

MARIA CRISTINA SANTORO BIAZOTTI

**INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS
DO SÊMEN E OÓCITOS SOBRE A
FERTILIZAÇÃO *in vitro* EM HUMANOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Medicina, área
de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de Mestre
em Tocoginecologia

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS BAHAMONDES

**UNICAMP
1999**

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Aluno: Maria Cristina Santoro Biazotti

Orientador: Luis Guillermo Bahamondes

Membros:

1.

2.

3.

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

Data: 18/11/99

À minha mãe Hermínia, eterna luz do meu caminho.

Ao meu pai Gabriel, o meu maior sentimento de amor e gratidão.

*Aos meus irmãos, Luiz, Laerte, Lineu, Lorival, Mauro,
heróis da minha infância e exemplos para o meu futuro.*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Guilherme Bahamondes, pelos seus conselhos experientes e marcantes contribuições neste meu processo de aprendiz de mestre.

Aos meus amigos franceses, Dr. Patrick Bastit e biólogas Patrícia Brulin e Simone Genty, por facilitarem minha trajetória na área de Reprodução Humana, em uma época em que tudo ainda era muito obscuro. À eles, minha eterna gratidão.

À Prof^a Dr^a Lúcia Helena Simões da Costa Paiva, pelas qualidades humanas, pelos bons exemplos científicos e profissionais e por ter participado da Banca do Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. José Guilherme Cecatti, pela brilhante e generosa atenção dedicada a este trabalho e por ter aceito participar da Banca do Exame de Qualificação.

À Prof^a Dr^a Sophie Françoise Mauricette Derchain, amiga e conselheira, pelas valiosas sugestões e por participar da Banca do Exame de Qualificação.

À Prof^a Dr^a Cecília Amélia Fazzio Escanhoela, fiel amiga, por ter sido a responsável pela minha presença, hoje, nesta Universidade.

Ao Prof. Dr. João Luiz Pinto e Silva, pela generosa atenção e apoio dispensados desde que aqui cheguei, há vários anos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Lane, cuja sabedoria e simplicidade marcaram a minha trajetória.

Ao Edson Zangiacomi Martinez e Eliane Guelli, brilhantes profissionais, pelos preciosos ensinamentos e exaustiva manipulação técnica dos dados.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação, pelos ensinamentos metodológicos que me transmitiram e que para sempre utilizarei.

Ao professores doutores Aarão Mendes Pinto Neto, Adriana Orcesi Pedro, Aloísio José Bedone, José Antônio Simões, Paulo César Giraldo, Ulisses Moraes de Oliveira, Viviane Herrmann pelo carinho, amizade e ensinamentos construtivos.

À Prof^{ta} Dr^a Cristina Laguna Benetti Pinto, pelo jeito carinhoso de ser e interesse sincero na concretização deste trabalho.

À Dr^a Mônica de Oliveira Jorge, fiel companheira, pelo carinho e amizade sincera.

Aos funcionários do Departamento de Tocoginecologia, em especial Margarete Amado Donadon e Neusa Bonfante, pelo carinho que recebi durante todo o Curso de Pós-Graduação.

A toda a Assessoria Técnica do CAISM: Maria do Rosário Zullo, William Alexandre de Oliveira, Nader Piagentini do Prado, Cylene Camargo, Fernanda Atibaia, Sueli Regina Teixeira e Marisa Damasceno, pela excelente atividade de apoio técnico.

A Isabel Gardenal, afetuosa e dedicada, pelo carinho de sempre.

Aos biólogos e funcionários do Laboratório de Genética da Reprodução do CAISM-UNICAMP: Mara A. de Lúcio, Fátima A. Bottcher Luiz, Gláucia B. F. Lorenzetti, Francisco A. P. Fazano e Nicéia L. Marroni, pela colaboração prestada na realização deste trabalho.

À Sueli Chaves, amiga de todas as horas, pela dedicação e carinho dispensados durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Daniela de Lima e Montes Castanho, pelo carinho dos bons momentos e pelos ideais comuns.

À Deirdre Jane Donovan Giraldo, professora exemplar e dedicada, pelos bons ensinamentos na língua inglesa e valiosa contribuição nesta tese.

À Vera Lúgia de Souza Ferreira Leite, pela grandeza de caráter, disponibilidade e constante colaboração em muitas etapas da minha vida.

À bióloga Ingridi de Souza Sene, por participar direta ou indiretamente da minha vida e a finalização deste estudo.

Às enfermeiras e funcionárias do CEMICAMP pela afetuosa atenção que me foi dispensada.

Aos casais participantes do programa de FIV, CAISM – UNICAMP, sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

À Maria de Lourdes Manoel dos Santos, pela presença diária e marcante de seu sorriso afetuoso.

A todos os amigos e funcionários que de alguma forma contribuíram para a finalização deste estudo.

*“A Ciência não para e a Ciência não vai parar,
resta a nós, seres pensantes, aliarmos o rigor
da Ciência a razão reta do agir, ao bom senso
e ao equilíbrio, para que o progresso no saber
seja posto a serviço do bem viver”*

(Cristina Biazotti)

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Resumo

1. Introdução	1
1.1. Indicações da Fertilização in vitro	4
1.1.1. Fator Tubário.....	4
1.1.2. Endometriose	5
1.1.3. Fator Masculino.....	6
1.1.4. Infertilidade sem Causa Aparente.....	10
1.1.5. Fator Imunológico	11
1.2. Fertilização in vitro	12
1.2.1. Indução da Ovulação.....	13
1.2.2. Técnica de FIV.....	14
1.3. Fator Masculino e FIV	27
1.3.1. Fatores que Podem Alterar as Características do Sêmen.....	29
1.3.2. Avaliação Clínica e Laboratorial	31
1.3.3. Capacitação e Fecundação.....	32
1.3.4. Potencial Espermático de Fertilidade.....	33
2. Objetivos	37
2.1. Objetivo Geral.....	37
2.2. Objetivos Específicos.....	37
3. Casuística e Métodos.....	39
3.1. Desenho do Estudo.....	39
3.2. Tamanho Amostral	39
3.3. Seleção dos Sujeitos.....	40
3.4. Critérios de Inclusão	40
3.5. Critérios de Exclusão	41
3.6. Variáveis.....	41
3.6.1. Variáveis Independentes	41
3.6.2. Variáveis Dependentes.....	42
3.7. Coleta das Amostras de Gametas	43
3.8. Processamento das Amostras	43
3.9. Processamento dos Dados.....	48
3.10. Análise dos Dados.....	48
3.11. Aspectos Éticos	49
4. Resultados	51
5. Discussão	63
6. Conclusões	79
7. Summary.....	81
8. Referências Bibliográficas	83
9. Bibliografia de Normatização.....	103
10. Anexos	105

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

ALH	Amplitude de batimento da cabeça
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
Conc. Leuc.	Concentração de leucócitos no sêmen (milhões/ml)
Conc. Rec.	Concentração espermatozóides recuperados (milhões/1000 microlitros)
Concentr	Concentração inicial de espermatozóides (milhões/ml)
EUA	Estados Unidos da América
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
Óvulos	Número de óvulos maduros
% mot_A	% de espermatozóides móveis do grau A
% mot_B	% de espermatozóides móveis do grau B
% mot_C	% de espermatozóides móveis do grau C
% vivos	% de espermatozóides vivos
% normais	% de espermatozóides normais
% imaturos	% de espermatozóides imaturos
% maduros	% de espermatozóides maduros

% spz MI ST	% de espermatozóides com membrana íntegra (teste hiposmótico)
% spz MI A	% de espermatozóides com membrana íntegra (teste c/ água dest.)
% spz MI	% de espermatozóides com membrana íntegra (ST + A)
% rec. A	% de espermatozóides recuperados do grau A
nº spz/oócito	Número de espermatozóides inseminados por oócito
µl/oócito	Número de microlitros utilizados na inseminação do oócito
PROFERT	Programa de Fertilização Assistida
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade retilínea

Resumo

Este foi um estudo clínico descritivo, que teve como objetivo avaliar a influência de determinadas variáveis, entre elas alguns parâmetros espermáticos e o número de óvulos maduros, sobre a fertilização *in vitro* em humanos. Analisaram-se 98 amostras de sêmen e 678 oócitos de casais atendidos no Ambulatório de Esterilidade Conjugal do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. A avaliação dos gametas e a técnica de fertilização *in vitro* foram realizadas no Laboratório de Genética da Reprodução do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher. Para análise dos dados, consideraram-se como variáveis independentes a concentração de espermatozóides no sêmen fresco, a porcentagem de espermatozóides móveis, vivos, normais, maduros e aqueles com membrana íntegra, a concentração de leucócitos no sêmen, a concentração de espermatozóides e a porcentagem de espermatozóides progressivos rápidos recuperados após capacitação espermática, o número de microlitros utilizados na inseminação do oócito e o número de óvulos maduros utilizados no processo de fertilização *in vitro*. A variável dependente foi a

ocorrência ou não de fertilização do oócito *in vitro* e a taxa de fertilização *in vitro*. Para avaliação estatística utilizou-se a análise de regressão logística univariada, seguida desta mesma técnica baseando-se em modelos múltiplos. Constatou-se que as variáveis de maior influência na fertilização do oócito *in vitro* foram: a motilidade grau A e o número de óvulos maduros. Outras variáveis espermáticas que tiveram influência na fertilização do oócito *in vitro* foram: a concentração espermática inicial; a porcentagem de espermatozóides vivos; a porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais; a porcentagem de espermatozóides maduros. O número de microlitros utilizados para a inseminação do oócito teve influência negativa sobre a fertilização do oócito *in vitro*. A taxa de fertilização *in vitro* aumentou significativamente quando a porcentagem de espermatozóides normais foi superior a 14%, a motilidade grau A superior a 30% e a concentração espermática maior que 20 milhões por mililitro de sêmen fresco. Dados obtidos através da curva ROC demonstraram que o ponto de corte para porcentagem de espermatozóides com motilidade do grau A, foi ≥ 30 , cujos valores de sensibilidade e especificidade foram respectivamente de 65,2% e 65,5%. Baseando-se nestes valores, estima-se que o *odds* de ocorrer a fertilização, quando a porcentagem de espermatozóides móveis do grau A for superior a 30%, é de 1,89.

1. Introdução

Atribui-se a SCHENK a primeira tentativa de fertilizar *in vitro* um óvulo de mamífero, porém sem êxito (SCHENK¹, 1880). Quase 100 anos após, STEPTOE & EDWARDS (1978) finalmente obtiveram sucesso durante o tratamento de uma mulher com esterilidade por fator tubário, permitindo o nascimento de Louise Brown, em Cambridge, no Reino Unido.

Durante este período de 100 anos, muitos pesquisadores contribuíram na tentativa de elucidar os mistérios da reprodução humana. Em 1891, HEAPE demonstrou que ovos de coelha, fertilizados, poderiam ser recuperados da trompa de Falópio e transferidos para uma mãe receptora. HEAPE (1891) buscava avaliar a importância do ambiente materno e da herança genética. Esta pesquisa foi de grande valia para o desenvolvimento das técnicas de fertilização *in vitro* (FIV), como se conhecem atualmente.

¹ SCHENK, 1880 apud MENKIN, M.F. & ROCK, J. – “*In vitro*” fertilization and cleavage of human ovarian eggs. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 55:440-51, 1948

Em 1930, PINCUS publicou uma descrição de seus primeiros experimentos de fertilização *in vitro* em coelhas. Foram tentativas sem sucesso, pois nenhum óvulo exposto a espermatozóides e, posteriormente, transferido para dentro da trompa, resultou em concepção.

PINCUS & ENZMANN (1934) realizaram novamente o processo de fertilização *in vitro* em coelhas, acreditando terem obtido êxito; porém, sabe-se hoje que os óvulos transferidos não haviam sido fertilizados *in vitro* e sim, provavelmente, na trompa de Falópio da receptora; procedimento este, atualmente, chamado de GIFT (Gamete intra-fallopian transfer) (ASCH et al., 1986).

MENKIN & ROCK (1948) obtiveram mais de 800 óvulos de mulheres, durante diversos procedimentos cirúrgicos. Cerca de 138 destes gametas foram expostos a espermatozóides *in vitro*. Eles acreditaram ter observado clivagem em três óvulos, porém nenhuma transferência foi realizada e, após quatro anos de pesquisa, o projeto foi abandonado por ser considerado impossível.

DAUZIER, THIBAUT, WINTENBERGER (1954), trabalhando com fertilização *in vitro* em coelhas, observaram a presença de pronúcleos e a expulsão do segundo corpúsculo polar, que consideraram como prova de fertilização.

