

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PRODUÇÃO DE EMBRIÕES HUMANOS ATRAVÉS DA
INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE
ESPERMATOZÓIDES OBTIDOS DO EJACULADO,
EPIDÍDIMO OU TESTÍCULO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Anita Mylius Pimentel

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

**PRODUÇÃO DE EMBRIÕES HUMANOS ATRAVÉS DA
INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES
OBTIDOS DO EJACULADO, EPIDÍDIMO OU TESTÍCULO**

por

Anita Mylius Pimentel

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientador: Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PRODUÇÃO DE EMBRIÕES HUMANOS ATRAVÉS DA INJEÇÃO
INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES OBTIDOS DO
EJACULADO, EPIDÍDIMO OU TESTÍCULO**

elaborada por
Anita Mylius Pimentel

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO ORGANIZADORA:

Paulo Bayard Dias Gonçalves, Dr.
(Presidente/Orientador)

Alceu Mezzalira, Dr. (UDESC)

Maria Gabriela Tavares Rheingantz, Dra. (UFPeI)

Santa Maria, 18 de agosto de 2006

AGRADECIMENTOS:

A Deus, por tudo, pela vida.

Aos meus pais (Sandra, Cláudio e Anelise) por sempre acreditarem em mim. A minha irmã Alice pelo amor e pela alegria.

Ao meu amor, Marcelo por acreditar em mim, ter orgulho e sempre me apoiar muito.

Ao professor Paulo Bayard pela oportunidade, orientação e disposição. Pelos ensinamentos e incentivo.

A professora e amiga Maria Gabriela Rheingantz pelos conhecimentos e incentivo em meus “primeiros passos” no laboratório e na pesquisa.

Ao colega Rogério Ferreira pela ajuda, incentivo, incansável paciência e amizade. A todos os colegas do BioRep.

A família Wolle pelo aconchego de um lar e uma família.

As minhas amigas Denise, Marta e Stella, pelo apoio, atenção e amizade constantes.

Ao Fertilitat – Centro de Medicina Reprodutiva, por ter cedido os dados para a realização deste trabalho.

A todas aquelas pessoas que, de uma forma ou outra, contribuíram para que eu pudesse estar onde estou hoje.

Muito obrigado!

*“Às vezes dá tudo errado, e aí acontecem coisas maravilhosas que jamais teriam
acontecido se tudo tivesse dado certo”.
(autor desconhecido).*

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES HUMANOS ATRAVÉS DA INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES OBTIDOS DO EJACULADO, EPIDÍDIMO OU TESTÍCULO

AUTORA: ANITA MYLIUS PIMENTEL

ORIENTADOR: PROF. PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de agosto de 2006.

Este estudo retrospectivo avaliou as taxas de fertilização, clivagem e qualidade de embriões humanos obtidos através da injeção intracitoplasmática (ICSI) de espermatozóides provenientes do ejaculado, epidídimo ou testículo. Foram incluídos 398 ciclos de pacientes que apresentaram algum tipo de infertilidade masculina, sendo inseminados 3991 oócitos. Os espermatozóides do epidídimo e do testículo foram recuperados cirurgicamente. As taxas de fertilização e de clivagem com espermatozóides do ejaculado (74,5% e 73%, respectivamente) foram maiores ($P < 0,0001$) do que as do testículo (59,7% e 56,8%, respectivamente) e do epidídimo (61,9% e 59,3%). A produção de embriões viáveis (grau I e II) foi maior ($P = 0,0135$) quando os oócitos foram inseminados com espermatozóides do ejaculado (89,4%), em relação ao epidídimo (82,9%) e testículo (85,7%). As taxas de gestação não foram diferentes entre os grupos (37,8% no grupo EJAC, 27,6% EPID e 36,8% no grupo TEST). Em conclusão, espermatozóides do ejaculado produzem um maior número de embriões viáveis, com maiores taxas de fertilização e de clivagem. Entretanto, quando utilizados espermatozóides do epidídimo e do testículo na ICSI, a produção de embriões viáveis é considerável, obtendo êxito nas técnicas de reprodução assistida.

Palavras-chave: Infertilidade masculina, qualidade embrionária, espermatozóides, ICSI, PESA, TESA.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PRODUCTION OF HUMAN EMBRYOS WITH INTRACYTOPLASMIC INJECTION OF SPERM OBTAINED FROM EJACULATE, EPIDIDYMIS AND TESTIS

Autor: Anita Mylius Pimentel
Orientador: Paulo Bayard Dias Gonçalves
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de agosto de 2006

This retrospective study compared rates of fertilization, cleavage and quality of human embryos obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI), with sperm from ejaculate, epididymis and testis. A total of 398 cycles of patients with some kind of male infertility were included and 3991 oocytes were inseminated. The spermatozoa from epididymis and testis were surgically obtained. Fertilization and cleavage rates with sperm from ejaculate (75% and 73%, respectively) were higher ($P < 0,0001$) than those with sperm from the testis (59,7% e 56,8%, respectively) and from epididymis (61,9% e 59,3%). The production of viable embryos (grade I and II) was higher ($P = 0,0135$) when the oocytes were inseminated with ejaculate sperm (89,4%) in relation to sperm from epididymis (82,9%) and testis (85,7%). The percentages of pregnancy were not different among groups (37,8% EJAC group, 27,6% EPID and 36,8% TEST group). In conclusion, sperm from ejaculate have a higher production of viable embryos. However, when sperm from the testis and epididymis are used for ICSI, the production of viable embryos is also considerable and can be seen as success in the assisted reproduction techniques.

Key words: Male infertility, embryo quality, sperm, ICSI, PESA, TESA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1. Infertilidade masculina	10
2.2. Maturação e capacitação espermática.....	11
2.3. Recuperação de Espermatozóides do Epidídimo e do Testículo.....	12
2.4. Injeção intracitoplasmática de espermatozóides	14
2.5. Qualidade embrionária	15
2.6. O espermatozóide na fertilização e desenvolvimento embrionário.....	17
3. CAPÍTULO 1	20
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

Ao contrário da reprodução animal, que tem como objetivo o melhoramento genético e o aumento da fertilidade de animais de alto valor comercial, na reprodução humana, o enfoque é a infertilidade ou sub-fertilidade, tanto feminina, quanto masculina.

Nas últimas décadas, avanços na reprodução humana tornaram possível a gravidez de casais considerados inférteis. O nascimento de Louise Brown em 1978 (STEPTOE & EDWARDS, 1978), a primeira criança concebida após fertilização *in vitro* (FIV) e transferência de embrião marcaram o início do progresso no entendimento e tratamento dos problemas relacionados à fertilidade humana. O sucesso dessa técnica ocorreu após vários anos de estudo, onde o modelo de pesquisa sempre foi o animal (PASSOS, 2004).

Originalmente, a FIV seguida da transferência de embriões foi proposta para o tratamento dos casos de infertilidade tubária, ou seja, para pacientes com os ovidutos obstruídos ou ausentes. Mais tarde a técnica passou a ter outras indicações, onde foi possível resolver de forma eficiente um grande número de transtornos de origem feminina. Entretanto, os homens acometidos de fator masculino severo, criptozoospermia, espermatozoides sem poder fertilizante, epidídimo obstruído ou falência testicular não tinham qualquer chance de gravidez (IRVINE, 1998). Com isso, os casos de infertilidade masculina ainda não podiam ser resolvidos, pois mesmo a FIV ainda necessitava de um grande número de espermatozoides (100 mil/oócito) com boa motilidade para fertilizar um único oócito.

