos não-cirúrgicos. A presente monografia procurou fazer uma revisão exaustiva de estudos, experiências e os últimos avanços nesta área. Observou-se que o processo de espermatogénese é complexo, e mediado por inúmeras reacções e mensageiros químicos cujo mecanismo de acção necessita ainda de um conhecimento mais aprofundado. No entanto, este facto também nos abre um leque imenso de possíveis locais de intervenção para poder quebrar o processo de formação do espermatozóide. Nas espermatogónias a presença da molécula de GDNF é crucial na proliferação mitótica de novas células, a sua descoberta ao nível do testículo humano vem trazer perspectivas interessantes num método que permita barrar de uma forma muito precoce o processo de espermatogénese. No que toca às células de Sertoli as junções de oclusão são de particular interesse pois em conjunto formam a barreira hematotesticular, a zona que protege as células germinativas de qualquer agressão externa e interna. Os análogos da Lonidamina e o péptido de ocludina permitem quebrar essa barreira. Perspectivam-se duas possibilidades no futuro: encontrar compostos que em conjunto com estas substâncias permitam atingir as células germinativas, e, estudar de forma mais aprofundada a possibilidade das substâncias em si poderem servir de contracepção utilizadas de forma isolada. No epidímio a proteína eppin é a molécula mais promissora, uma vez que se revelou a sua extrema importância na manutenção da fertilidade. No espermatozóide as possibilidades existentes vão de encontro às alterações estruturais do mesmo. A RGL liofilizada e o RISUG permitem alterar a mobilidade e desintegrar o espermatozóide respectivamente. Encontrar um meio para aplicar estes compostos *in vivo* trará soluções interessantes que permitam afectar exclusivamente uma célula sem trazer efeitos adversos consideráveis. Na ejaculação pode-se intervir ao nível da contractilidade dos músculos e órgãos sexuais acessórios que permitem o movimento do espermatozóide para o exterior. A tansolusina afecta esse sistema levando a disfunções ejaculatórias. Apesar disso é necessário perceber se estas disfunções são suficientes para impedir a fertilização e funcionar como um verdadeiro contraceptivo. A nível hormonal encontram-se os maiores avanços ao nível da contracepção masculina. Os estudos feitos com a combinação Dianogest com DT, e a molécula S23 revelam eficácia, reversibilidade e poucos efeitos adversos nos mamíferos. Para além do mais todos os estudos epidemiológicos apresentados são testados com compostos hormonais.

Na minha opinião, todavia, penso que o principal *handicap* reside no facto de a maioria dos trabalhos analisados ao longo dos últimos dez anos efectuar-se ao nível das populações animais que, apesar de pertencerem à classe dos mamíferos (ratos, ratinhos e símios) carecem de representatividade a nível da população humana.

Se conseguirmos através de estudos mais arrojados verificar a similitude entre a fisiologia da reprodução dos animais até agora estudados e o homem poder-se-á efectuar mais e melhores estudos de intervenção e de campo na população humana masculina.

Perspectiva-se que no futuro a solução mais rápida para atingir um método contraceptivo desejado seja através do controlo hormonal, pois, como referido anteriormente, os únicos estudos efectivos com aplicabilidade prática em humanos até o tempo presente, englobam somente utilização de substâncias a esse nível. Penso também que estamos bastante próximos de atingir um método contraceptivo eficaz, seguro e reversível. Basta olhar para os resultados do estudo de 2003 com testosterona e acetato de medroxiprogesterona. Este estudo reproduzível (foi testada a capacidade de fertilização por parte do homem) demonstrou eficácia (índice de falha entre 0-8%) e reversibilidade (contagens de espermatozóides acima dos 20 milhões/ml). Apesar disso mais investigação é necessária para perceber quais os efeitos adversos inerentes a esta combinação.

Como conclusão, verifica-se que, apesar da evolução nos últimos dez anos, muito mais há a fazer para se chegar a um método contraceptivo masculino eficaz, reversível e seguro.

9. Referencias Bibliográficas

[1] Lipovetsky G. A terceira mulher: permanência e revolução do feminino. São Paulo, Brasil: Companhia das Letras; 2000.

[2] Boston women's health book collective our bodies, ourselves: a new edition for a new era, 35th anniversary edition. New York, USA: Touchstone; 2005

[3] Kippley, John; Sheila Kippley. The art of natural family planning. 4th addition ed. Cincinnati: The Couple to Couple League; 1996

[4] Heinemann K, Saad F, Wiesemes M, White S, Heinemann L. Attitudes toward male fertility control: results of a multinational survey on four continents. Hum Reprod. 2005 Feb;20(2):549-56.