CHANG (1959) foi capaz de resolver o problema da fertilização em coelhas, transferindo conceitos de raça diferente à da receptora e obtendo o nascimento de coelhos da mesma raça da doadora, provando que a fertilização *in vitro* havia, de fato, ocorrido. Após a demonstração de CHANG (1959),

muitos outros pesquisadores aplicaram a mesma estratégia em outras espécies. Após diversos experimentos, EDWARDS et al., (1966) acreditaram que o que frustrou o trabalho de pesquisadores como MENKIN & ROCK (1948) foi a não-compreensão do conceito de capacitação do sêmen, conceito este elucidado por CHANG nos anos 50. Em 1966, EDWARDS transferiu-se para o Hospital Johns Hopkins, em uma época em que a ressecção em cunha dos ovários para o tratamento da síndrome dos ovários policísticos era um procedimento bastante comum, o que facilitava a obtenção de óvulos. Posteriormente, os esforços voltaram-se para a tentativa de capacitação do espermatozóide, com o propósito de torná-lo apto a fecundar (JONES, 1991).

O primeiro sucesso em fertilização *in vitro* na Austrália foi no ano de 1980, na Universidade de Melbourne, com o nascimento de Candice Reed, após a transferência de um ovo no estágio de oito células, originário de um único oócito aspirado com o auxílio da laparoscopia, durante um ciclo natural (LOPATA et al., 1980).

Em 1980, nos Estados Unidos (EUA), pesquisadores obtiveram gametas femininos em ciclos naturais, realizaram transferências de embriões, porém não conseguiram gravidez. A partir de então, optaram por induzir a ovulação com gonadotrofina de mulher na pós-menopausa (hMG), na tentativa de obter um maior número de óvulos, nascendo, em 1981, o primeiro bebê pela técnica de FIV nos EUA (JONES et al., 1982).

Nos dias de hoje, os procedimentos de fertilização *in vitro* evoluíram de tal maneira que estão sendo utilizados com maior frequência no tratamento do casal estéril ou infértil.

1.1. INDICAÇÕES DA FERTILIZAÇÃO *in vitro*

1.1.1. Fator Tubário

O fator tubário é o mais frequente fator feminino de infertilidade e está presente em 35% das mulheres inférteis (CATES & WASSERHEIT, 1991). As alterações tubárias são secundárias à doença inflamatória pélvica, endometriose, cirurgia pélvica, gravidez ectópica, abortamento séptico e apendicite com peritonite.

A ausência das trompas é indicação absoluta para fertilização de gametas *in vitro*. Quando submetidas à técnica de FIV estas pacientes apresentam uma taxa de nascimento de 16,8% por punção (AMERICAN FERTILITY, SOCIETY FOR ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY, 1994). Nos casos de pacientes portadoras de hidrossalpinge recomenda-se o tratamento cirúrgico prévio ao ciclo de FIV, na tentativa de melhorar a taxa de implantação embrionária e, conseqüentemente, a taxa de gravidez por ciclo (DECHAUD et al., 1998; MURRAY et al., 1998). Um estudo retrospectivo realizado neste ano por STRANDELL, THORBURN, HAMBERGER (1999) concluiu ser o fator tubário o mais importante fator de risco para gravidez ectópica após o procedimento de FIV.

1.1.2. Endometriose

Endometriose é uma doença patologicamente benigna caracterizada pela presença de implantes endometriais ectópicos. Estes implantes estão geralmente associados a uma reação inflamatória, podendo levar à formação de aderências e distorções anatômicas. Dismenorréia, dispareunia e infertilidade estão freqüentemente associadas à endometriose. O diagnóstico requer visualização direta, através da videolaparoscopia, com posterior avaliação anatomopatológica. A endometriose é encontrada em aproximadamente 8% a 10% das mulheres na idade reprodutiva e tem sido observada em 26% a 39% das mulheres com esterilidade primária e em 12% a 25% das mulheres com esterilidade secundária (PITTAWAY, 1992). Segundo o grau de acometimento, pode ser classificada por estágios (I, II, III e IV) (AMERICAN FERTILITY SOCIETY, 1985). Quanto à etiologia, BUSSACA et al. (1994), demonstraram que pacientes com endometriose apresentariam um decréscimo na atividade de determinados linfócitos, denominados *natural killers*, específica para alguns antígenos presentes nas células endometriais. Portanto, esta doença surge em decorrência de uma deficiência imunológica específica que impede a destruição das células endometriais viáveis. O tratamento inclui ablação cirúrgica do tecido comprometido e/ou supressão hormonal com agentes como o GnRH-a, que levaria a uma ablação química do tecido comprometido, por falta de estímulo. Quando não se obtém gravidez após o tratamento clínico, pode-se indicar a FIV, que oferece taxas de fertilização inferiores (51%) às aquelas encontradas em mulheres férteis (81%). Quanto mais avançado o estágio da

endometriose menor é a taxa de fertilização; entretanto, nota-se que há aumento das taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário após o tratamento cirúrgico da endometriose (MILLER, PITTAWAY, DEATON, 1995). ARICI et al. (1996), demonstraram, em análise retrospectiva, que o número de oócitos recuperados em pacientes com e sem endometriose é o mesmo e não se observou diferença quanto às taxas de gravidez por transferência entre os grupos com endometriose mínima, leve, moderada e severa.

1.1.3. Fator Masculino

De acordo com vários estudos 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 casal com problemas de fertilidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou recentemente um esquema que expõe os requerimentos mínimos necessários na avaliação clínica do parceiro masculino, em um casal infértil (ROWE et al., 1993). Durante o exame clínico, devem-se considerar as anormalidades genitais como: varicocele; testículo ausente ou retrátil; ausência do canal deferente ou fimose. O volume e a consistência testicular fornecem valiosas informações sobre a espermatogênese.

O estudo do espermatozoide deve ser considerado como o elemento mais importante na apreciação de uma infertilidade masculina. Um espermograma pode evidenciar uma ou várias anormalidades, incluindo baixa concentração de espermatozoides (oligospermia), distúrbios na motilidade (astenospermia), baixa

proporção de formas normais (teratospermia), ou alta taxa de mortalidade (necrospermia). Devido a possibilidade de variações temporárias nos parâmetros espermáticos, pelo menos duas amostras de sêmen devem ser consideradas antes de se estabelecer um diagnóstico de queda na fertilidade.

Em uma análise convencional, parâmetros normais incluem uma concentração espermática superior a 20 milhões de espermatozóides/ml; uma motilidade espermática superior a 50% e acima de 30% de espermatozóides morfolologicamente normais (WHO, 1992). KRUGER et al. (1988a), propuseram um sistema alternativo de análise da morfologia que apresenta um alto valor preditivo nos resultados de fertilização *in vitro*, sendo que os casos de teratospermia com taxa de espermatozóides normais inferior a 14% apresentam um pior prognóstico nos resultados de FIV (GROW et al., 1994). Isto foi claramente demonstrado tanto nos procedimentos de FIV, como na transferência de gametas para o interior da trompa (KRUGER et al., 1988a; HINTING et al., 1990; MENKVELD et al., 1990; ENGINSU et al., 1991; GROW et al., 1994).

A morfologia espermática é uma característica de grande importância no diagnóstico da homem infértil. Um exemplo de alteração espermática severa é a microcefalia (espermatozóide sem acrossoma), como se vê na Figura 1, que pode comprometer todas as células, tornando o homem estéril devido à incapacidade do espermatozóide em fertilizar o ócito. A microcefalia pura é uma patologia rara, geralmente associada a um distúrbio genético (SCHMIADY, RADKE, KENTENICH, 1992; LIU et al., 1995; BATTAGLIA et al., 1997).

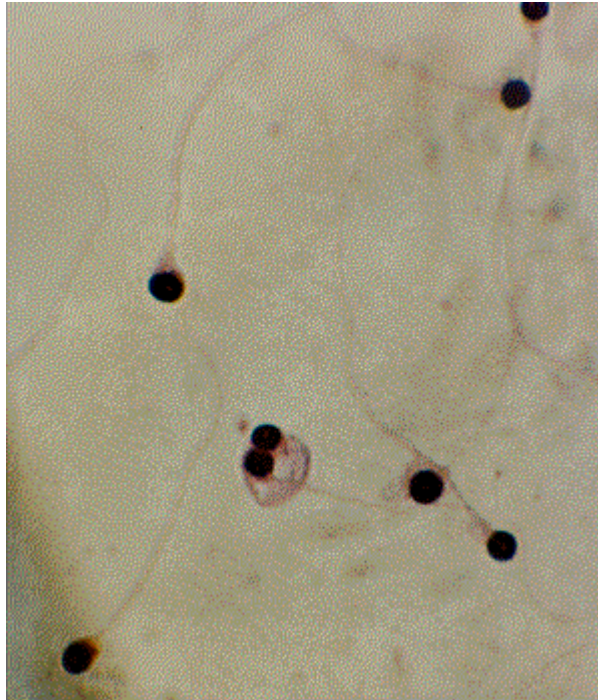


Figura 1. *Espermatozoides microcefálicos (BLAZOTTI, 1990)*



Figura 2. *Espermatozoides flagelo curto (BASTIT, 1990)*

Uma outra alteração morfológica bastante rara é a síndrome do flagelo curto (Figura 2), onde os espermatozóides não podem se locomover devido a alteração no flagelo (OHMORI et al., 1993).

Durante a avaliação clínica de um homem infértil deve-se também investigar um possível fator imunológico, uma infecção ou uma alteração endócrina. Porém, freqüentemente, o fator masculino é idiopático e, conseqüentemente, sem tratamento clínico ou cirúrgico. Se não se obtém êxito com o tratamento primário do fator masculino, pode-se recorrer a uma inseminação intra-uterina e, posteriormente, a técnicas de fertilização *in vitro*.

Os procedimentos de FIV foram de grande valia no tratamento do homem infértil. Na tentativa de melhorar a possibilidade terapêutica, várias outras técnicas foram surgindo. MANHES & HERMABESSIEREN (1985) relataram a primeira gravidez pós-inseminação intraperitoneal como tratamento do fator masculino. DEVROEY et al. (1986) demonstraram a possibilidade de gravidez após a transferência de zigotos (estado de pronúcleo) para dentro da trompa (*Zygote intra-Fallopian Transfer* ou ZIFT), em casos de esterilidade por fator masculino associado a auto-anticorpo e ausência de patologia tubária, o que, posteriormente, foi aplicado por outros autores (PALERMO et al., 1989). BALMACEDA et al., (1988) relataram uma outra possibilidade de tratar o fator masculino, que consistia na transferência do embrião para o interior da trompa. Entretanto, nem sempre se obtém sucesso nos casos de fator masculino severo. Nos últimos anos, avanços sofisticados vêm se destacando nos laboratórios de

reprodução assistida. Um dos últimos, considerado o de maior sucesso no tratamento do fator masculino severo, é a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), realizada através de técnicas de micromanipulação (PALERMO et al.,1992) (Figura 3).



Figura 3. Injeção intracitoplasmática de espermatozóide (BIAZOTTI, 1997)

1.1.4. Infertilidade sem causa aparente

A infertilidade inexplicada é um diagnóstico de exclusão aplicado a aproximadamente 20% dos casais inférteis, nos casos onde a avaliação propedêutica não evidencia nenhum fator etiológico (ANONYMOUS, 1992). Uma investigação completa requer, no mínimo, uma análise do sêmen, um

teste de penetração espermática, uma histerossalpingografia, uma avaliação endoscópica da anatomia pélvica e uma documentação da qualidade da ovulação. Deve-se afastar ainda infecção prostática, o fator cérvico-uterino e o fator imunológico. Antes de se optar por uma técnica de FIV, deve-se indicar pelo menos três tentativas de inseminação artificial em ciclo ovariano estimulado, sob controle ecográfico, quando a qualidade do sêmen assim o permitir. A fertilização *in vitro* poderá ser de valor diagnóstico nos casos em que uma falha no processo de fertilização possa estar mascarada por um defeito intrínseco do gameta (NAVOT et al, 1988).

1.1.5. Fator Imunológico

A FIV tem sido recomendada também como um método para tratamento do fator masculino de etiologia auto-imune (CLARKE et al., 1985; ALMEIDA et al., 1989). Este procedimento permite evitar o efeito inibidor do anticorpo durante o trajeto do espermatozóide através da via genital feminina (MENGE & BEITNER, 1989). O fator imunológico pode ser inicialmente sugerido por um teste de penetração espermática anormal (os espermatozoides não migram no muco cervical), pela presença de aglutinação espermática ou pela identificação de anticorpos anti-espermatozóide durante a avaliação de uma infertilidade sem causa aparente. Anticorpos anti-espermatozóide podem ser identificados no sêmen, no soro ou no muco cervical, através de testes com imunoglobulinas. As opções de tratamento incluem inseminação intra-uterina ou técnicas de fertilização *in vitro*. Uma diminuição significativa na taxa de fertilização *in vitro*

tem sido observada na presença de auto-anticorpo anti-espermatozóides, particularmente quando mais de 70% dos espermatozóides móveis contêm anticorpos que se ligam a imunoglobulinas do tipo IgA ou IgG, sendo que uma completa falha de fertilização *in vitro* ocorre em 35% a 40% das tentativas (CLARKE et al., 1985; ALMEIDA et al., 1989).