Um marco importante no avanço das técnicas de reprodução assistida ocorreu em 1992, quando PALERMO et al. descreveram a técnica da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), onde é necessário apenas um espermatozoide para fecundar cada oócito. Em 1993, VAN STEIRTEGHEM et al., reportaram taxas de gestação com ICSI de aproximadamente 35%, bastante

superiores àquelas obtidas de outras técnicas de micromanipulação de gametas como PZD (*partial zone dissection*) e SUZI (*subzonal insertion*). A ICSI é hoje a técnica mais empregada nos casos em que existem alterações graves nos parâmetros seminais. Essa técnica ultrapassa todas as barreiras do oócito, inclusive a membrana plasmática. A grande vantagem da ICSI é o fato da fertilização não ser afetada pela concentração, motilidade e/ou morfologia espermática (NAGY et al., 1995).

Até alguns anos atrás, a infertilidade masculina era considerada o grupo mais difícil de tratar. Hoje em dia, praticamente todos esses casos podem ser potencialmente tratados por algum método de reprodução humana assistida.

A ICSI permite o tratamento da infertilidade masculina por azoospermia obstrutiva com o uso de espermatozóides do epidídimo (TOURNAYE et al., 1994) ou do testículo (CRAFT et al., 1993). Entretanto, espermatozóides presentes no testículo estão completando a espermatogênese e aqueles presentes no epidídimo estão passando pela maturação e aquisição de fatores decapacitantes (ZANEVELD et al., 1991; COOPER & YEUNG, 1997). Quando são recuperados cirurgicamente, esses espermatozóides apresentam-se em formas imaturas, alguns com motilidade, outros totalmente imóveis, dificultando a escolha para a ICSI. Diante disso, a utilização de espermatozóides em diferentes estádios de maturação, para técnicas de reprodução assistida, pode afetar o desenvolvimento embrionário e a conseqüente qualidade do embrião.

O objetivo deste trabalho foi o de investigar, na infertilidade masculina, se existe diferença nas taxas de fertilização, clivagem e no número de embriões viáveis para transferência embrionária ou congelamento, a partir da ICSI com espermatozóides provenientes do ejaculado, do epidídimo ou do testículo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Infertilidade masculina

O fator masculino está presente em 25 a 40% dos casais inférteis (SPIRA & MULTIGNER, 1998), o que torna obrigatória a avaliação clínica do homem em todo o casal infértil. O estudo do sêmen deve ser considerado como elemento mais importante na apreciação da infertilidade masculina (MENIRU et al., 1998). Quando o homem não apresenta espermatozóides no ejaculado, é oferecido um procedimento diagnóstico de aspiração percutânea de espermatozóides do epidídimo (PESA) ou aspiração testicular de espermatozóides (TESA).

A azoospermia tem sido encontrada em 10% dos casos de infertilidade masculina (IRVINE, 1998), podendo ser classificada em “obstrutiva” e “não-obstrutiva”. Em casos obstrutivos a espermatogênese é normal, mas há uma obstrução em algum local dos ductos seminiais, enquanto nos casos não-obstrutivos há uma deficiência (ou ausência) da espermatogênese.

A infertilidade masculina pode ser resultado de doenças congênitas (deleções do cromossomo Y, síndrome de Klinefelter, criptorquidismo, varicocele, etc.) ou adquiridas (trauma, torção, castração, câncer, drogas citotóxicas, álcool, irradiação, toxinas do meio ambiente, dentre outras). Entretanto, a maioria dos homens inférteis é saudável e não apresenta sintomas de outras doenças (IAMMARRONE et al., 2003).

O sêmen do ejaculado pode apresentar parâmetros fora da faixa de normalidade por causas como disfunção testicular, estimulação desordenada do testículo normal, produção e desenvolvimento anormal de espermatozóides ou danos no trato genital extratesticular. Segundo PASQUALOTTO et al. (2000), alguns mediadores da reação inflamatória podem ser responsáveis pelo estresse oxidativo do plasma seminal, cujos parâmetros podem ser prejudicados.

Infelizmente, em aproximadamente 50% dos homens inférteis não é possível encontrar a causa da infertilidade e essa situação tem sido definida como inexplicável (sem causa aparente) ou idiopática. Nesse grupo de homens, uma alteração nos parâmetros seminais está freqüentemente presente. Assim como ocorre a diminuição na concentração de espermatozóides, pode haver a diminuição na motilidade e anormalidades morfológicas (IAMMARRONE et al., 2003).

Muitas das alterações espermáticas presentes na infertilidade idiopática, têm sido relacionadas à alteração no processo de maturação e, em particular, à presença de espécies reativas ao oxigênio (ERO). Essas ERO são fisiologicamente produzidas pelos espermatozóides e são necessárias, por exemplo, para a ocorrência dos processos de capacitação espermática e reação acrossômica (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992).

Os altos níveis de ERO observados em sêmen alterado parecem ser decorrentes de defeitos na espermatogênese, havendo retenção de um excesso de citoplasma residual e aumento da disponibilidade de algumas enzimas citoplasmáticas que favorecem a geração de ERO (AITKEN & FISHER, 1994), o que explicaria o baixo potencial de fertilização de espermatozóides anormais.

2.2. Maturação e capacitação espermática

A maturação do espermatozóide é um processo complexo que envolve eventos que ocorrem no epitélio seminífero, durante a sua migração pelos túbulos seminíferos e pelo epidídimo. A remodelagem nuclear e de membrana que ocorre durante esses eventos levam à diferenciação espermática, à aquisição da motilidade e à habilidade do espermatozóide de reconhecer, se ligar e penetrar na zona pelúcida do oócito e, subseqüentemente, se fundir com o oolema (MOORE & AKHONDI, 1996). Ou seja, a espermatogênese ocorre nos túbulos seminíferos e quando o espermatozóide passa pelo epidídimo sofre uma maturação e adquire capacidade de fertilizar.

As alterações na célula espermática, concomitantes com o processo de maturação pelo epidídimo, incluem modificações morfológicas como a liberação da gota citoplasmática, alterações bioquímicas, que incluem a estabilização estrutural da cromatina no núcleo e outras organelas, e alterações na composição e nas propriedades da membrana (COOPER, 1990; MOORE & AKHONDI, 1996). Segundo GOLAN et al. (1996), a condensação da cromatina do espermatozóide humano ocorre durante o transporte pelas porções proximais do epidídimo. Dessa forma, o processo de empacotamento de DNA não é completo durante a espermatogênese nos testículos. Esses pesquisadores relataram ainda que aproximadamente 70% dos espermatozóides se encontravam maduros assim que alcançavam a cauda distal do epidídimo.

Os espermatozóides, ao passarem pelo epidídimo, adquirem fatores decapacitantes, que previnem o espermatozóide de sofrer precocemente alguns dos processos da fertilização. A remoção desses fatores ocorre durante a passagem do espermatozóide pelo trato genital feminino (COOPER & YEUNG, 1997).

Dessa forma, quando é utilizada a técnica de ICSI, o embriologista seleciona os espermatozóides com aparência morfológica normal e sendo assim, nem sempre se observam pequenas alterações e conseqüentemente, pode-se obter uma baixa fertilização ou um desenvolvimento embrionário inadequado (observações pessoais).

2.3. Recuperação de espermatozóides do epidídimo e do testículo

A recuperação de espermatozóides do epidídimo ocorre de duas maneiras: por aspiração microcirúrgica (MESA – *microsurgical epididymal sperm aspiration*) ou por aspiração percutânea (PESA – *percutaneous epididymal sperm aspiration*). Os espermatozóides recuperados através destas técnicas apresentam número e motilidade menores do que os espermatozóides do ejaculado. A PESA é mais utilizada por ser um método menos invasivo, onde não é necessária experiência microcirúrgica, como é feito na MESA. Com a PESA o trauma no epidídimo é menor, proporcionando

melhor recuperação para o paciente (ROSENLUND et al., 1998). Espermatozóides obtidos por PESA podem ser criopreservados para uso posterior, evitando repetir o procedimento (TSIRIGOTIS & CRAFT, 1995). Essa técnica é utilizada, principalmente, quando há diagnóstico de azoospermia obstrutiva, vasectomia ou alguma falha no transporte dos espermatozóides.