[5] Brooks M. Men's views on male hormonal contraception-a survey of the views of attenders at a fitness centre in Bristol, UK. Br J Fam Plann. 1998 Apr;24(1):7-17.

[6] Francis S. Greenspan, Gordon J. Strewler. Endocrinologia básica e clínica. Quinta edição. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan S.A; 2000.

[7] Netter, Frank H. Atlas de anatomia humana. 3ed. Porto Alegre, Brasil. Artmed; 2003

[8] Adaptado de School of Anatomy and Human Biology. The University of Western Australia. 2009 Agosto 6. Disponível em: <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au>

[9] Enry Gray. Gray's Anatomy. 20ed. Philadelphia, USA: Lea & Febiger, 1918

[10] Wolfgang Kuenhel. Color atlas of cytology, histology, and microscopic anatomy. 4th edition, revised and enlarged. Thieme; 2003

[11] Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. Cell Tissue Res. 1990 Nov;262(2):253-61

[12] Schell C, Albrecht M, Mayer C, Schwarzer JU, Frungieri MB, Mayerhofer A. Exploring human testicular peritubular cells: identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor-alpha. Endocrinology. 2008 Apr;149(4):1678-86

[13] Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S et al. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 1993 Dec;123(6 Pt 2):1777-88.

[14] Chung NP, Mruk D, Mo MY, Lee WM, Cheng CY. A 22-amino acid synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of rat occludin perturbs the blood-testis barrier and disrupts spermatogenesis reversibly in vivo. *Biol Reprod.* 2001 Nov;65(5):1340-51.

[15] Wong V, Gumbiner BM. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol.* 1997 Jan 27;136(2):399-409.

[16] Dym M, Cavicchia JC. Functional morphology of the testis. *Biol Reprod.* 1978 Feb;18(1):1-15

[17] Fisher D. New light shed on fluid formation in the seminiferous tubules of the rat. *J Physiol.* 2002 Jul 15;542(Pt 2):445-52

[18] Pineau C, Le Magueresse B, Courtens JL, Jégou B. Study in vitro of the phagocytic function of Sertoli cells in the rat. *Cell Tissue Res.* 1991 Jun;264(3):589-98.

[19] Li MW, Xia W, Mruk DD, Wang CQ, Yan HH, Siu MK et al. Tumor necrosis factor α reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. *J Endocrinol.* 2006 Aug;190(2):313-29

[20] Uwe Gille. 2006 September 30 (citado 2010). Disponível em: <http://en.wikipedia.org>

[21] Li Y, Sosnik J, Brassard L, Reese M, Spiridonov NA, Bates TC et al. Expression and localization of five members of the testis-specific serine kinase (tssk) family in mouse and human sperm and testis. *Mol Hum Reprod.* 2011 Jan;17(1):42-56

[22] Cheng CY, Mruk DD. Mruk. A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nat Rev Endocrinol.* 2010 Jul;6(7):380-95

[23] Braydich-Stolle L, Kostereva N, Dym M, Hofmann MC. Role of Src family kinases and N-Myc in spermatogonial stem cell proliferation. *Dev Biol.* 2007 Apr 1;304(1):34-45.

[24] Sariola H, Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci.* 2003 Oct 1;116(Pt 19):3855-62

[25] Kotaja N, Bhattacharyya SN, Jaskiewicz L, Kimmins S, Parvinen M, Filipowicz W et al. The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 21;103(8):2647-52.

[26] Kleene KC. Multiple controls over the efficiency of translation of the mRNAs encoding transition proteins, protamines, and the mitochondrial capsule selenoprotein in late spermatids in mice. *Dev Biol*. 1993 Oct;159(2):720-31.

[27] Yang J, Medvedev S, Reddi PP, Schultz RM, Hecht NB. The DNA/RNA-binding protein MSY2 marks specific transcripts for cytoplasmic storage in mouse male germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 1;102(5):1513-8. Epub 2005 Jan 21.

[28] Zhong J, Peters AH, Lee K, Braun RE. A double-stranded RNA binding protein required for activation of repressed messages in mammalian germ cells. *Nat Genet*. 1999 Jun;22(2):171-4

[29] Shang P, Baarends WM, Hoogerbrugge J, Ooms MP, van Cappellen WA, de Jong AA et al. Functional transformation of the chromatoid body in mouse spermatids requires testis-specific serine/threonine kinases. *J Cell Sci*. 2010 Feb 1;123(Pt 3):331-9.