1.2. Fertilização *in vitro*

Da fertilização *in vitro* descrita por STEPTOE & EDWARDS em 1978, logo após o nascimento de Louise Brown, restou simplesmente o princípio que consiste em transferir embriões para dentro do útero, após a fecundação externa de oócitos humanos. Esta técnica de base levou ao desenvolvimento de várias outras, algumas delas descritas por TESARIK & TESTART (1989). Cada etapa continuou a ser aperfeiçoada. A simplificação do método e o aperfeiçoamento da qualidade dos resultados foram desenvolvidos por diversas equipes. Preconizou-se a estimulação ovariana com a utilização de gonadotrofinas para aumentar o número de oócitos e ,assim, obter-se maior número de embriões. Os óvulos inicialmente captados por laparoscopia são hoje, na maioria dos casos, aspirados por via vaginal, com o auxílio de um transdutor ecográfico (LENZ, LAURITSEN, KJELLOW, 1981).

1.2.1. Indução da Ovulação

Foi preciso evitar o pico espontâneo do hormônio luteinizante (LH), que desencadearia a ovulação, para impedir que a rotura folicular já houvesse ocorrido no momento proposto para a punção ovariana. Enfatizou-se, então, a importância do uso de análogos do GnRH, em combinação com gonadotrofina da mulher na pós-menopausa (hMG), como um novo protocolo para a indução da ovulação, nos programas de FIV (RUTHERFORD et al., 1988), sendo que a primeira utilização de agonistas nos protocolos de indução da ovulação foi descrita por CRAFT, em 1984. Alguns autores têm descrito alta taxa de gravidez com o uso de análogo do GnRh e hMG (ROL-EL et al., 1991), sendo que um estudo publicado por MAROULIS et al. (1991) não observou esta superioridade sobre protocolos convencionais. Apesar de muitos trabalhos indicarem melhores resultados com o uso de GnRH e gonadotrofinas sobre outros protocolos de indução ovariana, dois fatos são claros em relação ao uso desta associação: o alto custo do tratamento e a alta incidência de hiperestimulação ovariana (RON-EL et al., 1991).

Um estudo publicado por OLIVENNES et al. (1995), analisando a ação do antagonista do GnRh (*Cetrorelix*, Asta Medica AG, Frankfurt, Germany), concluiu que uma simples administração (3mg) no oitavo dia do ciclo menstrual foi capaz de prevenir o pico do LH.

Há vários anos utilizado, o citrato de clomifene é ainda hoje opção terapêutica, particularmente nos casos de síndrome dos ovários policísticos

(FILICORI & FLAMIGNI, 1988). Em resumo, várias drogas vêm sendo introduzidas nesta última década, tornando esta terapia mais efetiva e potencialmente segura, porém sempre sujeita a riscos como a síndrome de hiperestimulação ovariana e gravidez múltipla.

1.2.2. Técnica de FIV

A técnica de FIV (Figura 4) oferece aos especialistas a oportunidade de poder tratar um casal infértil e também permite a investigação individual dos dois gametas, assim como o estudo das suas interações. Porém, para o bom funcionamento de um laboratório de fertilização *in vitro*, é de extrema importância um rigoroso controle de qualidade. Instrumentos e meios de cultura devem ser regularmente testados quanto a toxicidade, para evitar danos aos gametas.

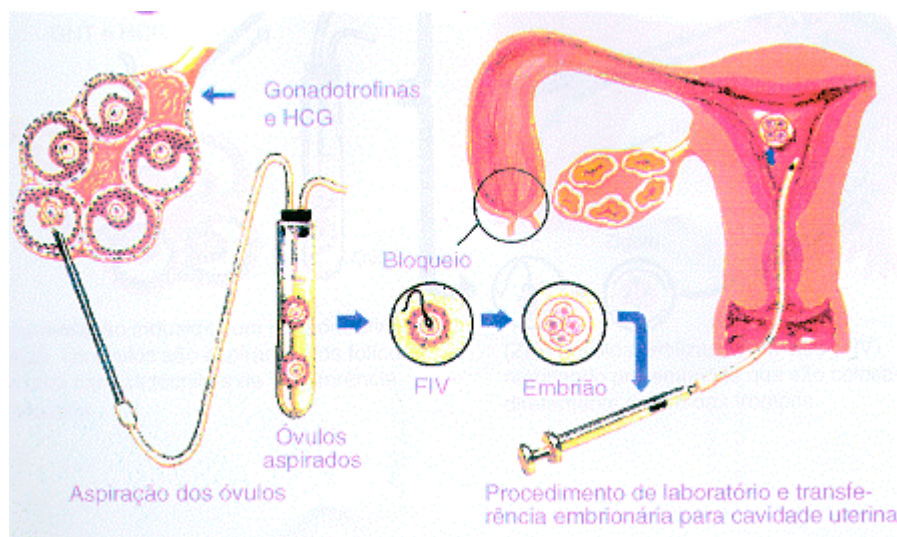


Figura 4. Etapas referentes à FIV (Manual de orientação – PROFERT)

COLETA DE OÓCITOS

A aspiração do oócito é realizada 34 a 36 horas após a administração de gonadotrofina coriônica (hCG), utilizada para estimular a reinativação da meiose e a conseqüente expulsão do primeiro corpúsculo polar, momento biológico que vai dar origem a um óvulo maduro, apto a ser fertilizado.

A punção do folículo ovariano guiada pelo ultra-som foi primeiramente descrita por LENZ et al., (1981). A agulha de aspiração era introduzida dentro do ovário por via percutânea-transvesical, transuretral-transvesical, ou diretamente por via transvaginal. A aspiração folicular por via transvaginal, com o auxílio de um transdutor ecográfico (Figura 5), é a que predomina hoje no mundo, tendo sido descrita pela primeira vez por GLEICHER, FRIBERG, FULLAN (1983) . O método de aspiração com o auxílio do transdutor vaginal apresenta inúmeras vantagens sobre a aspiração via laparoscópica. Porém, esta última continua tendo grande valor nos procedimentos de reprodução assistida que exijam permeabilidade tubária (GIFT, ZIFT) e, mais raramente, nos casos onde haja falha com o primeiro método.

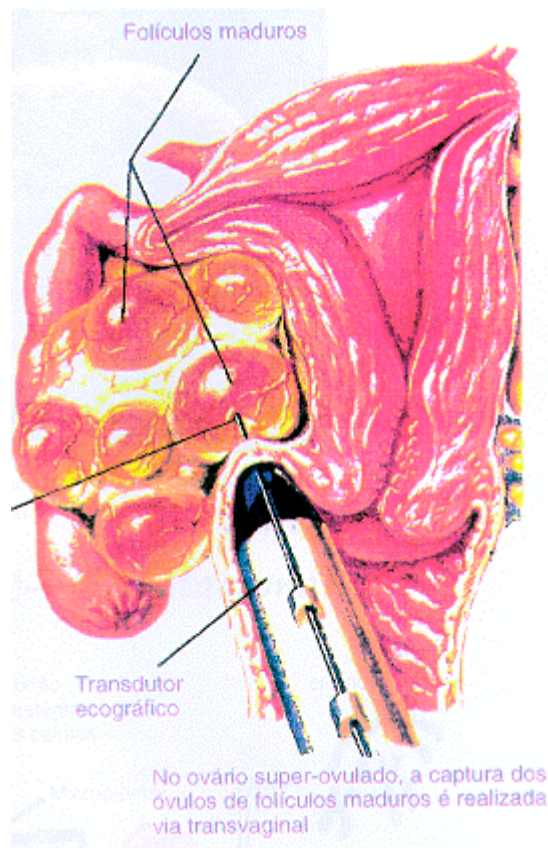


Figura 5. Punção de oócitos por via transvaginal
(Manual de orientação – PROFERT)

? CLASSIFICAÇÃO DO OÓCITO

A avaliação do oócito é realizada com o auxílio de um microscópio invertido. O grau de maturidade é estimado baseando-se no complexo *cumulus oophorus-corona radiata* e oócito, incluindo características específicas como o grau de mucificação e dispersão da *corona radiata* e do *cumulus*, assim como a presença ou ausência da membrana nuclear (vesícula germinal) ou do primeiro corpúsculo polar.

O oócito maduro apresenta extensa dispersão das células da granulosa com *cumulus* e *corona radiata* diametralmente expandidos. A zona pelúcida é bem diferenciada e a presença do primeiro corpúsculo polar documenta um oócito na metáfase II da meiose (Figura 6).



Figura 6. Oócito na metáfase II da meiose (BIAZOTTI, 1990)

Um oócito intermediário apresenta uma *corona* mais densa e não se observa a membrana nuclear e o corpúsculo polar (metáfase I) (Figura 7).

Quando na prófase I da maturação o oócito não apresenta vesícula germinal, é circundado por uma *corona* compacta e somente uma pequena camada de células no *cumulus*, sendo considerada uma célula imatura (VEECK, 1990) (Figura 8).

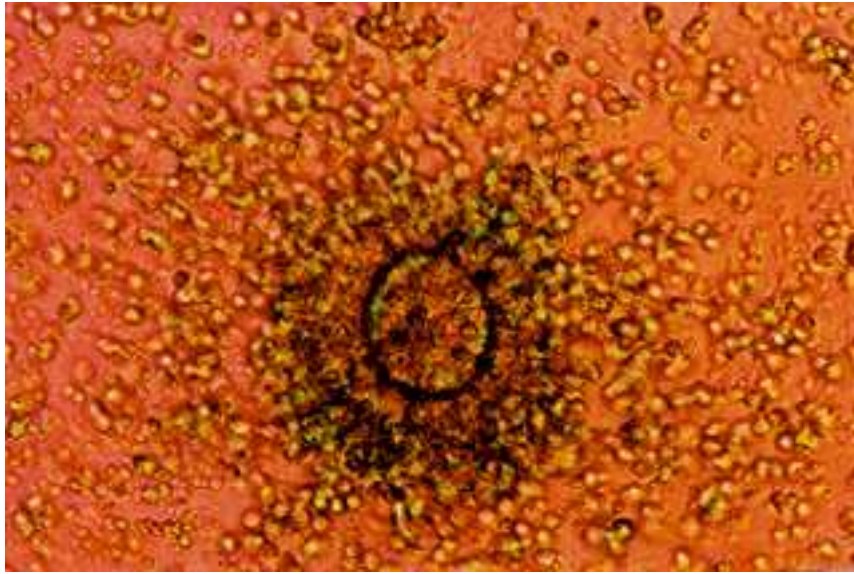


Figura 7. Oócito na metáfase I da meiose (BIAZOTTI, 1990)

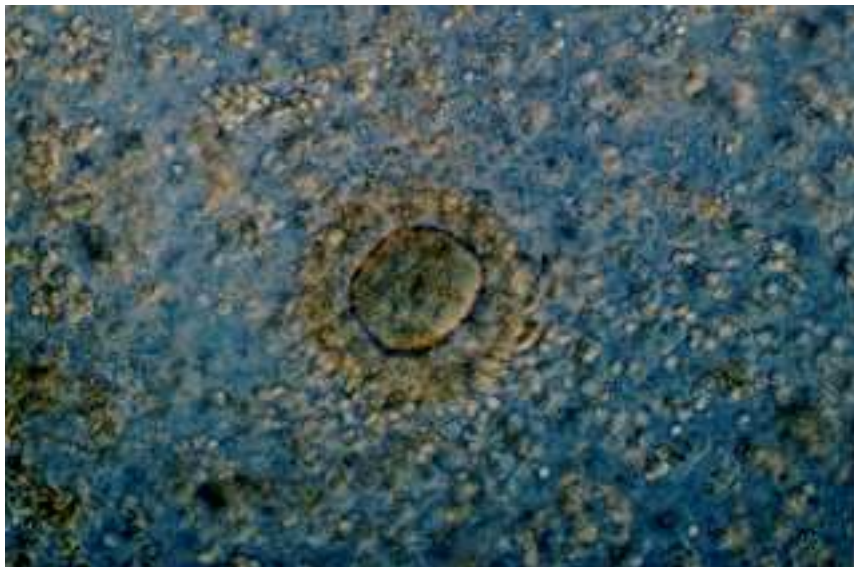


Figura 8. Oócito na prófase I da meiose (BIAZOTTI, 1990)

Oócitos pré-ovulatórios são previamente incubados, em meio de cultura específico, de duas a oito horas antes da inseminação; as células de maturidade intermediária devem ser inseminadas após 12 a 24 horas de pré-incubação e os oócitos imaturos devem permanecer de 22 a 35 horas incubados *in vitro* (VEECK et al., 1983).