A recuperação de espermatozóides do testículo por TESA (*testicular sperm aspiration*), junto com a ICSI, tem sido o método de escolha para o tratamento da infertilidade masculina por azoospermia não-obstrutiva (DEVROEY et al., 1996). Essa associação tem sido utilizada inclusive em casos de deficiência na espermatogênese (TOURNAYE et al., 1996).

As razões pelas quais se prefere a PESA ao invés da TESA, em geral, são pela obtenção de um maior número de espermatozóides, o que facilita a sua manipulação. Entretanto, nem sempre se pode optar pela PESA, pois em casos de azoospermia não-obstrutiva e parada da maturação, os espermatozóides só estão presentes no testículo. A TESA também pode ser uma alternativa em casos de falha de PESA (ABUZEID et al., 1995). Quando a histologia testicular é normal, ou em casos de hipoplasia de células germinativas, a recuperação dos espermatozóides é geralmente bem sucedida. Em pacientes com aplasia de células germinativas, ou parada da maturação, a produção de espermatozóides e sua recuperação são muito variadas (TOURNAYE et al., 1996).

Em casos de azoospermia não-obstrutiva, tanto a qualidade quanto a quantidade de espermatozóides recuperados serão menores que em azoospermias obstrutivas. As taxas de fertilização e gestação são significativamente diminuídas (FAHMY et al., 1997; MANSOUR et al., 1997), em comparação, outros autores (KAHRAMAN et al., 1996; PALERMO et al., 1999) relataram baixas taxas de fertilização, mas as taxas de gestação não foram afetadas. Uma possível razão para menores taxas de fertilização, nesses casos, deve-se a baixas concentrações espermáticas, dificultando a escolha do espermatozóide com uma maturação normal e/ou completa (DE CROO et al., 2000).

2.4. Injeção intracitoplasmática de espermatozóides

Na ICSI, todos os passos de capacitação, reação do acrossoma e penetração do espermatozóide através de todos os envoltórios do oócito são ultrapassados pela simples injeção de um espermatozóide no ooplasma do oócito com o auxílio de micropipetas adequadas para este procedimento.

Segundo KHORRAM et al. (2001), pacientes beneficiados com a ICSI, geralmente apresentam anormalidades detectadas na análise do sêmen, como oligozoospermia severa (concentração de espermatozóides por ml < 2 milhões), astenozoospermia (<5 a 10% de espermatozóides móveis), muitas anormalidades morfológicas (<4% formas normais), uso de espermatozóides recuperados cirurgicamente, e falha na FIV em ciclo anterior. Em outras indicações, como fertilização baixa em ciclo anterior de FIV e número muito baixo de recuperação de oócitos, o método de escolha tem sido a ICSI.

A imobilização do espermatozóide imediatamente antes do procedimento de ICSI é a chave para o sucesso dessa técnica. Dessa forma, a membrana do espermatozóide se torna permeável, permitindo que o núcleo seja exposto ao ooplasma, possibilitando a fusão do espermatozóide com o oócito e a formação do pronúcleo masculino. Essa fusão ativa a extrusão do segundo corpúsculo polar e conseqüentemente, ocorre a formação do pronúcleo feminino (TAKEUCHI et al., 2004).

Essa imobilização é particularmente vantajosa, quando realizada agressivamente, pois gera uma ruptura mais extensa na membrana da cauda do espermatozóide, quando esses são recuperados do epidídimo e do testículo, aumentando as taxas de fertilização e gestação (GERRIS et al., 1995; PALERMO et al., 1996).

O espermatozóide e a própria injeção contribuem para a ativação do oócito. Durante a injeção, o citoplasma (ooplasma) do oócito é aspirado e re-injetado para causar essa ativação e ter certeza que o espermatozóide ficou dentro do citoplasma. Entretanto, em outras espécies, principalmente em bovinos, as taxas de fertilização

após a ICSI são baixas, pois só a injeção não é capaz de induzir a ativação (IRITANI, 1991). Conforme estudo de DOZORTSEV et al. (1995), a própria célula espermática contribui para a ativação de oócitos humanos pela ICSI.

Na prática, se observa que as taxas de fertilização pós ICSI podem variar de 30 a 90%, ou seja, mesmo injetando-se um espermatozóide no interior de um oócito maduro (quando o núcleo se encontra em metáfase II), pode haver uma taxa de insucesso significativa. A não ocorrência de fertilização com a utilização da ICSI pode estar relacionada a fatores como: presença de radicais livres no sêmen, anormalidades cromossômicas e defeitos protéicos na superfície dos gametas ou na organização de sua cromatina (DUBEY et al., 1997). Embora a fisiologia deste baixo resultado pós ICSI ainda não seja compreendida, há evidências que alterações bioquímicas ou até mesmo moleculares inerentes ao espermatozóide sejam mais importantes que a morfologia espermática (SAKKAS et al., 1996).

A diminuição do potencial desses embriões derivados da ICSI pode ser devido a influências paternas ou ao próprio procedimento em si, pois muitas vezes se utiliza espermatozoides anormais e/ou imaturos. Esses espermatozoides são capazes de ativar a fertilização; entretanto, anomalias no DNA podem causar parada no desenvolvimento na fase pré-implantacional. Por outro lado, o próprio procedimento de ICSI é invasivo e pode causar danos em componentes nucleares ou citoplasmáticos dentro do oócito que são necessários para o desenvolvimento embrionário (SAKKAS et al., 1998; KHORRAM et al., 2001).

2.5. Qualidade embrionária

Um dos pontos mais críticos para se obter sucesso na FIV e ICSI é a obtenção de embriões capazes de implantação e gestação normal. Quando embriões de alta qualidade morfológica são selecionados e transferidos, se observa um aumento nas taxas de gestação. As características mais importantes a serem avaliadas no embrião

são a extensão e forma da fragmentação; forma e tamanho dos blastômeros e o número de células em estádios precoces de desenvolvimento (ZIEBE et al., 1997).

Na reprodução humana, a transferência de embriões em estádios precoces é preferível à transferência em estádios avançados por ser um curto período de cultivo e apresentar menos custo, pois os meios comerciais seqüenciais disponíveis para o cultivo de blastocistos apresentam custo elevado. As taxas de gestação não apresentam incremento com a transferência de blastocistos, principalmente porque muitos ciclos acabam sendo cancelados por não apresentarem embrião viável (COSKUN et al., 2000). O cultivo de embriões até o dia 3 (D3) permite o desenvolvimento embrionário com melhora nos critérios de seleção destes, possibilitando identificar e selecionar os embriões que têm potencial para iniciar a compactação dos blastômeros, observando aumento na aderência entre as células e a perda da definição de blastômeros individuais (DESAI et al., 2000). Contudo, acredita-se que quanto antes o embrião voltar para o útero materno, melhor para o posterior desenvolvimento, pois terá todos os nutrientes necessários.