[30] Baker MA, Aitken RJ. Proteomic insights into spermatozoa: critiques, comments and concerns. *Expert Rev Proteomics*. 2009 Dec;6(6):691-705

[31] Phelps BM, Koppel DE, Primakoff P, Myles DG. Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domains. *J Cell Biol*. 1990 Nov;111(5 Pt 1):1839-47

[32] Cornwall GA, Hsia N, Sutton HG. Structure, alternative splicing and chromosomal localization of the cystatin-related epididymal spermatogenic gene. *Biochem J*. 1999 May 15;340 (Pt 1):85-93

[33] Richardson RT, Sivashanmugam P, Hall SH, Hamil KG, Moore PA, Ruben SM et al. Cloning and sequencing of human Eppin: A novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. *Gene*. 2001 May 30;270(1-2):93-102

[34] Cooper TG, Yeung CH. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech*. 2003 May 1;61(1):28-38.

[35] Amelar RD. Coagulation, liquefaction and viscosity of human semen. *J Urol.* 1962 Feb;87:187-90

[36] Olson GE, NagDas SK, Winfrey VP. Structural differentiation of spermatozoa during post-testicular maturation. In the epididymis: from molecules to clinical practice, 2002 371-387.

[37] Bailey JL. Factors regulating sperm capacitation. *Syst Biol Reprod Med.* 2010 Oct;56(5):334-48

[38] Lundwall A. The cloning of a rapidly evolving seminal-vesicle-transcribed gene encoding the major clot-forming protein of mouse semen. *Eur J Biochem.* 1996 Jan 15;235(1-2):424-30

[39] Yenugu S, Richardson RT, Sivashanmugam P, Wang Z, O'Rand MG, French FS et al. Antimicrobial activity of human eppin, an androgen-regulated, sperm-bound protein with a whey acidic protein motif. *Biol Reprod.* 2004 Nov;71(5):1484-90. Epub 2004 Jun 30

[40] Wang Z, Widgren EE, Sivashanmugam P, O'Rand MG, Richardson RT. Association of eppin with semenogelin on human spermatozoa. *Biol Reprod.* 2005 May;72(5):1064-70. Epub 2004 Dec 8.

[41] Bruce MK, Bruce AS. *Berne & Levy Physiology.* Philadelphia, PA: Elsevier/Mosby:2008.

[42] Chen Y, Li H, Dong Q, Wang KJ. Blockade of $\alpha 1A$ -adrenoceptor: A novel possible strategy for male contraception. *Med Hypotheses.* 2009 Aug;73(2):140-1. Epub 2009 May 8

[43] Sharif SI, Gokhale SD, Chandranath SI. Pharmacological characterization of the postjunctional alpha-adrenoceptors of the rat isolated seminal vesicle. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1990 May;341(5):425-31.

[44] Singh J, O'Neill C, Handelsman DJ. Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology.* 1995 Dec;136(12):5311-21

[45] Weinbauer GF, Nieschlag E. Gonadotrophin-releasing hormone analogue-induced manipulation of testicular function in the monkey. *Hum Reprod.* 1993 Nov;8 Suppl 2:45-50.

[46] Spiridonov NA, Wong L, Zerfas PM, Starost MF, Pack SD, Paweletz CP et al. Identification and characterization of sstk, a serine/threonine protein kinase essential for male fertility. *Mol Cell Biol.* 2005 May;25(10):4250-61

- [47] Ruiz Plazas X, Burgués Gasió JP, Ozonas Moragues M, Pizá Reus P. Utility of inhibin B in the management of male infertility. *Actas Urol Esp.* 2010 Oct;34(9):781-7
- [48] Robertson DM, Hayward S, Irby D, Jacobsen J, Clarke L, McLachlan RI et al; Radioimmunoassay of rat serum inhibin: changes after PMSG stimulation and gonadectomy. *Mol Cell Endocrinol.* 1988 Jul;58(1):1-8
- [49] Jensen TK, Andersson AM, Hjollund NH, Scheike T, Kolstad H, Giwercman A et al. Inhibin b as a serum marker of spermatogenesis: correlation to differences in sperm concentration and follicle-stimulating hormone levels. A Study of 349 Danish Men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Dec;82(12):4059-63
- [50] Krishnamurthy H, Danilovich N, Morales CR, Sairam MR. Qualitative and quantitative decline in spermatogenesis of the follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) mouse. *Biol Reprod.* 2000 May;62(5):1146-59
- [51] Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M et al. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: Targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 10;95(23):13612-7
- [52] Adaptado de Pearson Education, Inc, publishing as Benjamin Cummings. 2007. Disponível em <http://www.colorado.edu/intphys/Class/IPHY3430-200/024reproduction.htm>
- [53] Naughton CK, Jain S, Strickland AM, Gupta A, Milbrandt J. Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated ret signaling regulates spermatogonial stem cell fate, *Biol Reprod.* 2006 Feb;74(2):314-21.
- [54] Spinnler K, Köhn FM, Schwarzer U, Mayerhofer A. Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Hum Reprod.* 2010 Sep;25(9):2181-7.
- [55] Gray TJ, Gangolli SD. Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters, *Environ Health Perspect.* 1986 Mar;65:229-35
- [56] Silvestrini B. Basic and applied research in the study of indazole carboxylic acids. *Chemotherapy.* 1981;27 Suppl 2:9-20.