PREPARAÇÃO DO SÊMEN PARA FIV

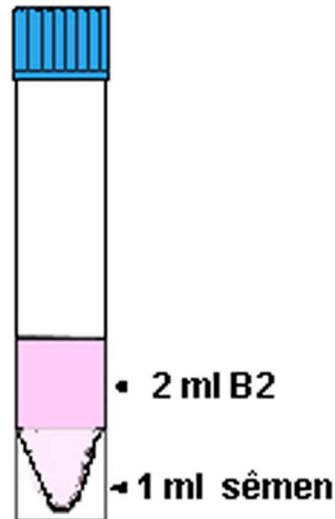
Há alguns anos, várias técnicas de separação e seleção de espermatozóides vêm se desenvolvendo com os procedimentos de reprodução assistida. O propósito desta técnica consiste em separar os espermatozóides do plasma seminal, permitindo, por um lado, aumentar a porcentagem de espermatozóides móveis e normais, aptos a fecundar o oócito e, por outro lado, simplesmente concentrar os espermatozóides, separando-os dos restos celulares e das células redondas. O resultado depende da qualidade inicial e do princípio do método empregado.

Coleta do sêmen: O sêmen deve, preferencialmente, ser coletado no laboratório, momentos antes ou logo após a captação do óvulo. A coleta deve ser feita por masturbação, em um recipiente estéril, respeitando um período anterior de três a cinco dias de abstinência sexual. Nos casos em que houver dificuldade na coleta, é aconselhável congelar uma ou mais amostras previamente ao dia da punção dos oócitos. Para evitar uma contaminação acidental do esperma são necessários: micção prévia para eliminar as bactérias comensais

da uretra anterior, lavagem das mãos e da glândula com sabão bactericida e antifúngico, enxaguando-as com solução salina estéril. Após a coleta, o sêmen é mantido a 37°C ou à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos, aguardando a liquefação (JOUANNET, 1986). Após a homogeneização, uma amostra é destinada para a realização de um espermograma e, posteriormente, o material é submetido a técnicas de lavagem e migração ascendente ou descendente. Este procedimento permite individualizar espermatozoides móveis, separando-os do líquido seminal e tornando-os aptos a fecundar, o que consiste no processo de capacitação.

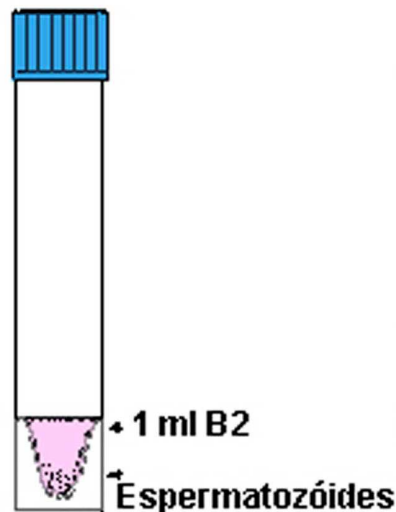
Técnicas de preparação do sêmen para FIV: Certas técnicas consistem em selecionar espermatozoides normais, seja por migração ascendente em um meio de cultura (*swim-up* a partir do plasma seminal ou após lavagem), seja por filtração após passagem por um gradiente de densidade, que consiste na técnica de Percoll (BERGER, MARRS, MOYER, 1985, GUÉRIN et al., 1989), proporcionando a concentração de espermatozoides com alto potencial de fertilização (GUÉRIN et al., 1989). Outros métodos propiciariam uma melhora na motilidade e na sobrevivência dos espermatozoides, através da suplementação do meio de cultura com agentes farmacológicos (caféina, 2-desoxiadenosina, pentoxifilina) ou de meios biológicos (soro humano, líquido folicular, líquido tubário). A técnica de Percoll oferece vantagens em termos de qualidade dos espermatozoides selecionados o que influenciaria positivamente os resultados nas técnicas de reprodução assistida (COLLEU, LESCOAT, GOURANTON, 1996).

a) **Técnica de Migração Ascendente** (*swim-up*): Esta técnica foi inicialmente proposta por DREVIUS (1971), modificada por LOPATA, et al. (1976), e aplicada à inseminação artificial por HARRIS et al., (1981). Consiste em depositar 1ml de meio de cultura (B2 de MENEZO) em um tubo de ensaio contendo sêmen fresco liquefeito e, após uma hora, recuperar os espermatozóides que efetuaram uma migração ascendente. Em seguida, os espermatozóides recuperados são submetidos a um processo de centrifugação (300g/10min) para concentrar os espermatozóides móveis, então capacitados, em um pequeno volume.



Migração ascendente

b) **Técnica de Lavagem e Centrifugação** (*swim-up* após lavagem) consiste na técnica de *swim-up* após eliminação do plasma seminal. A lavagem do sêmen fresco é geralmente realizada por duas vezes, através de centrifugação (300g/10min); posteriormente uma camada de meio de cultura é lentamente depositada sobre o *pellet* e, após, incubados a 37°C, em 5% de dióxido de carbono, por 30 a 60 minutos. A seguir, recupera-se a fração superior, contendo alta concentração de espermatozóides móveis e capacitados.

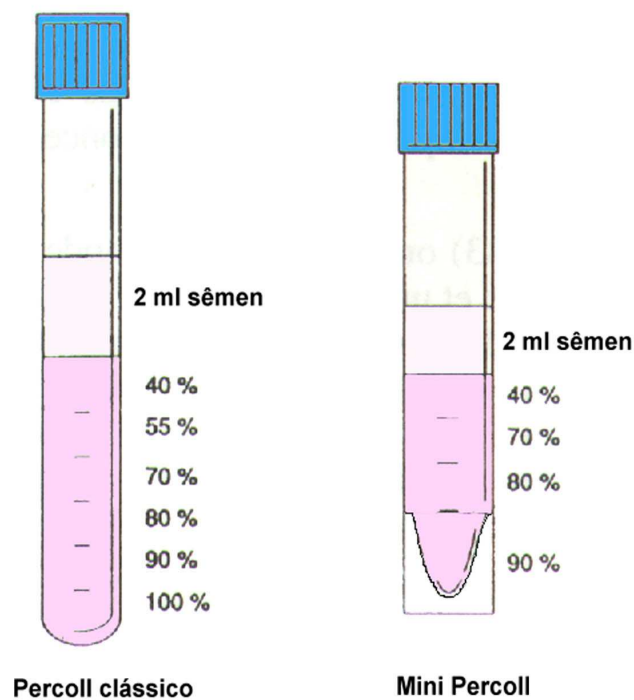


Lavagem e migração

c) **Separação do sêmen por um gradiente de Percoll (partículas coloidais de silicone recobertas de polivinil-pirrolidone):** Atualmente é o método de preparação mais utilizado pelos especialistas em reprodução assistida. Esta técnica permite eliminar os restos celulares ou acelulares, os espermatozóides malformados, os germes presentes no sêmen (com exceção da *Escherichia Coli*, que parece estar aderida aos espermatozóides), os aglutinados de células e, ainda, permitir a recuperação dos espermatozóides móveis e normais.

? **Técnica de Percoll:** Técnica primeiramente descrita por GORUS ? PIPELEERS (1981), que consiste na centrifugação dos espermatozóides em um gradiente de densidade contínua constituído pelo Percoll. O princípio do Percoll é assegurar uma separação celular em função de sua densidade. Em 1989, GUÉRIN et al., propuseram a centrifugação sobre gradiente descontínuo de Percoll. Nesta técnica, 2ml de sêmen liquefeito são delicadamente depositados sobre um gradiente descontínuo de Percoll e, após, centrifugados (300g/20min); a fração mais concentrada de Percoll (90%), que contém os espermatozóides móveis é, então, recuperada e novamente centrifugada (300g/10min), juntamente com meio de cultura, para eliminar as partículas de Percoll. O *pellet* é diluído em 300?l a 500?l de meio de cultura; a porcentagem de formas móveis, assim como a concentração, são posteriormente avaliadas. Atualmente, a maioria dos centros de medicina reprodutiva utiliza uma técnica simplificada com duas camadas

(47,5%, 95%) de gradiente descontínuo de Percoll (McCLURE, NUNES, TOM, 1989 ; ZIEBE & ANDERSON, 1993). Em alguns casos, a adição de um agente químico como a pentoxifilina pode melhorar a motilidade do espermatozóide *in vitro* (YOVICH et al., 1990).



? INSEMINAÇÃO E CULTURA DO OÓCITO

O grau de maturação do oócito baseia-se essencialmente na maturidade nuclear, das membranas e do citoplasma. Na prática observa-se, entre os oócitos recuperados, diferentes graus de maturação. Após a captação e a pré-incubação necessária para atingir o grau de maturidade, cada oócito é

inseminado com uma densidade de aproximadamente 150.000 espermatozóides móveis. Em casos de sêmen alterado, a concentração pode ser aumentada para 500.000/oócito, com o propósito de melhorar a taxa de fertilização.

Os gametas são incubados em um meio de cultura por 12 a 18 horas, em uma estufa a 37°C, contendo 5% de CO² e a uma umidade relativa de 98%. Após este intervalo, os oócitos são examinados para constatar a fertilização, que é evidenciada pela identificação de dois pronúcleos (masculino e feminino) ou expulsão do segundo corpúsculo polar. Neste estágio é importante a avaliação minuciosa do zigoto com a finalidade de detectar precocemente uma fertilização anormal (poliploidia) marcada pela presença de mais que dois pronúcleos. Um embrião poliplóide pode não ser identificado e dividir-se normalmente.

Os oócitos fertilizados são incubados novamente em um meio de crescimento contendo alta concentração de proteína (10% a 20%), por um período de 24 a 60 horas. O estágio de mórula pode ser evidenciado 36 a 48 horas pós inseminação do oócito. A clivagem envolve uma série de divisões mitóticas no interior do citoplasma de um zigoto sem alterar o tamanho global (VEECK, 1990). Posteriormente à fase de mórula, o pré-embrião atinge a fase de blastocisto, quando, no processo de fertilização natural, já se encontra na cavidade uterina.

? TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA

Previamente à transferência, o pré-embrião é avaliado segundo alguns critérios de morfologia: simetria e forma dos blastômeros, fragmentação citoplasmática e número de células (VEECK, 1990) (Figura 9).

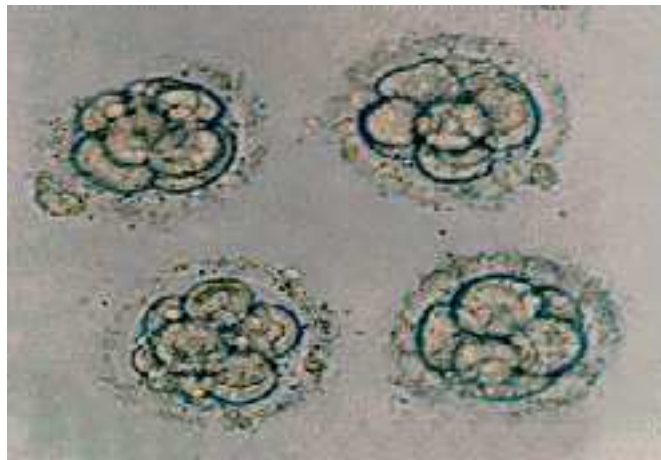


Figura 9. Pré-embriões (BIAZOTTI, 1990)

Os pré-embriões em estágio de pronúcleo podem ser transferidos para o interior de trompas normais, através da técnica de ZIFT (DEVROEY, 1986). A maioria dos especialistas realiza a transferência pré-embrionária intra-uterina em torno de 48 horas após a inseminação do oócito. A transferência pode ser realizada em até cinco dias após a inseminação, já na fase de blastocisto (GARDNER et al., 1998).

A taxa de gravidez aumenta quando o número de pré-embriões transferidos é superior a três entretanto, nestes casos, o risco de gravidez múltipla aumenta nitidamente, principalmente em mulheres jovens (<34 anos). Portanto, o número de pré-embriões transferidos deve ser restrito, congelando-se os pré-embriões excedentes para uma transferência futura (EDWARDS, 1998)

1.3. Fator masculino e FIV

A FIV foi inicialmente desenvolvida para tratar a infertilidade feminina, porém o interesse potencial nas patologias masculinas foi evocado quando se constatou que algumas centenas de espermatozóides móveis seriam suficientes para fertilizar *in vitro*. Os resultados medíocres observados nos casos de fertilização *in vitro* com espermatozóides deficientes, vêm sendo um estímulo para o estudo cada vez mais detalhado do gameta masculino, tanto do ponto de vista funcional quanto morfológico.