Quando se examina qualidade embrionária, uma das avaliações é a quantidade de fragmentação que o embrião produz. A fragmentação é um achado comum que limita o desenvolvimento *in vitro*. Uma das influências da fragmentação na qualidade do embrião é que esses fragmentos impediriam o perfeito contato espacial entre os blastômeros, levando a compactação, cavitação e formação de blastocistos anormais. Esses fragmentos poderiam provocar uma degeneração secundária devido à presença de detritos celulares próximos aos blastômeros saudáveis (DOZORTSEV et al., 1998). O grau de fragmentação do embrião é expresso em porcentagem, numa relação entre o volume que os fragmentos citoplasmáticos anucleados ocupam e o volume do embrião como um todo. Avaliando o grau de fragmentação de um embrião, pode-se prever sua qualidade e capacidade de implantação.

Os fragmentos celulares contêm, além do citoplasma, organelas citoplasmáticas intactas, e ocasionalmente, parte de cromatina condensada. Esses fragmentos podem ser uma conseqüência de morte celular programada em estádios precoces de desenvolvimento embrionário, com efeitos prejudiciais que podem levar à morte celular

em alguns blastômeros, ou em alguns casos à morte ou parada do desenvolvimento embrionário (JURISICOVA et al., 1996).

A disposição dos fragmentos tem um forte efeito no desenvolvimento embrionário. Dessa forma, a perda de grandes volumes de citoplasma parece ser prejudicial para o embrião. Quando ALIKANI et al. (1999) transferiram embriões grau IV, com fragmentos largos e grandes, as taxas de implantação foram significativamente mais baixas que embriões de outros padrões. Esses pesquisadores observaram que quando os fragmentos eram pequenos e espalhados entre as células e o espaço perivitelino, o posterior desenvolvimento embrionário não ficava comprometido.

A fragmentação, eliminação de parte dos blastômeros pelo embrião, parece ser um esforço em restaurar ou manter a viabilidade quando certas anomalias afetam algum blastômero em particular. Essa eliminação precoce de células afetadas previne uma contribuição alterada dessas células para a massa celular interna ou o trofotoderma do blastocisto (MUNNÉ et al., 1995).

2.6. O espermatozóide na fertilização e desenvolvimento embrionário

Segundo PALERMO et al. (1997) o centrosomo é considerado uma estrutura responsável por dois eventos básicos: a nucleação dos microtúbulos e a formação de um fuso acromático eficiente. Esses pesquisadores consideram que as divisões que ocorrem durante a meiose, servem para reduzir a equivalência do centrosomo, assim como o número de cromossomos, pois em oócitos fertilizados, deve haver mecanismos específicos para controlar a hereditariedade.

O centrômero consiste em dois centríolos alinhados em ângulo retos um com o outro. SATHANANTHAN et al. (1996) demonstraram que o centríolo/centrosomo proximal do espermatozóide é transportado ao oócito na fertilização e persiste através da descondensação do núcleo espermático. Além disso, faz a organização inicial do áster espermático. Inclusive em estádios avançados de clivagem, resíduos de célula

espermática foram encontrados em células embrionárias como mórulas e blastocistos, sendo que centríolos espermáticos foram muitas vezes intimamente associados ao núcleo. Segundo esses pesquisadores, a função primordial e mais importante do centríolo espermático parece ser a introdução do centrosomo intacto no citoplasma do oócito para organizar o áster.

No momento da fertilização, ocorrem movimentos citoplasmáticos que são responsáveis pela rotação e atração do pronúcleo masculino em torno do pronúcleo feminino (VAN BLERKOM et al., 1995), que são essenciais para colocar o centrosomo e a cromatina entre os núcleos. O centrosomo derivado do espermatozóide precisa estar no centro para a duplicação e para que a cromatina se mova para o lado oposto do oócito durante a primeira divisão mitótica. Falhas nesta rotação levam a separação anormal da cromatina, resultando em embriões não-viáveis, de má qualidade (SCHATTEN, 1994). Os pronúcleos se movem e os cromossomos se condensam fazendo a singamia antes da quebra da membrana nuclear.

Em homens subférteis, defeitos na compactação da cromatina causam instabilidade do DNA e maior susceptibilidade à desnaturação (MANICARDI et al., 1995). Após a fertilização do oócito, ocorre então a descondensação da cromatina espermática, processo indispensável para que ocorra a interação entre os gametas. Pacientes inférteis exibem anomalias em sua cromatina relacionadas à disposição irregular de protamina durante a espermatogênese (SAKKAS et al., 1996).

Quando KAHRAMAN et al. (2002) utilizaram formas imaturas de espermatozóides na ICSI, observaram maior parada no desenvolvimento de zigotos, embriões com desenvolvimento lento e anormalidades cromossômicas. Fertilização e posterior desenvolvimento embrionário não foram afetados quando utilizados espermatozóides do testículo em casos de azoospermia.

Contudo, TESARIK et al. (2002) observaram o desenvolvimento embrionário utilizando oócitos de doadora/receptora que foram fecundados com espermatozóides de diferentes qualidades, provenientes de uma amostra com parâmetros normais e de outra amostra com alguma infertilidade masculina. Concluíram então que o uso do

sêmen alterado de alguns indivíduos resulta em embriões com anormalidades no desenvolvimento que podem ser detectadas nos primeiros ciclos celulares após fertilização.

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**PRODUÇÃO DE EMBRIÕES HUMANOS ATRAVÉS DA
INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES
OBTIDOS DO EJACULADO, EPIDÍDIMO OU TESTÍCULO**

**Anita Mylius Pimentel, João Francisco Coelho de Oliveira, Rogério
Ferreira, Paulo Bayard Dias Gonçalves**

REVISTA BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2006

Produção de embriões humanos através da injeção intracitoplasmática de espermatozóides obtidos do ejaculado, epidídimo ou testículo

(Production of human embryos with intracytoplasmic injection of sperm from ejaculate, epididymis and testis)

Anita Mylius *Pimentel*¹, João Francisco Coelho de *Oliveira*¹, Rogério *Ferreira*¹, Paulo Bayard
Dias *Gonçalves*^{1,2}

¹ Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.

² Autor para correspondência: (bayard@biorep.ufsm.br)
Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal
Departamento de Clínica de Grandes Animais
Hospital Veterinário
Universidade Federal de Santa Maria
97105-900, Santa Maria, RS, Brasil
Fone e Fax: 55-55-3220-8484

RESUMO

Este estudo retrospectivo avaliou as taxas de fertilização, clivagem e qualidade de embriões humanos obtidos através da injeção intracitoplasmática (ICSI) de espermatozóides provenientes do ejaculado, epidídimo ou testículo. Foram incluídos 398 ciclos de pacientes que apresentaram algum tipo de infertilidade masculina, sendo inseminados 3991 oócitos. Os espermatozóides do epidídimo e do testículo foram recuperados cirurgicamente. As taxas de fertilização e de clivagem com espermatozóides do ejaculado (74,5% e 73%, respectivamente) foram maiores ($P < 0,0001$) do que as do testículo (59,7% e 56,8%, respectivamente) e do epidídimo (61,9% e 59,3%). A produção de embriões viáveis (grau I e II) foi maior ($P = 0,0135$) quando os oócitos foram inseminados com espermatozóides do ejaculado (89,4%), em relação ao epidídimo (82,9%) e testículo (85,7%). As taxas de gestação não foram diferentes entre os grupos (37,8% no grupo EJAC, 27,6% EPID e 36,8% no grupo TEST). Em conclusão, espermatozóides do ejaculado produzem um maior número de embriões viáveis, com maiores taxas de fertilização e de clivagem. Entretanto, quando utilizados espermatozóides do epidídimo e do testículo na ICSI, a produção de embriões viáveis é considerável, obtendo êxito nas técnicas de reprodução assistida.

Palavras-chave: Infertilidade masculina, qualidade embrionária, espermatozóides, ICSI.