[57] Cheng CY, Silvestrini B, Grima J, Mo MY, Zhu LJ, Johansson E et al. Two new male contraceptives exert their effects by depleting germ cells prematurely from the testis; *Biol Reprod.* 2001 Aug;65(2):449-61

[58] Wong V, Gumbiner BM. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol.* 1997 Jan 27;136(2):399-409

[59] Wong CH, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Targeted and reversible disruption of the blood-testis barrier by an FSH mutant-occludin peptide conjugate *FASEB J.* 2007 Feb;21(2):438-48

[60] O'rand MG, Widgren EE, Sivashanmugam P, Richardson RT, Hall SH, French FS et al. Reversible immunocontraception in male monkeys immunized with eppin. *Science.* 2004 Nov 12;306(5699):1189-90

[61] Harat ZN, Sadeghi MR, Sadeghipour HR, Kamalinejad M, Eshraghian MR. Immobilization effect of *Ruta graveolens* L. on human sperm: a new hope for male contraception, *J Ethnopharmacol.* 2008 Jan 4;115(1):36-41

[62] Kumar S, Chaudhury K, Sen P, Guha SK. Topological alterations in human spermatozoa associated with the polyelectrolytic effect of RISUG. *Micron.* 2006;37(6):526-32. Epub 2006 Feb 9

[63] US Food and Drug Administration. FDA Approves First Generic Tamsulosin to Treat Enlarged Prostate Gland [online]. 2010 March 2; disponível em: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm202728.htm>

[64] Kawabe K, Yoshida M, Homma Y; Silodosin Clinical Study Group. A new alpha1A-adrenoceptor selective antagonist for treating benign prostatic hyperplasia: results of a phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study in Japanese men. *BJU Int.* 2006 Nov;98(5):1019-24

[65] Hellstrom WJ, Sikka SC. Effects of acute treatment with tamsulosin versus alfuzosin on ejaculatory function in normal volunteers. *J Urol.* 2006 Oct;176(4 Pt 1):1529-33

[66] Misro MM, Chaki SP, Kaushik MC, Nandan D. Trials for development of once-a-month injectable, hormonal male contraceptive using dienogest plus testosterone undecanoate: dose standardization, efficacy and reversibility studies in rats. *Contraception.* 2009 Jun;79(6):488-97.

[67] Kornmann B, Nieschlag E, Zitzmann M, Gromoll J, Simoni M, von Eckardstein S. Body fat content and testosterone pharmacokinetics determine gonadotropin suppression after intramuscular injections of testosterone preparations in normal men. *J Androl.* 2009 Sep-Oct;30(5):602-13

[68] WHO Special Programme of Research. Development and Research Training in Human Reproduction. Annual and biannual reports. Geneva: 1972-1995;

[69] Jones A, Chen J, Hwang DJ, Miller DD, Dalton JT. Preclinical characterization of a (s)-n-(4-cyano-3-trifluoromethyl-phenyl)-3-(3-fluoro, 4-chlorophenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-propanamide: a selective androgen receptor modulator for hormonal male contraception. *Endocrinology.* 2009 Jan;150(1):385-95

[70] Mommers E, Kersemaekers WM, Elliesen J, Kepers M, Apter D, Behre HM et al. Male hormonal contraception: a double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Jul;93(7):2572-80

[71] von Eckardstein S, Noe G, Brache V, Nieschlag E, Croxatto H, Alvarez F et al. A clinical trial of 7_α-methyl-19-nortestosterone implants for possible use as a long-acting contraceptive for men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Nov;88(11):5232-9

[72] Turner L, Conway AJ, Jimenez M, Liu PY, Forbes E, McLachlan RI et al. Contraceptive efficacy of a depot progestin and androgen combination in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Oct;88(10):4659-67

[73] World Health Organization Department of Reproductive Health and Research, Johns Hopkins Bloomberg. Family Planning: A Global Handbook for Providers. Baltimore and Geneva: 2007