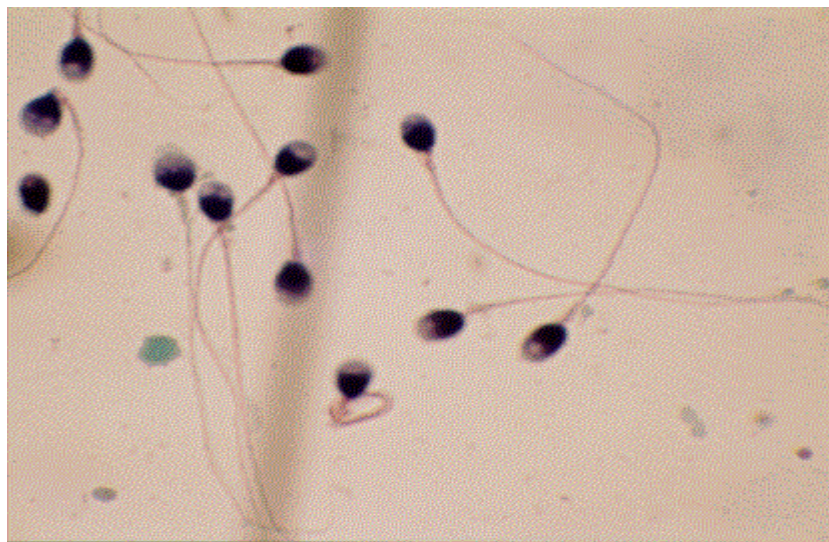


Figura 10. Espermatozóides normais (GENTY, 1990)

O estudo da função genital masculina, no que concerne ao gameta, permaneceu durante muito tempo marginalizado no campo da investigação médica. A primeira contagem do número dos espermatozóides, utilizando-se um hemocítômetro, foi realizada por LODE² (1895). Anos após, MacLEOD & GOLD (1951) deram um passo significativo no conhecimento do sêmen humano, realizando um vasto estudo comparativo sobre mais de 1.000 homens férteis e não férteis. Em 1963, CLERMONT fez uma descrição precisa da espermatogênese humana e introduziu a noção de ciclo do epitélio seminífero. Nos últimos 30 anos, o estudo do aparelho genital masculino vem se desenvolvendo consideravelmente. Recentemente, numerosos testes foram elaborados para estudar a função testicular exócrina através de seu produto de secreção: o espermatozóide (Figura 10).

O teste definitivo continua sendo a fecundação seguida de uma gravidez normal. Tradicionalmente, o diagnóstico de infertilidade masculina é baseado em uma avaliação descritiva do ejaculado humano, com ênfase na concentração, morfologia e motilidade dos espermatozóides, porém, na prática, estes valores não são suficientes para caracterizar o potencial de fertilidade de uma população espermática.

² LODE, 1895 apud JOEL, C.A.: - Historical survey of research on spermatozoan from antiquity to the present. *In*: JOEL, C.A.: Fertility Disturbances in men and women. Karger, Bâle, 1971, pp. 3-47.)

1.3.1. Fatores que podem alterar as características do sêmen

Os valores espermáticos podem apresentar variações importantes em um mesmo indivíduo, em condições fisiológicas, independentemente das modificações ligadas diretamente a uma alteração no aparelho genital ou a uma patologia intercorrente. Diferentes fatores podem influenciar nesta variação:

- ? **Tempo de abstinência sexual** - existe uma relação linear entre o tempo de abstinência sexual precedendo o exame (entre dois e cinco dias) e volume, concentração e número total de espermatozóides presentes no ejaculado. Durante o mesmo período, não existe modificação da porcentagem dos espermatozóides móveis ou morfolologicamente normais. Por outro lado, uma queda moderada da motilidade pode ser observada após um longo período de abstinência (HEUCHEL, SCHWARTZ , PRICE, 1981).
- ? **Idade** - A espermatogênese é mantida a partir de puberdade, porém, na senilidade questiona-se a qualidade do gameta. Um estudo realizado por SCHWARTZ et al. (1983) mostrou que homens férteis têm uma diminuição significativa da porcentagem de espermatozóides normais a partir dos 40 anos, e a partir dos 45 anos diminui a porcentagem de espermatozóides móveis. Segundo BORDSON & LEONARDO (1991) após os 55 anos existe um aumento das malformações graves não cromossômicas (acondroplasia, síndrome d'Alpert, Doença de Crouzon), passando de 0,2/1.000, antes dos 29 anos a 3,7/1.000, se o progenitor tiver idade superior a 45 anos.

? **Calor** - as funções testiculares e certas funções epididimárias desenvolvem-se a uma temperatura inferior à do corpo humano. Uma elevação da temperatura escrotal ou testículo - epididimária provoca alterações reversíveis na espermatogênese, manifestando-se por uma queda importante na produção espermática e um aumento no número de espermatozóides com anomalias morfológicas. Experiências feitas em ratos mostraram que o calor pode perturbar a fisiologia do epidídimo, acelerando o trânsito dos espermatozóides na porção caudal do mesmo (NIESCHLAG et al. 1982).

? **Fator infeccioso** – Evidências indicam o fator infeccioso como um fator significativo na etiologia da infertilidade masculina envolvendo queda na função espermática em consequência do estresse oxidativo. Este estresse seria devido a presença de radicais livres, nos casos de leucospermia, provenientes da interação de leucócitos e espermatozóides, levando a alterações da morfologia espermática (AITKEN, 1994) (Figura 11).

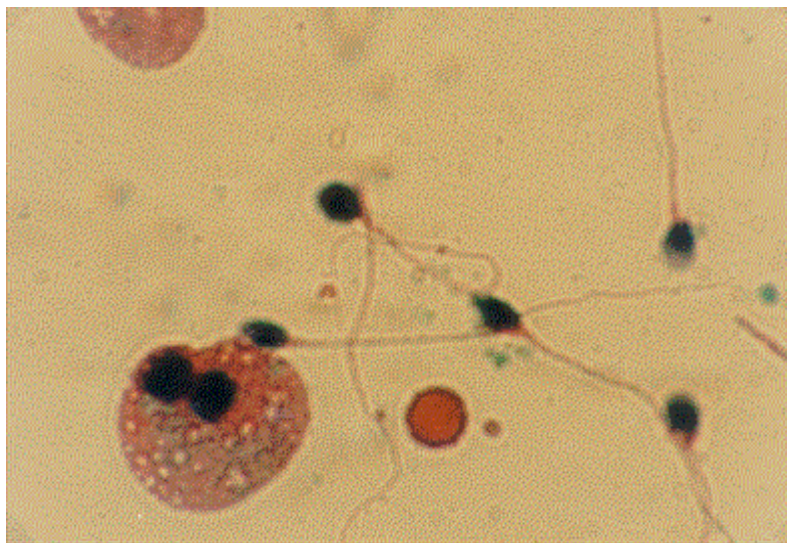


Figura 11. Leucócito e espermatozóides anormais (BIAZOTTI, 1990)

? **Outros** - como a linhagem espermática é muito sensível, é possível que outros fatores tenham influência na produção e qualidade dos espermatozóides, tais como: álcool, cafeína, estresse, consumo de cigarro e o uso de medicamentos.

1.3.2. Avaliação Clínica e Laboratorial

Em relação à avaliação do homem infértil, a análise do espermograma é de fundamental importância e deve vir sempre acompanhada de exame clínico detalhado e complementado por diferentes testes biológicos. A existência de atrofia ou hipotrofia testicular está quase sempre associada à deficiência muito grave da espermatogênese. Na Síndrome de Klinefelter, que representa 13% das azoospermias, observa-se clinicamente atrofia testicular, sendo o diagnóstico confirmado através do estudo da cromatina sexual ou do cariótipo (CHANDLEY, 1979).

Ainda na avaliação da função genital masculina, é também importante a dosagem, no plasma seminal, de marcadores bioquímicos específicos: próstata (ácido cítrico, fosfatase ácida, zinco, magnésio); vesículas seminais (frutose); função epididimária (carnitina), que permitem, freqüentemente, colocar em evidência a natureza excretória da azoospermia, assim como o nível da obstrução (SOUFIR, 1986).

1.3.3. Capacitação e Fecundação

O exame do sêmen traz informações importantes sobre a qualidade da função exócrina do testículo, porém o espermatozóide no plasma seminal ainda não está apto a fertilizar o oócito. Entre o plasma e a formação da primeira célula embrionária, o espermatozóide deverá submeter-se a um certo número de transformações e desenvolver interações com diversas estruturas de origem feminina. Durante a penetração no muco cervical e migração em direção à trompa, o espermatozóide sofre o processo de capacitação. Ocorrem alterações nas características do movimento celular: aumenta a amplitude de batimento flagelar e da cabeça do espermatozóide, tornando mais longa a trajetória a ser percorrida. Nesta condição, o espermatozóide encontra-se no estado “transicional” (ROBERTSON, WOLF, TASH, 1988). Após a capacitação, a amplitude das ondas flagelares torna-se assimétrica, dando lugar a um movimento celular vigoroso, não progressivo, conhecido como “hiperativação”. O termo “hiperativação” é usado para descrever uma mudança qualitativa na motilidade espermática ocorrida, no estágio final do processo de capacitação (AITKEN, BAKER, IRVINE, 1995). Este movimento é típico da célula completamente capacitada e é considerado o responsável pela força propulsora necessária para dirigir o espermatozóide através da zona pelúcida (ROBERTSON et al., 1988).

A capacitação é uma das fases finais no desenvolvimento do espermatozóide e de fundamental importância na fertilização; entretanto, a identificação da população espermática capaz de atingir este estado é bastante difícil.

Após atravessar as células da *corona radiata*, fixa-se sobre a zona pelúcida, iniciando, assim, o processo de fecundação em várias etapas: a membrana externa do acrossoma, estrutura rica em enzimas e situada na porção anterior da cabeça do espermatozóide, funde-se em vários pontos com a membrana plasmática, que envolve a cabeça do espermatozóide; as membranas fusionadas formam vesículas que se libertam da cabeça do espermatozóide, liberando enzimas do acrossoma. Essas enzimas rompem a zona pelúcida e permitem que o espermatozóide avance em direção à membrana plasmática do oócito. Quando atinge esta membrana plasmática, ele se funde com a mesma e fecunda o oócito. Duas outras reações - a reação cortical e a reação da zona pelúcida - são então desencadeadas. Inicialmente, os grânulos corticais do citoplasma do oócito, ricos em enzimas, liberam seu conteúdo, que se difunde na zona pelúcida a partir do ponto de fusão. Durante a reação da zona pelúcida, as enzimas modificam-na, transformando-a numa barreira impenetrável a outros espermatozoides. O ovo é assim protegido contra a poliespermia, ou seja, a fecundação simultânea por vários espermatozoides (TESARIK & TESTART, 1989).

1.3.4. Potencial Espermático de Fertilidade

O espermatozóide foi uma das primeiras células humanas observadas e descritas pelo inventor do microscópio, o holandês Leeuwenhoek, no século

XVII (LEEUEWENHOEK³, 1677), porém, somente após o ano de 1928 o número de espermatozóides foi associado ao potencial de fertilidade. Desde então, uma variedade de testes espermáticos e parâmetros do sêmen vêm sendo desenvolvidos e avaliados, na esperança de esclarecer se um determinado homem pode ou não fecundar sua parceira.

A análise espermática tradicional, que inclui avaliação da concentração, vitalidade e morfologia do espermatozóide não determina diagnóstico ou prognóstico preciso da capacidade de fertilização *in vivo* ou *in vitro* (AITKEN et al., 1982a). Muitos homens avaliados por problemas de fertilidade têm concentração espermática reduzida, assim como motilidade e morfologias alteradas, geralmente em combinação. Outros fatores conhecidos e desconhecidos, incluindo ainda os fatores femininos, são também importantes durante o processo da fertilização e devem ser sempre considerados. Muitos casais concebem rapidamente, apesar de um espermograma anormal e raros homens com análise espermática normal são inférteis.

Atualmente, nenhum teste de função espermática poderá prever completamente a acurácia da fertilidade, exceto onde existe uma desordem absoluta afetando todo o sêmen, como a azoospermia ou ausência total de acrossoma. Portanto, é necessário evidenciar quais grupos de testes espermáticos permitem a maior informação sobre fertilidade e são úteis para prever a capacidade fertilizante do espermatozóide. Este tipo de informação é

³ LEEUEWENHOEK¹⁶⁷⁷ apud MAUVAIS-JARVIS, P. - Médecine de la reproduction masculine. 2ed. France, 1986. 453p.

de grande importância no aconselhamento de casais tanto na conduta clínica quanto na utilização da técnica de fertilização *in vitro* mais indicada e, por isso, tornou-se o objetivo deste estudo.

2. Objetivos

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de algumas características do sêmen e oócitos sobre a fertilização *in vitro* em humanos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar se os seguintes parâmetros têm alguma influência na fertilização dos gametas *in vitro*:
 - ? Volume espermático, concentração de espermatozóides, motilidade, vitalidade, morfologia e maturidade dos espermatozóides.
 - ? Porcentagem de espermatozóides com membrana íntegra.
 - ? Concentração de espermatozóides recuperados e a porcentagem de espermatozóides com motilidade grau A, pós-capacitação espermática.
 - ? Volume e número de espermatozóides utilizados para inseminação do oócito.

2. Avaliar se o número de óvulos inseminados tem influência na fertilização *in vitro*.
3. Avaliar se existe associação entre a porcentagem de espermatozóides normais, de forma agrupada, e a taxa de fertilização *in vitro*.
4. Avaliar se existe associação entre a porcentagem de espermatozóides progressivos rápidos, de forma agrupada, e a taxa de fertilização *in vitro*.
5. Avaliar se existe associação entre a concentração de espermatozóides, de forma agrupada, e a taxa de fertilização *in vitro*.
6. Quais as variáveis de maior influência na probabilidade de fertilizar.