ABSTRACT

This retrospective study compared sperm from ejaculate, epididymis and testis on fertilization, cleavage and embryo development rates through intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in humans. A total of 398 cycles of patients that showed some kind of male infertility were included and 3991 oocytes were inseminated. The spermatozoa from epididymis and testis were surgically obtained. Fertilization and cleavage rates with sperm from ejaculated (75% and 73%, respectively) were higher ($P < 0,0001$) than those with sperm from the testis (59,7% e 56,8%, respectively) and from epididymis (61,9% e 59,3%). The production of viable embryos (grade I and II) was higher ($P = 0,0135$) when the oocytes were inseminated with ejaculate sperm in relation to sperm from epididymis and testis. The percentages of pregnancy were not different among groups. In conclusion, sperm from ejaculate will give a higher production of viable embryos. However, when sperm from the testis and epididymis are used in ICSI, the production of viable embryos is also considerable and can be seen as success in the assisted reproduction techniques.

Key words: Male infertility, embryo quality, sperm, ICSI.

INTRODUÇÃO

Ao contrário da reprodução animal, que tem como objetivo o melhoramento genético e o aumento da fertilidade de animais de alto valor comercial, na reprodução humana, o enfoque é a infertilidade ou sub-fertilidade, tanto feminina, quanto masculina.

Nas últimas décadas, avanços na reprodução humana tornaram possível a gravidez de casais considerados inférteis. O nascimento de Louise Brown em 1978 (STEPTOE & EDWARDS, 1978), a primeira criança concebida após fertilização *in vitro* (FIV) e transferência de embrião marcaram o início do progresso no entendimento e tratamento dos problemas relacionados à fertilidade humana. O sucesso dessa técnica ocorreu após vários anos de estudo, onde o modelo de pesquisa sempre foi o animal (PASSOS, 2004).

Originalmente, a FIV seguida da transferência de embriões foi proposta para o tratamento dos casos de infertilidade tubária, ou seja, para pacientes com os ovidutos obstruídos ou ausentes. Mais tarde a técnica passou a ter outras indicações, onde foi possível resolver de forma eficiente um grande número de transtornos de origem feminina. Entretanto, os homens acometidos de fator masculino severo, criptozoospermia, espermatozóides sem poder fertilizante, epidídimo obstruído ou falência testicular não tinham qualquer chance de gravidez (IRVINE, 1998). Com isso, os casos de infertilidade masculina ainda não podiam ser resolvidos, pois mesmo a FIV ainda necessitava de um grande número de espermatozóides (100 mil/oócito) com boa motilidade para fertilizar um único oócito.

Um marco importante no avanço das técnicas de reprodução assistida ocorreu em 1992, quando PALERMO et al. (1992) descreveram a técnica da injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), a qual revolucionou o tratamento da infertilidade masculina. A ICSI é hoje a técnica mais empregada nos casos em que existem graves alterações nos parâmetros

seminais. O único critério para a realização da ICSI é a presença de apenas um espermatozóide vivo na amostra seminal.

Com a introdução da ICSI, o uso de espermatozóides do epidídimo (TOURNAYE et al., 1994) tem permitido o tratamento da infertilidade masculina por azoospermia obstrutiva. A recuperação de espermatozóides do epidídimo ocorre por aspiração percutânea, PESA (*percutaneous epididymal sperm aspiration*), neste procedimento geralmente se obtém um número considerável de espermatozóides e esses são fáceis de manipular (SILBER et al., 1995, DEVROEY, et al., 1995). Entretanto, em casos de azoospermia não-obstrutiva e parada da maturação, só se encontram espermatozóides no testículo.

Pacientes com azoospermia não-obstrutiva apresentaram resultados satisfatórios associando a recuperação de espermatozóides do testículo (TESA - *testicular sperm aspiration*) com a ICSI (DEVROEY et al., 1994). Essa técnica também é utilizada em casos de deficiência na espermatogênese (TOURNAYE et al., 1996). Espermatozóides presentes no testículo estão completando a espermatogênese e aqueles presentes no epidídimo estão passando pela maturação e aquisição de fatores decapacitantes (ZANEVELD et al., 1991; COOPER & YEUNG, 1997). Quando são recuperados cirurgicamente, alguns desses espermatozóides apresentam-se imaturos, alguns com motilidade, outros totalmente imóveis, dificultando a escolha para a ICSI.

O sucesso na FIV e ICSI depende da obtenção de embriões capazes de se implantarem e desenvolver uma gestação normal. As características mais importantes a serem avaliadas no embrião são a extensão e forma da fragmentação; forma e tamanho dos blastômeros e o número de células em estádios precoces de desenvolvimento (ZIEBE et al., 1997). Quando ALIKANI et al. (1999) transferiram apenas embriões grau IV, com muita fragmentação, as taxas de

implantação foram significativamente mais baixas que embriões de outros padrões. Entretanto, quando os fragmentos eram pequenos e espalhados entre as células e o espaço perivitelino, o posterior desenvolvimento embrionário não era comprometido.

TESARIK et al. (2002) observaram o desenvolvimento embrionário utilizando oócitos de doadora/receptora que foram fecundados com espermatozóides de diferentes qualidades, provenientes de uma amostra com parâmetros normais e de outra amostra com alguma infertilidade masculina. Concluíram que o uso do sêmen alterado de alguns indivíduos resulta em embriões com anormalidades no desenvolvimento que podem ser detectadas nos primeiros ciclos celulares após fertilização.

O objetivo deste trabalho foi o de investigar, na infertilidade masculina, se existem diferenças nas taxas de fertilização, clivagem e no número de embriões viáveis (graus I e II) para transferência embrionária ou congelamento, a partir da ICSI com espermatozóides provenientes do ejaculado, do epidídimo ou do testículo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este foi um estudo retrospectivo, realizado com casais que se submeteram ao procedimento de injeção intracitoplasmática de espermatozóides numa clínica de reprodução humana, no Rio Grande do Sul, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2004. Foram considerados apenas casais que apresentaram fatores masculinos de infertilidade, tanto relacionados ao próprio ejaculado, como aqueles que foram submetidos à retirada de espermatozóides do epidídimo ou do testículo. Foram excluídos casais que apresentaram fatores femininos de infertilidade que pudessem ter influência na qualidade e desenvolvimento embrionário.

Foram considerados pacientes cujo ejaculado tenha apresentado alterações como oligospermia severa (<2-10 milhões de espermatozóides/ml), astenozoospermia severa (<5-10% espermatozóides móveis), morfologia muito alterada (<4% formas normais) e espermatozóides recuperados cirurgicamente. Os dados foram divididos em 3 grupos conforme a origem dos espermatozóides: EJAC (espermatozóides do ejaculado), EPID (espermatozóides do epidídimo) e TEST (espermatozóides do testículo).

A amostra seminal do ejaculado foi obtida através de masturbação, enviada imediatamente ao laboratório. O processamento de sêmen utilizado foi o do gradiente de densidade (puresperm – Vitrolife®), com 1ml de 90% na porção inferior e 1ml de 50%, menos denso, sobre este. O sêmen foi depositado sobre o conjunto. Centrifugou-se o conjunto a 300g por 25 minutos, para separar os espermatozóides do plasma seminal, de outros elementos celulares e de debris. Obteve-se, no fundo do tubo, um sedimento contendo a fração de espermatozóides móveis. Esse foi diluído em 2ml de HTF hepes (Irvine Scientific®). Nova centrifugação foi realizada para eliminar partículas residuais do gradiente. O sedimento resultante contendo a subpopulação de espermatozóides móveis foi ressuspenso em HTF com 7,5% de SSS (soro sintético substituto – Irvine Scientific®) e armazenados a 37°C até o momento da fertilização.