3. Casuística e Métodos

3.1. DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo clínico descritivo.

3.2. TAMANHO AMOSTRAL

Para este trabalho, desejou-se um tamanho de amostra que proporcionasse uma boa estimativa da porcentagem de oócitos fertilizados no laboratório de Genética da Reprodução do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Isto implicou em buscar um tamanho de amostra com uma pequena probabilidade da diferença entre tal parâmetro na população e o estimado na amostra, ultrapassar 10%. Fixou-se tal probabilidade (?) em 5%.

Foram coletadas inicialmente 98 amostras de sêmen, sendo encontradas, para esta casuística, um porcentagem de respectivos oócitos fertilizados estimada em aproximadamente 70%. Para tal estimativa foi atribuído um

intervalo de confiança de 95% (61%-79%), ou seja, a probabilidade desta estimativa estar distante da populacional em mais de 9% é de, no máximo, 5% (SNEDECOR & COCHRAN, 1980).

Desta forma, a tolerância encontrada na amostra foi de 9%, não ultrapassando os 10% fixados previamente à coleta dos dados. Assim considerou-se a amostra de 98 casos como satisfatória, indicando não haver necessidade de se coletar maior número de casos.

3.3. SELEÇÃO DOS SUJEITOS

Analisaram-se 98 amostras de sêmen e 678 oócitos de casais atendidos no Ambulatório de Esterilidade Conjugal do Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP, participantes do programa de FIV do CAISM/UNICAMP, no período de 1992 a 1995.

3.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- ? Amostras de sêmen que apresentavam, após o processo de capacitação, recuperação superior a um milhão de espermatozóides por mililitro.
- ? Oócitos provenientes de mulheres inscritas no Programa de Fertilização *in vitro* do CAISM/UNICAMP, apresentando idade inferior a 38 anos.

3.5. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- ? Amostras de sêmen que apresentavam cultura positiva para microorganismos.

3.6. VARIÁVEIS

3.6.1. VARIÁVEIS INDEPENDENTES

- ? Concentração de espermatozóides: número de espermatozóides por mililitro de sêmen , expresso em milhões/ml.
- ? Motilidade: porcentagem de espermatozóides móveis classificados em progressivos linear e rápido (A); progressivos não linear ou lento (B); não progressivos, porém móveis (C).
- ? Vitalidade: porcentagem de espermatozóides vivos por amostra de sêmen, analisados após a coloração pela eosina e nigrosina.
- ? Morfologia: porcentagem de espermatozóides normais e anormais, em cada amostra de sêmen, analisados após a coloração pelo método de Papanicolaou.
- ? Integridade de membrana: porcentagem de espermatozóides com membrana íntegra, analisados após exposição do sêmen a condições de hipoosmolaridade, através do *Swelling test* e o teste da água.
- ? Maturidade: porcentagem de espermatozóides maduros por amostra de sêmen, analisados após o teste do Azul de Anilina.

- ? Concentração de leucócitos: número de leucócitos por mililitro de sêmen encontrados em cada amostra, analisados após a coloração pelo método da peroxidase.
- ? Espermatozóides recuperados: concentração de espermatozóides por mililitro, recuperados pós capacitação espermática.
- ? Espermatozóides recuperados grau A: porcentagem de espermatozóides grau A, recuperados pós capacitação espermática.
- ? Óvulos maduros: números de óvulos maduros recuperados e classificados, pós-punção folicular.
- ? Volume para inseminação do oócito: Volume, em microlitros, de meio de cultura contendo espermatozóides capacitados, utilizados na inseminação do oócito.
- ? Número de espermatozóides inseminados: Número de espermatozóides, previamente capacitados, inseminados por oócito.

3.6.2. VARIÁVEIS DEPENDENTES

- ? Presença ou ausência de fertilização *in vitro*: Este processo que consiste na penetração, *in vitro*, de um único espermatozóide para o interior de um óvulo, e se confirma pela visualização de dois pronúcleos no interior do gameta feminino, ou pela presença do segundo corpúsculo polar.
- ? Taxa de fertilização: Relação entre o número de oócitos fertilizados e o número de oócitos submetidos ao processo de fertilização *in vitro*.

3.7. COLETA DAS AMOSTRAS DE GAMETAS

As amostras de sêmen foram coletadas por masturbação, após um período de três a cinco dias de abstinência sexual. O material foi coletado em um recipiente estéril e analisado no Laboratório de Genética da Reprodução do CAISM/UNICAMP, após o período necessário ao processo de liquefação.

Os óvulos foram recuperados, após indução da ovulação, através de punção por via transvaginal e visão ecográfica. A aspiração do líquido folicular realizou-se com o auxílio de uma agulha que foi adaptada ao guia da sonda ecográfica transvaginal. Após localização e perfuração do folículo ovariano, sob visão ecográfica, aspirou-se o conteúdo folicular. Os óvulos foram classificados em maduros ou imaturos, respectivamente, segundo a presença ou não de corpúsculo polar (VEECK, 1990).

3.8. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Para a análise da motilidade do espermatozóide, uma gota foi depositada entre lâmina e lamínula e observada sob microscópio equipado de um sistema óptico de contraste de fase, com uma platina aquecida que manteve o material a uma temperatura de 37°C. Quatro a seis campos foram avaliados e classificados em porcentagem para cada categoria de motilidade. Durante esta análise, também se avaliou a presença de células redondas e a presença ou ausência de aglutinação.

A concentração de espermatozóides foi determinada após a diluição de uma gota de sêmen em uma solução espermicida (Ringer + solução de formalina a 1%). A escolha da diluição (1/10; 1/20) foi ajustada dependendo da estimativa aproximada da concentração feita previamente, durante a avaliação da motilidade. Posteriormente à diluição, a suspensão foi homogeneizada e colocada sobre uma câmara de contagem (câmara de Neubauer). Após 15 a 20 minutos, os espermatozóides sedimentados foram contados. A leitura foi feita sob microscópio de contraste de fase. Um método opcional também foi empregado, com o auxílio da câmara de Makler, para determinar a concentração do sêmen sem a necessidade de imobilizar as células espermáticas.

O estudo da vitalidade foi feito utilizando-se a coloração de nigrosina e eosina, sendo que os espermatozóides não corados foram considerados vivos e os com coloração vermelha classificados como mortos. O resultado da análise foi expresso em porcentagem.

O estudo citológico ou espermocitograma, que consiste na análise morfológica do espermatozóide, foi efetuado com o auxílio de uma objetiva de imersão. Para este estudo, uma gota de sêmen puro homogeneizado foi distribuída sobre uma lâmina, que foi posteriormente corada pelo método de Papanicolaou (WHO, 1987). Nesta análise, o espermatozóide considerado normal deveria apresentar uma cabeça ovalada com contornos regulares, com o acrossomo recobrindo mais de um terço da superfície da cabeça. Foram analisadas 200 células e classificadas segundo os critérios de normalidade de KRUGER et al. (1986).

Quando a recuperação dos espermatozóides, realizada previamente, foi superior a cinco milhões por mililitro de sêmen, uma fração do ejaculado foi separada e submetida a um processo de lavagem e migração ascendente, para posterior recuperação de espermatozóides capacitados. O processo de lavagem consiste na mistura de um volume de sêmen para dois volumes de solução salina tamponada (meio de lavagem - *Nutrient Mixture F-10 Ham/Sigma* nº 6.635). A mistura foi centrifugada a 500g durante dez minutos e o sobrenadante desprezado. Após uma segunda lavagem, um volume de 1ml de meio de cultura (Ham-F10), contendo 30% de soro de cordão fetal (decomplementado e filtrado) foi delicadamente colocado sobre o *pellet*. A migração foi processada por um período de uma hora, a 37°C. O sobrenadante foi analisado quanto à concentração e à motilidade do espermatozóide. O teste de Percoll foi realizado nos casos em que a recuperação prévia de espermatozóides foi inferior a cinco milhões por mililitro de sêmen.

Técnica de Percoll: uma solução de Percoll pura (*Pharmacia Incorporation/Sigma* nº P-4.937) e o meio de cultura Ham F10 concentrado (10x) foram misturados numa relação de 9:1, para se obter uma solução isotônica denominada solução-mãe. Obtiveram-se concentrações decrescentes de Percoll, diluindo-se a solução-mãe com meio Ham F10.

Um gradiente descontínuo de Percoll foi preparado em um tubo estéril de poliestireno, colocando-se cuidadosamente no fundo do tubo concentração de 90% e posteriormente as concentrações de 65% e 35%, em partes iguais de 1ml. A seguir, a amostra de um mililitro de sêmen foi depositada no topo do

gradiente e centrifugada durante 15 minutos a 2.000rpm. Retiradas as camadas 65% e 35%, acrescentou-se 2ml de meio para lavagem, repetindo-se a centrifugação. Posteriormente retirou-se o sobrenadante e adicionou-se ao *pellet* 0,5 a 1ml de meio de cultura, dependendo da concentração do sêmen.

Para o estudo da integridade funcional da membrana do espermatozóide, realizou-se o teste hiposmótico, também chamado de *Swelling test*, baseado na técnica descrita por JEYENDRAN et al. (1984), e o teste da água (LOMEO & GIAMBERSIO, 1991).

Uma amostra de 100 μ l de sêmen foi misturada com 1ml de solução hipoosmótica (JEYENDRAN et al., 1984) e então incubados por 30 minutos a 37°C. Após a análise de 200 células sob microscópio de contraste de fase (400x), foram consideradas como positivas (normais) as amostras contendo pelo menos 60% de células de aspecto balonizado.

Para o teste da água foram misturados 0,1ml de sêmen com 0,4ml de água destilada, colocados sobre lâmina e recobertos por lamínula, incubados por cinco minutos a 37°C (LOMEO & GIAMBERSIO, 1991).

Analisaram-se pelo menos cem células, sob microscópio de contraste de fase, calculando-se a porcentagem de espermatozóides com a cauda balonizada. As amostras contendo 60% ou mais células com aspecto balonizado foram consideradas positivas.

Para a análise da maturidade do espermatozóide, utilizou-se o teste do azul de anilina que qualifica os espermatozóides como imaturos ou maduros. A coloração dos espermatozóides pelo azul de anilina pode colocar em evidência a persistência ou desaparecimento das proteínas básicas dentro do núcleo, as quais estão presentes no espermatozóide imaturo (TERQUEM & DADOUNE, 1983). Para este estudo, 100 µl de sêmen foram lavados e centrifugados por duas vezes em solução salina. Após, uma gota deste material foi distribuída em lâmina e corada segundo a técnica de azul de anilina (TERQUEM & DADOUNE, 1983). Analisaram-se pelo menos cem células, sob microscópio de contraste de fase, calculando-se a porcentagem de células azuis e brancas.

Após a punção folicular, cada oócito foi incubado em 0,9ml de meio de cultura (Ham F-10 + 30% de soro fetal). Um total de 50 a 100 mil espermatozóides, previamente capacitados, foi acrescentado para cada solução contendo um oócito. Os gametas foram incubados em estufa com atmosfera de CO₂ a 5% (*Forma Scientific*, USA). As células do *cumulus oophorus* foram removidas 16 a 20 horas após a inseminação, para determinar a presença do pronúcleo masculino e o número de corpúsculos polares. O critério de fertilização foi dado pela presença de dois pronúcleos e posterior surgimento de clivagem (TROUNSON et al., 1982).

3.9. PROCESSAMENTO DOS DADOS

Após a coleta das amostras, os dados obtidos foram registrados em uma ficha própria, desenvolvida para o estudo (ANEXOS 1 e 2).

3.10. ANÁLISE DOS DADOS

Foi inicialmente realizada uma análise descritiva, caracterizando-se o grupo estudado. Em seguida, foram aplicados testes comparativos entre dois grupos, de acordo com a resposta positiva ou negativa à fertilização. A associação entre a porcentagem de espermatozóides normais, progressivos rápidos, de forma agrupada e a concentração de espermatozóides de forma agrupada com a fertilização foi analisada através dos testes exato de Fisher e qui-quadrado (AGRESTI, 1990).

A partir das variáveis independentes foi feita a análise de regressão logística univariada, que consiste em estudar cada uma delas separadamente, com a variável dependente (presença ou ausência de fertilização). Essa análise é utilizada não só para identificar o quanto cada variável independente está associada com a fertilização individualmente, mas também para uma possível seleção das variáveis que posteriormente seriam analisadas no modelo múltiplo. Em uma segunda etapa foi realizada análise de regressão logística múltipla, a fim de identificar quais variáveis estariam, conjuntamente, explicando a probabilidade de fertilização (HOSMER & LEMESHOW, 1989). Para isto utilizou-se o processo de seleção *stepwise* que consiste em, a cada

passo, eleger uma variável independente com maior evidência de explicar a dependente verificando-se, posteriormente, se com a sua inclusão no modelo aquelas previamente escolhidas continuavam sendo significantes.

Para discriminar dois grupos quanto a presença ou ausência de fertilização utilizou-se o teste de Wilcoxon para grupos independentes considerando-se as características das amostras estudadas (HOLLANDER & WOLFE, 1973).

Com o intuito de descrever o potencial de fertilização de certas variáveis independentes, de interesse neste estudo, foi ajustada a curva ROC (*receiver-operating characteristic*). A curva ROC foi usada para descrever o desempenho de um teste em um espectro de pontos de corte. Mostra o contrabalanço entre a sensibilidade e a especificidade de um teste e pode, assim, ser usada para auxiliar na decisão de qual é o melhor ponto de corte para a variável independente em questão (THOMPSON & ZUCCHINI, 1989). Baseado neste ponto, estimou-se a razão de verossimilhança como um *odds* representando quantas vezes é maior a chance de fertilizar sobre não fertilizar, dado que a variável em questão representa uma mensuração maior ou igual ao ponto de corte estimado.

3.11. ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi realizado a partir de amostras de gametas analisadas de rotina no Laboratório de Genética da Reprodução do

CAISM/UNICAMP, sendo parte integrante do diagnóstico de fertilidade e do processo de fertilização *in vitro*. Foi mantido o anonimato, fora do laboratório, dos resultados de cada amostra, respeitando-se a DECLARAÇÃO DE HELSINKI II (1990).

4. Resultados

Foram avaliados 98 amostras seminais e 678 oócitos durante os procedimentos de Fertilização *in vitro* (FIV) realizados no Laboratório de Genética da Reprodução do CAISM/UNICAMP. Neste estudo, para cada variável analisada, foi calculado o valor médio e o erro-padrão. A idade média das mulheres foi de 32,8 $\pm$ 3,8 anos e a dos homens, 33,9 $\pm$ 5,3 anos.

O tempo médio de abstinência sexual, prévio à coleta do sêmen, foi de 3,8 $\pm$ 2,3 dias. No total de amostras analisadas, a concentração dos espermatozóides por mililitro de sêmen apresentou um valor médio de 108,6 $\pm$ 11,5 e um percentual médio de espermatozóides progressivos rápidos de 27,4 $\pm$ 1,34. A concentração média de leucócitos, por mililitro de sêmen, foi de 0,4 $\pm$ 1,2.

O teste da maturidade espermática foi realizado em 39 amostras e apresentou um percentual médio de 25,6 $\pm$ 24,3 de espermatozóides imaturos e 74,7 $\pm$ 24,4 de espermatozóides maduros. A TABELA 1 mostra a análise descritiva de algumas características do sêmen.

TABELA 1 - ANÁLISE DESCRITIVA DE DETERMINADAS CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS DE SÊMEN

Variável	n	Média	Erro-padrão	Variação	Mediana
Volume	98	3,0	0,16	0 - 12	2,8
Concentr	98	108,6	11,5	0,7 - 785	80
% mot_A	98	27,4	1,34	0 - 60	30
% mot_B	98	22,6	0,91	0 - 50	20
% mot_C	98	11,7	0,48	0 - 30	10
% vivos	92	67,4	1,32	30 - 92	70
% normais	87	33,9	2,08	8 - 75	28

Em 71 amostras de sêmen foi realizado o teste de integridade da membrana espermática (hiposmótico), obtendo-se um valor percentual médio de $71,0 \pm 12,3$. O teste da água, que também avalia a integridade da membrana espermática, foi realizado em 36 amostras e apresentou um valor percentual médio de $64,9 \pm 12,3$.

Após a capacitação do sêmen, utilizando-se a técnica de Percoll, não foi possível recuperar espermatozóides em duas amostras. As outras 96 amostras apresentaram um valor médio da concentração de espermatozóides por mililitro de sêmen compatível com $22,3 \pm 2,38$ milhões/ml, sendo um valor mínimo de 0,1 e máximo de 105 milhões. A média da porcentagem de espermatozóides recuperados do grau A (progressivos rápidos) foi de $90,0 \pm 22,2$.

A TABELA 2 mostra o número médio de óvulos que, após classificados, foram considerados aptos a fecundar e também a quantidade média de espermatozóides com que foi inseminado cada oócito, durante o processo de fertilização *in vitro*. Neste estudo, a quantidade média de microlitros utilizados por oócito foi de $52,3 \pm 6,78$ (mínimo de 5 e máximo de 400).

TABELA 2 - ANÁLISE DESCRITIVA DO NÚMERO MÉDIO DE ÓVULOS E ESPERMATOZÓIDES INSEMINADOS DURANTE A FIV

Variável	n	Média	Erro-padrão	Variação	Mediana
Óvulos	98	6,9	0,44	1 – 22	6
Nº spz/oócito	94	428.244	37.300	20.000 - 2.000.000	300.000

Das 98 amostras de sêmen incluídas no estudo, 29 não fertilizaram nenhum oócito (grupo I) e 69 amostras foram capazes de fertilizar pelo menos um oócito (grupo II).

As TABELAS 3 e 4 mostram a análise descritiva das variáveis estudadas, considerando o grupo que não fertilizou e aquele que fertilizou, respectivamente. A idade média das mulheres que não obtiveram fertilização foi de : $33,5 \pm 3,3$ anos e a dos homens $34,9 \pm 4,4$ anos e, nos casais em que pelo menos um oócito foi fertilizado, a idade média das mulheres foi de $32,5 \pm 3,9$ anos e dos homens $33,4 \pm 5,6$ anos. O tempo médio de abstinência sexual

(dias) no grupo que não fertilizou foi de 3,9 ? 2,2 e no grupo que fertilizou, 3,7 ?

2,3. O número médio de óvulos no grupo I foi de 4,2 ? 3,4 e no grupo II, 8 ? 4,4.

TABELA 3 - ANÁLISE DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO GRUPO QUE NÃO OBTEVE FERTILIZAÇÃO

Variável	n	Média	Erro-padrão	Variação	Mediana
Concentr	29	68,4	11,01	0,7 - 190	50
% mot_A	29	20	2,15	0 - 40	20
% vivos	26	64	2,55	34 - 85	65
% normais	23	28,1	3,96	8 - 68	20
% imaturos	12	37,7	8,72	1 - 85	31
% maduros	12	62,2	8,72	15 - 99	69
% spz MI	24	68,67	2,76	30 - 90	71
Conc. Rec.	28	12,9	3,78	0,1 - 100	6
% rec_A	26	80,5	6,20	2 - 100	100
Óvulos	29	4,24	0,64	1 - 14	3
ul/oócito	29	87,9	16,04	5 - 400	50
nº spz/oócito	28	471.250	89.820	20.000 - 2.000.000	300.000

TABELA 4 - ANÁLISE DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO GRUPO QUE OBTEVE FERTILIZAÇÃO

Variável	n	Média	Erro-padrão	Variação	Mediana
Concentr	69	125,5	15,21	9 - 785	93
% mot_A	69	30,4	1,54	10 - 60	30
% vivos	66	68,8	1,54	30 - 92	70
% normais	64	36,0	2,41	10 - 75	29,5
% imaturos	27	20,2	3,73	1 - 77	13
% maduros	27	80,2	3,77	23 - 99	87
% spz MI	47	72,14	1,70	10 - 90	72
Conc. Rec.	68	26,1	2,86	3 - 105	20
% rec_A	66	93,8	1,96	0 - 100	100
Óvulos	69	8,04	0,52	1 - 22	8
ul/oócito	67	36,9	5,97	5 - 200	10
nº spz/oócito	66	410.000	37.410	30.000 - 2.000.000	300.000

Posteriormente foram feitos testes comparativos para avaliar uma possível diferença entre o grupo que fertilizou (grupo I) e aquele que não fertilizou (grupo II), considerando as seguintes variáveis: Concentração espermática inicial; % de espermatozóides móveis do grau A; % de espermatozóides vivos; % de espermatozóides normais; % de espermatozóides maduros; % de espermatozóides com membrana íntegra; número de óvulos maduros; concentração de espermatozóides recuperados; número de microlitros utilizados na inseminação do oócito; número de espermatozóides inseminados por oócito. Neste estudo foi utilizado o teste de Wilcoxon para grupos independentes (TABELA 5).

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DE ALGUMAS VARIÁVEIS QUANTO A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE FERTILIZAÇÃO

Variável	Fertilização		p(*)
	Não	Sim	
Concentr	68,4	125,5	0,0074
% mot-A	20,0	30,4	0,0008
% vivos	64,0	68,8	n.s.
% normais	28,1	36,0	0,0375
% maduros	62,2	80,2	n.s.
% spz MI	68,67	72,14	n.s.
Óvulos	4,2	8,0	0,0001
Conc. Rec.	12,9	26,1	0,0003
?l/oócitos	87,9	36,9	0,0001
nº spz/oócito	471.250	405.454	n.s.

n.s. : não significativo

(*) Teste de Wilcoxon para amostras independentes

Logo foi realizada a Análise de Regressão Logística para verificar quais variáveis tinham influência na probabilidade de fertilizar. Primeiramente, foi feita a análise univariada, que consiste em estudar cada uma delas separadamente com a variável dependente fertilização *in vitro* (TABELA 6).

TABELA 6 - INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES, SOBRE A FERTILIZAÇÃO *in vitro*, DE ACORDO COM A ANÁLISE UNIVARIADA

Parâmetro	Coeficiente	Erro-padrão	X ²	p
Volume	0,1432	0,1522	0.8854	n.s.
Concentr.	0,0092	0,0039	5.5423	0,0186
% mot_A	0,0709	0,0213	11.1124	0,0009
% mot_B	-0,0200	0,0247	0.6585	n.s.
% mot_C	0,0006	0,0467	0.0002	n.s.
% vivos	0,0294	0,0181	2.6292	0,1049
% normais	0,0238	0,0144	2.7344	0,0982
% maduros	0,0301	0,0151	3.9899	0,0458
% spz MI ST	0,0225	0,0206	1.1970	n.s.
% spz MI A	0,0029	0,0301	0.0094	n.s.
Óvulos	0,2915	0,0796	13.3985	0,0003
Conc. Rec.	0,0385	0,0163	5.5569	0,0184
% rec_A	0,0248	0,0106	5.4796	0,0192
?l/oócito	-0,0124	0,0040	9.1983	0,0024
nº spz/oócito	0,0000	0,0000	0.5577	n.s.

n.s.: não significativo

Com o objetivo de avaliar determinadas variáveis independentes de forma agrupada, baseando-se em dados da literatura, foi ainda avaliado se existia associação entre algumas variáveis agrupadas e a fertilização. As variáveis estudadas em agrupamento foram: % normais; % mot_A e Concentração de espermatozóides (TABELAS 7, 8 e 9).

TABELA 7 - ASSOCIAÇÃO ENTRE A PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES NORMAIS, DE FORMA AGRUPADA, E A FERTILIZAÇÃO (SIM OU NÃO)

% normais	Fertilização		Taxa fertilização (%)
	Não	Sim	
5 a 14	6	3	33
> 14	17	61	78

Teste Exato de Fisher - (p-value = 0,0092)

TABELA 8 - ASSOCIAÇÃO ENTRE A PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES PROGRESSIVOS RÁPIDOS, DE FORMA AGRUPADA, E A FERTILIZAÇÃO (SIM OU NÃO)

% mot_A	Fertilização		Taxa fertilização (%)
	Não	Sim	
0 a 30	19	24	55,8
> 30	10	45	81,8

χ^2 - (p-value = 0,005)

TABELA 9 - ASSOCIAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES, DE FORMA AGRUPADA, E A FERTILIZAÇÃO (SIM OU NÃO)

Concentr	Fertilização		Taxa fertilização (%)
	Não	Sim	
0 a 20	10	2	16,7
> 20	19	67	77,9

Teste Exato de Fisher - (p-value = 0,000)

A partir dos resultados da análise univariada, as variáveis analisadas que apresentaram *p-value* < 0,1 foram consideradas para entrar na análise multivariada, e foram as seguintes: Concentração inicial de espermatozóides; porcentagem de espermatozóides do grau A; porcentagem de espermatozóides vivos; porcentagem de espermatozóides normais; porcentagem de espermatozóides maduros; número de óvulos maduros; número de microlitros inseminados por oócito; concentração de espermatozóides recuperados e porcentagem de espermatozóides recuperados do grau A.

Foi de interesse neste estudo avaliar o comportamento das variáveis: porcentagem de espermatozóides maduros e porcentagem de espermatozóides imaturos, apesar de não terem sido consideradas no modelo múltiplo devido ao número reduzido de casos.

Na análise univariada, da regressão logística, obteve-se que o parâmetro estimado para porcentagem de espermatozóides imaturos foi significativamente diferente de zero, indicando uma relação inversa quanto à possibilidade de fertilização e a porcentagem de espermatozóides maduros foi também significativa como fator preditor de fertilização (TABELA 10).