Nos casos de azoospermia obstrutiva foi feita punção da cauda do epidídimo primeiramente. O bloqueio anestésico do cordão espermático foi realizado com xilocaína 1% e o epidídimo puncionado com seringa de 1ml e agulha 27G contendo PBS (*phosphate buffer solution*, Irvine Scientific®). No laboratório, foi feita procura e identificação dos espermatozóides com o auxílio de um microscópio invertido. Quando encontrados espermatozóides, o material foi lavado com solução PBS e armazenado a 37°C. Quando nenhum

espermatozóide foi encontrado, ou em casos de azoospermia não-obstrutiva, realizava-se a punção testicular. Da mesma maneira, foi feito bloqueio anestésico do cordão espermático e anestesia da pele no local da punção. O testículo foi aspirado com agulha 40 x 12 e seringa de 20ml contendo PBS, foram feitos movimentos de vai e vem em várias direções. O material foi analisado no laboratório, não sendo encontrado nenhum espermatozóide, foi realizada uma biópsia aberta do testículo. O material da biópsia foi macerado com o auxílio de duas lâminas de bisturi nº 24, e “ordenhado” para liberação dos espermatozóides dos túbulos seminíferos. O material foi analisado com o auxílio do microscópio e armazenado em tubos de 5ml a 37°C.

As pacientes foram submetidas a estimulação ovariana com gonadotrofina humana menopausada (HMG – Lupron, Serono®) seguida de regulação da pituitária com análogos do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH – Gonal, Serono®). A maturação final dos oócitos foi feita com gonadotrofina coriônica humana (hCG – Ovidrel, Serono®) quando os maiores folículos atingiam em torno de 21mm de diâmetro. Os complexos *cumulus*-oócitos (CCO) foram recuperados por aspiração com uma agulha (CCD®) acoplada a um guia de ultrassom transvaginal 36h após a administração do hCG. Após punção de todos os folículos e a recuperação dos CCO, estes foram lavados em meio HTF (*human tubal fluid* – Irvine Scientific®) suplementado com 7,5% de SSS e incubados na estufa a 37°C contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada durante 4 a 6 horas. Essa incubação era feita para facilitar a maturação citoplasmática e nuclear final antes de ser realizada a ICSI. Minutos antes da inseminação, as células do *cumulus* dos oócitos foram retiradas com a incubação dos CCO em HTF com hialuronidase a 1% (Hyase - Vitrolife®) por 30 segundos. Após este período as células foram retiradas pipetando-se os oócitos várias vezes com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* com diâmetro próximo ao do oócito. Os oócitos desnudos foram avaliados quanto à presença do

primeiro corpúsculo polar, indicando estar em estágio de metáfase II. As pipetas de injeção e as utilizadas para segurar o oócito foram adquiridas comercialmente (Cook®). O procedimento de ICSI foi realizado em um microscópio invertido com contraste de Hoffman, micromanipuladores e placa aquecida acoplados. Em uma das gotas de HTF hepes com 20% de SSS presentes na placa contendo os oócitos, foram adicionados polivinilpirrolidona (solução densa que facilita a escolha e a imobilização dos espermatozóides, ICSI 100 - Vitrolife®) e sêmen do ejaculado preparado, ou então, quando foi utilizado sêmen do epidídimo ou do testículo, foram feitas gotas maiores para colocar os espermatozóides diretamente. Um espermatozóide foi escolhido e imobilizado pela pipeta de injeção com um golpe na cauda causando sua imobilização. O oócito foi posicionado com o corpúsculo polar às 6 ou às 12h para não causar lesão dos cromossomos. O espermatozóide foi injetado no oócito e o ooplasma foi aspirado e injetado novamente para causar a ativação do oócito. Após os oócitos foram incubados na estufa de CO₂. Quando foram utilizados espermatozóides do epidídimo ou do testículo, estes foram encontrados nas gotas maiores, levados até a gota contendo ICSI 100, adotando-se o mesmo procedimento dos espermatozóides do ejaculado.

Dezoito horas após a ICSI, os pré-embriões foram avaliados quanto à fertilização normal (presença de 2 pronúcleos). Os que apresentavam este aspecto foram transferidos para uma placa contendo HTF com 15% de SSS, cobertas por óleo mineral (Ovoil - Vitrolife®). Vinte e quatro (dia 2 – D2) e 48h (D3) após checagem dos pronúcleos, os embriões foram novamente avaliados. D2 foram avaliados clivagem e qualidade embrionária, assim como grau de fragmentação; D3 também foram avaliados o desenvolvimento embrionário e presença de fragmentação. Embriões sem fragmentação e com 4 células no D2, foram considerados grau I.; com 2 células ou mais e com 5 a 20% de fragmentação, foram considerados grau II; de 25 a

40% de fragmentação, grau III; e com mais de 40% de fragmentação, grau IV. No D3, os embriões deveriam estar com 6 a 8 células e a porcentagem de fragmentação foi avaliada nas mesmas proporções. Foram feitas avaliações diárias para acompanhar o desenvolvimento embrionário. Para análise dos dados, os embriões graus I e II foram agrupados sendo chamados de embriões viáveis.

A transferência embrionária era realizada no D3. Os embriões foram avaliados como descrito anteriormente e, se disponível, 3 a 4 embriões eram transferidos, mesmo que não fossem considerados viáveis. Os embriões viáveis excedentes foram congelados. Os selecionados para a transferência foram colocados em uma placa contendo meio HTF suplementado com 50% de SSS. Os embriões foram aspirados com o cateter de transferência e o médico fazia a colocação destes no útero com controle ultrasonográfico. Quatorze dias após a transferência, as pacientes realizavam o exame do β -hCG, para verificação de implantação embrionária e diagnóstico de gestação.

Análise Estatística:

Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA em um modelo estatístico para dados categóricos, utilizando o PROC CATMOD (CATEGORICAL DATA ANALYSIS PROCEDURES) no programa estatístico SAS. Quando foram detectadas diferenças estatísticas, as variáveis independentes foram comparadas pelo teste de contraste no referido programa estatístico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo foram analisados 398 ciclos de ICSI, onde 4204 oócitos estavam em metáfase II (MII), com a presença do primeiro corpúsculo polar. Foram utilizados 3991 oócitos

para ICSI e o restante foi congelado para posterior uso, conforme opção do casal. Os dados estão resumidos na Tabela 1, mostrando as taxas de fertilização e clivagem dos diferentes grupos. A média das idades dos pacientes foi de 43 anos (25-69 anos) para os homens e 35 (22-47 anos) para as mulheres.

A taxa de fertilização, considerada pela presença de 2 pronúcleos 18h após a injeção dos oócitos, foi maior quando se utilizou espermatozóides do ejaculado ($P < 0,0001$), ao invés dos espermatozóides provenientes do epidídimo ou do testículo (Tabela 1), assim como a clivagem, concordando com os resultados obtidos em outros experimentos (NAGY, et al., 1995; ABOULGHAR, et al., 1997; GHAZZAWI, et al., 1998; BALABAN, et al., 2001). Isso pode ocorrer pelo fato dos espermatozóides do ejaculado, mesmo em pacientes com número e/ou motilidade abaixo do normal, estarem maduros. Por outro lado, espermatozóides recuperados do epidídimo de porções que não sejam a cauda epididimária, estão maturando, adquirindo motilidade e os do testículo, liberados na luz dos túbulos seminíferos, terminando a espermatogênese (DEVROEY, et al., 1994; NAGY, et al., 1995). O próprio procedimento de ICSI se torna mais demorado quando se utilizam espermatozóides recuperados cirurgicamente. Além do número reduzido, deve-se ter paciência para encontrar espermatozóides que sejam morfolologicamente normais e que tenham alguma motilidade ou flexibilidade indicando que estes estão vivos (SOARES, et al., 2003). Para a ICSI, é a vitalidade do espermatozóide que importa, e não a motilidade (SILBER, et al., 1995).

As taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário podem sofrer influência paterna, do grau de maturação do espermatozóide, demonstrada pelas menores taxas quando utilizados espermatozóides recuperados cirurgicamente, concordando com BALABAN, et al.

(2001) que observou essa influência desfavorável em homens com desordens importantes na espermatogênese.

A produção de embriões viáveis (graus I e II), foi significativamente superior quando se realizou a ICSI com espermatozóides do ejaculado ($P = 0,0135$). Embriões com qualidade superior apresentam melhores taxas de implantação e são os que sobrevivem aos processos de congelamento e descongelamento (ALIKANI, et al., 1999; ZIEBE et al., 1997). Entretanto, pode-se observar (Figura 1) que embriões viáveis produzidos pelas técnicas de micromanipulação como a ICSI, com a utilização de espermatozóides do epidídimo e do testículo apresentam taxas aceitáveis, demonstrando que é possível se obter bons embriões com espermatozóides que não completaram seu desenvolvimento.

As taxas de gestação foram semelhantes entre os grupos (37,8% no grupo EJAC, 27,6% EPID e 36,8% no grupo TEST), fato observado em outros experimentos (NAGY, et al., 1995; ABOULGHAR, et al., 1997; BALABAN, et al., 2001). Contudo nos casos relatados por GHZZAWI, et al. (1998), apesar de haver taxas similares de gestação, os nascimentos por número de embriões transferidos foram reduzidos significativamente no grupo onde utilizaram espermatozóides do testículo. Isso pode gerar dúvidas a respeito da competência do desenvolvimento embrionário nesses pacientes. Neste estudo, não foi possível avaliar as taxas de gestação com embriões viáveis ou não porque na maior parte dos procedimentos, pelo menos um embrião grau III ou IV foi transferido junto com embriões graus I e II.

Concluindo, a origem espermática no processo de ICSI interfere na produção embrionária. Quando utilizados espermatozóides do ejaculado, obtiveram-se índices superiores de fertilização, clivagem e produção de embriões viáveis. No entanto, a utilização de

espermatozóides oriundos do epidídimo e do testículo, embora com índices inferiores aos do ejaculado, permite resultados aceitáveis na ICSI, sendo considerável a produção de embriões viáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOULGHAR M.A. et al. Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculate semen and surgically retrieved sperm. **Fertility and Sterility**, v.68, p.108-111, 1997.

ALIKANI, M., et al. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. **Fertility and Sterility**, v.71, p.836-842, 1999.

BALABAN, B., et al. Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated, epididymal or testicular spermatozoa. **Human Reproduction**, v.16, p.125-129, 2001.

COOPER, T.G. & YEUNG, C.H. Physiology of Sperm Maturation and Fertilization. In: NIESCHLAG, E.; BEHRE, H.M. **Andrology – Male Reproduction Health and Dysfunction**. Germany : Springer, 1997. Cap.4, p.61-78.

DEVROEY, P., et al. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. **Fertility and Sterility**, v.62, p.639-641, 1994.

DEVROEY, P., et al. Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa. **Human Reproduction**, v.10, p.903-906, 1995.

GHAZZAWI, I.M. et al. Comparison of fertilizing capability of spermatozoa from ejaculates, epididymal aspirates and testicular biopsies using intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v.13, p.348-352, 1998.

IRVINE, D.S. Epidemiology and aetiology of male infertility. **Human Reproduction**, v.13, (suppl.1), p.33-44, 1998.

NAGY, Z., et al. Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. **Fertility and Sterility**, v.63, p.808-815, 1995.

PALERMO, G. et al. Pregnancy after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. **Lancet**, v.304, p.17-18, 1992.

PASSOS, E.P. History of assisted reproduction: lessons learnt and future challenges. **Reviews in Gynaecological Practice**, v.4, p.199-202, 2004.

SILBER, S.J., et al. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. **Human Reproduction**, v.10, p.2031-2043, 1995.

SOARES, J.B. et al. Sperm tail flexibility test: a simple test for selecting viable spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection from semen samples without motile spermatozoa. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo**, v.58, p.250-253, 2003.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo. **Lancet**, v.2, p.366, 1978.

TESARIK, J.; MENDOZA, C.; GRECO, E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. **Human Reproduction**, v. 17, p. 184-189, 2002.

TOURNAYE, H. et al. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. **Fertility and Sterility**, v.61, p. 1045-1050, 1994.

TOURNAYE, H. et al. Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. **Human Reproduction**, v.11, p. 127-132, 1996.

ZANEVELD, L.J.D. et al. Human sperm capacitation and the acrossome reaction. **Human Reproduction**, v.9. p. 1265-1274, 1991.

ZIEBE, S., et al. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryo for transfer after in vitro fertilization. **Human Reproduction**, v. 12, p. 1545-1549, 1997.

Tabela 1. Taxas de fertilização e de clivagem obtidas de oócitos fecundados pela ICSI com espermatozóides do ejaculado, epidídimo ou testículo.

Grupos	Oócitos Inseminados	Fertilização	Clivagem
	n	n (%)	n (%)
EJAC	2466	1837 (74,5) ^a	1801 (73,0) ^a
EPID	826	511 (61,9) ^b	490 (59,3) ^b
TEST	699	417 (59,7) ^b	397 (56,8) ^b

EJAC: espermatozóides do ejaculado; EPID: espermatozóides do epidídimo; TEST: espermatozóides do testículo. Valores sobrescritos com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($P < 0,0001$).

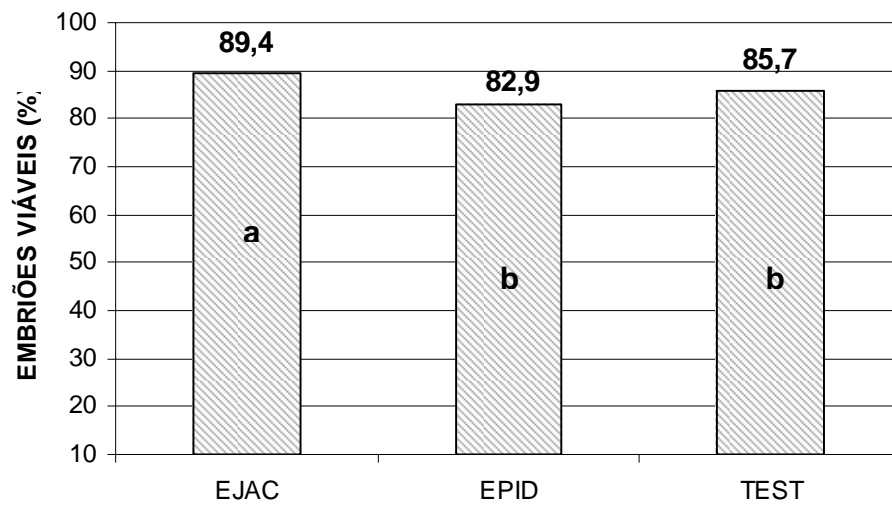


Figura 1. Produção de embriões viáveis (graus I e II) com ICSI utilizando espermatozóides do ejaculado (EJAC), do epidídimo (EPID) e do testículo (TEST). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,02$).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOULGHAR, M.A. et al. Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculate semen and surgically retrieved sperm. **Fertility and Sterility**, v.68, p.108-111, 1997.

ABUZEID, M.I., et al. Fertilization and pregnancy achieved by intracytoplasmic injection of sperm retrieved from testicular biopsies. **Fertility and Sterility**, v.64, p.644-646, 1995.

AIKTEN, R.J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: a balance of benefit and risk. **Bioessays**, v.16, p.259-267, 1994.

ALIKANI, M., et al. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. **Fertility and Sterility**, v. 71, p. 836-842, 1999.

BALABAN, B., et al. Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated, epididymal or testicular spermatozoa. **Human Reproduction**, v.16, p.125-129, 2001.

COOPER, T.G. In defense of the human epididymis. **Fertility and Sterility**, v.54, p.965-975, 1990.

COOPER, T.G. & YEUNG, C.H. Physiology of Sperm Maturation and Fertilization. In: NIESCHLAG, E.; BEHRE, H.M. **Andrology – Male Reproduction Health and Dysfunction**. Germany : Springer, 1997, p. 61-78.

COSKUN, S., et al. Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. **Human Reproduction**, v. 15, p. 1947-1952, 2000.

CRAFT, I., et al. Fertilizing ability of testicular spermatozoa. **Lancet**, v.342, p.864-864, 1993.

DE CROO, I., et al. Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia. **Human Reproduction**, v.15, p.1383-1388, 2000.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperms anoxonemes. **International Journal of Andrology**, v.13, p.368-378, 1992.

DESAI, N., et al. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. **Human Reproduction**, v. 15, p. 2190-2196, 2000.

DEVROEY, P., et al. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. **Fertility and Sterility**, v.62, p.639-641, 1994.

DEVROEY, P., et al. Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa. **Human Reproduction**, v.10, p.903-906, 1995.

DEVROEY, P., et al. Outcome of intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in obstructive and non-obstructive azoospermia. **Human Reproduction**, v.11, p.1015-1018, 1996.

DOZORSTEV, D., et al. Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. **Human Reproduction**, v. 10, p. 403-407, 1995.

DOZORTSEV, D., et al. The impact of cellular fragmentation induced experimentally at different stages of preimplantation. **Human Reproduction**, v.13, p. 1307-1311, 1998.

DUBEY, A., et al. Failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection: the extent of paternal and maternal chromatin decondensation. **Fertility and Sterility**, v.68, p.714-717, 1997.

FAHMY, I., et al. Intracytoplasmic sperm injection using surgically retrieved epididymal and testicular spermatozoa in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia. **International Journal of Andrology**, v.20, p.37-44, 1997.

GERRIS, J., et al. ICSI and severe male-factor infertility: breaking the sperm tail prior to injection. **Human Reproduction**, v.10, p.484-486, 1995.

GHAZZAWI, I.M. et al. Comparison of fertilizing capability of spermatozoa from ejaculates, epididymal aspirates and testicular biopsies using intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v.13, p.348-352, 1998.

GOLAN, R. et al. Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. **Human Reproduction**, v.11, p.1457-1462, 1996.

IAMMARRONE, E. et al. Male infertility. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v.17, p.211-229, 2003.

IRITANI, A. Micromanipulation of gametes for in vitro assisted fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v.28, p.199-207, 1991.

IRVINE, D.S. Epidemiology and aetiology of male infertility. **Human Reproduction**, v.13, (suppl.1), p.33-44, 1998.

JURISICOVA, A.; VARMUZA, S.; CASPER, R.F. Programmed cell death and human embryo fragmentation. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, p. 93-98, 1996.

KAHRAMAN, S. et al. High implantation rates and pregnancy rates with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia. **Human Reproduction**, v.11, p.673-676, 1996.

KAHRAMAN, S., et al. Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. **Human Reproduction**, v. 17, p. 3193-3200, 2002.

KHORRAM, O. et al. Reproductive technologies for male infertility. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, p.2373-2379, 2001.

MANICARDI, G.C., et al. Under protamination and nicking of DNA in ejaculated human spermatozoa are highly related phenomena. **Biology of Reproduction**, v.52, p.864-867, 1995.

MANSOUR, R.T., et al. Intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia. **Human Reproduction**, v.12, p. 1974-1979, 1997.

MENIRU, G.I. et al. Studies of percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) and intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction Update**, v.4, p.57-71, 1998.

MOORE, H.D.M. & AKHONDI, M.A. In vitro maturation of mammalian spermatozoa. **Reviews of Reproduction**, v.1, p.54-60, 1996.

MUNNÉ, S., et al. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. **Fertility and Sterility**, v. 64, p. 386-391, 1995.

NAGY, Z., et al. Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. **Fertility and Sterility**, v.63, p.808-815, 1995.

PALERMO, G. et al. Pregnancy after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. **Lancet**, v.304, p.17-18, 1992.

PALERMO, G., et al. Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. **Human Reproduction**, v.11, p.1023-1029, 1996.

PALERMO, G.; COLOMBERO, L.T.; ROSENWAKS, Z. The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 19-27, 1997.

PALERMO, G., et al. Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. **Human Reproduction**, v.3, p.741-748, 1999.

PASQUALOTTO, F.F. et al. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. **Urology**, v.55, p.881-885, 2000.

PASSOS, E.P. History of assisted reproduction: lessons learnt and future challenges. **Reviews in Gynaecological Practice**, v.4, p.199-202, 2004.

ROSENLUND, B. et al. Sperm retrieval and fertilization in repeated percutaneous epididymal sperm aspiration. **Human Reproduction**, v.13, p.2805-2807, 1998.

SAKKAS, D. et al., Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v.11, p.837-843, 1996.

SAKKAS, D. et al., Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. **Human Reproduction**, v.13 (Suppl. 4), p.11-19, 1998.

SATHANANTHAN, A.H., et al. The sperm centriole: its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos. **Human Reproduction**, v. 11, p. 345-356, 1996.

SCHATTEN, G. The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 165, p. 299-335, 1994.

SILBER, S.J., et al. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. **Human Reproduction**, v.9, p.1705-1709, 1994.

SILBER, S.J., et al. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. **Human Reproduction**, v.10, p.2031-2043, 1995.

SOARES, J.B. et al. Sperm tail flexibility test: a simple test for selecting viable spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection from semen samples without motile spermatozoa. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo**, v.58, p.250-253, 2003.

SPIRA, A.; MULTIGNER, L. The effect of industrial and agricultural pollution on human spermatogenesis. **Human Reproduction**, v.13, p.2041-2042, 1998.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo. **Lancet**, v.2, p.366, 1978.

TAKEUCHI, T. et al. Does ICSI require acrosomal disruption? An ultrastructural study. **Human Reproduction**, v.19, p.114-117, 2004.

TESARIK, J.; MENDOZA, C.; GRECO, E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. **Human Reproduction**, v. 17, p. 184-189, 2002.

TOURNAYE, H. et al. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. **Fertility and Sterility**, v.61, p. 1045-1050, 1994.

TOURNAYE, H. et al. Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. **Human Reproduction**, v.11, p. 127-132, 1996.

TSIRIGOTIS, M.; CRAFT, I. Sperm retrieval methods and ICSI for obstructive azoospermia. **Human Reproduction**, v.10, p.758-760, 1995.

VAN BLERKOM, J., et al. Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation development in the human. **Human Reproduction Update**, v.1, p. 429-424, 1995.

VAN STEIRTEGHEM, A., et al. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. **Human Reproduction**, v.8, p.1055-1060, 1993.

ZANEVELD, L.J.D. et al. Human sperm capacitation and the acrossome reaction. **Human Reproduction**, v.9. p. 1265-1274, 1991.

ZIEBE, S., et al. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryo for transfer after in vitro fertilization. **Human Reproduction**, v. 12, p. 1545-1549, 1997.