TABELA 10 - RESULTADO DA ANÁLISE UNIVARIADA CONSIDERANDO PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES IMATUROS E MADUROS

Variável	Coeficiente	p
% imaturos	-0,0298	0,0488
% maduros	0,0301	0,0458

Foi feita uma análise posterior, considerando um modelo múltiplo, onde todas as variáveis que apresentaram pelo menos um dos parâmetros sugestivos a entrar no modelo ($p < 0,1$) foram incluídas. A TABELA 11 apresenta o melhor modelo de ajuste, segundo o processo *stepwise*, para o conjunto de dados estudados.

TABELA 11 - VARIÁVEIS ASSOCIADAS À FERTILIZAÇÃO SEGUNDO RESULTADO DA REGRESSÃO LOGÍSTICA POR SELEÇÃO STEPWISE

Parâmetro	Coeficiente	Erro-padrão	X ²	p
média geral	-2,1823	0,8882	6,0376	0,0140
% mot_A	0,0668	0,0273	5,9933	0,0144
Óvulos	0,2404	0,0859	7,8349	0,0051

Com base nos parâmetros acima, obteve-se uma fórmula para estimar a probabilidade $\hat{p}(x)$ de fertilizar baseando-se na porcentagem de espermatozóides progressivos rápidos e número de óvulos maduros.

$$\hat{p}(x) = \frac{\exp [(-2,1823) + 0,0668 \times \% \text{ mot_A} + 0,2404 \times \text{Óvulos}]}{1 + \exp [(-2,1823) + 0,0668 \times \% \text{ mot_A} + 0,2404 \times \text{Óvulos}]}$$

Posteriormente, através da curva ROC (Figura 12), estimou-se a área sob a curva como uma medida do potencial da porcentagem de espermatozóides progressivos rápidos (% mot_A), em discriminar casos onde se verificou presença ou ausência de fertilização. Obteve-se um valor de 72,2% para esta medida.

Segundo a OMS uma amostra de sêmen considerada normal deve apresentar um valor superior a 30% de espermatozóides do grau A. Com base nesta informação e em dados da curva ROC, concluiu-se que o ponto de corte para porcentagem de espermatozóides com motilidade do grau A, foi: $\geq 30 / < 30$, cujos valores de sensibilidade e especificidade foram, respectivamente, de 65,2% e 65,5%.

Baseado nestes valores, estima-se que o *odds* de ocorrer a fertilização, dado que a porcentagem de espermatozóides móveis do grau A é superior a 30% é de 1,89, ou seja, as chances de fertilizar nesta circunstância é quase o dobro.

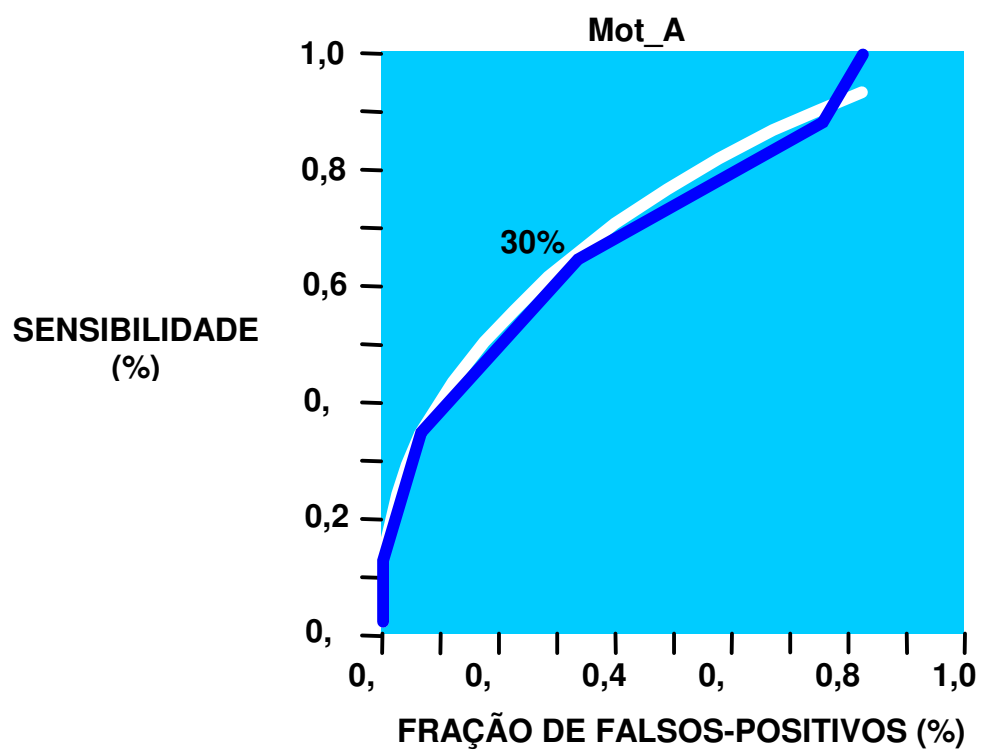


Figura 12. Curva ROC

5. Discussão

Neste estudo, avaliou-se a influência de algumas características do sêmen e oócitos sobre a fertilização *in vitro*, durante um programa de FIV. Concluída a análise de regressão logística, constatamos que a característica espermática de maior influência na fertilização do oócito *in vitro* foi a motilidade grau A, sendo que a taxa de fertilização melhorou consideravelmente (81,8% de oócitos fertilizados) quando a motilidade espermática do grau A foi superior a 30%. Um estudo realizado por MAHADEVAN & TROUNSOON (1984) demonstrou que a fertilização falhou quando a motilidade espermática inicial foi inferior a 20%, concluindo que a motilidade espermática e a porcentagem de espermatozóides normais estão associadas ao sucesso da FIV. Também EDWARDS, FISHEL, PURDY (1983) consideraram a motilidade espermática inicial inferior a 10% como fator indicador de falha na FIV. Em alguns trabalhos, a motilidade foi discretamente relacionada com a fertilização *in vivo*, encontrando-se algum valor preditivo somente quando as concentrações espermáticas foram inferiores a $5 \times 10^6/\text{ml}$ (ZAINI, JENNINGS, BAKER, 1985).

Estudos posteriores evidenciaram que a porcentagem de espermatozóides móveis mostrou-se fracamente relacionada às taxas de fertilização, quando outros parâmetros, como a morfologia, foram incluídos (LIU et al., 1988; LIU & BAKER, 1988; LIU et al., 1989a).

Quando avaliamos o teste de integridade funcional da membrana plasmática, não se observou influência significativa sobre a taxa de fertilização *in vitro*, de acordo com a análise univariada da regressão logística. JEYENDRAN et al. (1984), consideraram o teste hiposmótico um simples e útil teste para avaliar a função espermática. Entretanto, outros estudos não encontraram correlação significativa entre este teste e aquele que se refere à penetração de oócito de hamster (YANAGIMACHI, YANAGIMACHI, ROGERS, 1976), realizados em amostras de sêmen de um grande número de homens férteis e não-férteis (CHAN et al., 1985). Algumas publicações mostraram que os resultados do teste hiposmótico correlacionaram-se fortemente com a fertilização *in vitro* e as taxas de gravidez (CHECK et al., 1989). Estudo realizados por outros autores (BARRAT et al., 1989; CHAN et al., 1990) concluíram que o teste hiposmótico não teve valor prognóstico na taxa de fertilização *in vitro*. Os resultados do teste hiposmótico estão correlacionados com a concentração espermática, motilidade, morfologia normal e, particularmente, com a vitalidade, porém não se encontrou correlação significativa com a fertilização *in vitro* quando outros testes espermáticos, como a morfologia, foram incluídos na análise de regressão logística (LIU et al., 1988).

O teste da água (LOMEO & GIAMBERSIO, 1991), que também avalia a integridade funcional da membrana plasmática, apresentou, neste estudo, resultado semelhante ao teste tradicional descrito por JEYENDRAN et al., (1984).

Ao analisarmos a maturidade espermática, através do teste de azul de anilina (TERQUEM & DADOUNE, 1983), observamos uma predominância de espermatozóides maduros. Sabe-se que a porcentagem de espermatozóides imaturos é significativamente mais alta em uma população espermática anormal. Entretanto, 20% dos espermatozóides morfológicamente normais podem ser parcialmente ou totalmente corados pelo azul de anilina (DADOUNE, MAYAUX, GUILHARD-MOSCATO, 1988). Sabe-se, ainda, que a amostra de sêmen com motilidade alterada contém maior número de espermatozóides com núcleo imaturo, fortemente corados com azul de anilina (COLLEU et al., 1988).

Quando comparamos a variável maturidade quanto à presença ou ausência de fertilização, a mesma não se mostrou significativa, talvez devido ao número reduzido de casos, já que, quando utilizamos a análise univariada da regressão logística, observamos que a porcentagem de espermatozóides imaturos e maduros foram significativas, sendo a primeira como fator de risco e, a segunda, como fator protetor na fertilização.

As 96 amostras tratadas com a técnica de Percoll (GUÉRIN et al, 1989), apresentaram uma porcentagem média de espermatozóides recuperados do grau A, considerados progressivos rápidos, de 90% ± 22,2. Quando estudamos

esta variável, através da análise univariada, encontramos um valor significativo de influência na FIV. Este dado reforça a importância da qualidade da motilidade espermática sobre o resultado da fertilização *in vitro*. Cabe, ainda, salientar que as características do movimento celular, pós-migração ascendente ou descendente, estão diretamente relacionadas à qualidade de movimento apresentada pelo espermatozóide, previamente presente no líquido seminal.

Das 98 amostras estudadas, 29 não fertilizaram nenhum oócito e 69 foram capazes de fertilizar pelo menos um dos oócitos. Embora 60% a 80% dos oócitos fertilizem, 10% a 25% dos casais apresentam baixa (<20%) ou nenhuma taxa de fertilização (LIU & BARKER, 1994b). Ainda segundo estes autores (LIU & BAKER, 1994a;b), defeitos no óvulo não parece ser uma causa comum de baixa fertilização persistente. Na grande maioria dos casos com baixa fertilização (menos de 20% de óvulos maduros fertilizados), as causas são oligozoospermia severa, astenozoospermia, teratozoospermia ou cromossoma anormal associado a pouco ou nenhum espermatozóide na zona pelúcida (LIU & BAKER, 1992b ; FRANKEN et al., 1990). Entretanto, nos outros 25% dos pacientes, as causas não são tão óbvias. Um estudo deste grupo mostrou anormalidades na interação dos gametas. O distúrbio pode ocorrer durante a penetração na zona pelúcida, por um defeito, ou pelo não desencadeamento da reação acrossômica e também por uma morfologia alterada ou defeito no DNA da célula espermática (LIU & BAKER, 1992a). A penetração do espermatozóide na zona pelúcida está fortemente relacionada com a taxa de FIV em pacientes sem defeitos na morfologia espermática e no número de

espermatozóides presentes na zona pelúcida. Nos casos onde houver vários espermatozóides sobre a zona pelúcida, a falha na fertilização pode ocorrer devido a alterações na morfologia celular ou no DNA da célula (LIU & BAKER, 1994a;b).

Quando comparamos as variáveis envolvidas no processo de fertilização *in vitro* quanto à presença ou ausência de fertilização, encontramos uma diferença significativa na concentração inicial dos espermatozóides, na porcentagem de espermatozóides móveis do grau A; na porcentagem de espermatozóides normais; no número de óvulos maduros; na concentração de espermatozóides recuperados pós-Percoll (GUÉRIN et al, 1989) e no número de microlitros inseminados por oócito.

Considera-se, há vários anos, que a concentração de espermatozóides no ejaculado está relacionada à fertilidade masculina. A correlação do espermatozóide com a fertilidade foi originalmente apresentada em um artigo de MacLEOD & GOLD em 1951. Embora haja grandes variações deste parâmetro, entre ejaculados de um mesmo homem (MALLIDIS, HOWARD, BAKER, 1991), um grande número de homens inférteis tem concentração espermática inferior ($<20 \times 10^6/\text{ml}$) à concentração espermática de homens férteis (SILBER, 1989). De acordo com a WHO (1987), homens com concentração espermática inferior a $20 \times 10^6/\text{ml}$ são considerados subférteis. Por outro lado, têm ocorrido gravidezes com concentrações espermáticas muito baixas ($<1 \times 10^6/\text{ml}$) em casais subférteis (BOSTOFTE, SERUP, REBBE, 1982) durante tratamento por deficiência de gonadotrofina (BURGER & BAKER,

1984), durante a contracepção masculina (BARFIELD et al., 1979) e após vasectomia, previamente ao desaparecimento dos espermatozóides do sêmen.

O estudo de SCHOYSMAN & GERRIS (1982) acompanhou homens oligospermicos, cujas parceiras eram normais, por um período de 12 anos e observou que 3,9% dos casais cujos homens tinham concentração espermática entre 0,1 a 1×10^6 /ml conceberam em cinco anos, e 8,7% deles, em 12 anos. Aproximadamente 12% dos casais cujos homens possuíam concentração espermática entre 1 a 5×10^6 /ml tiveram seu filho em cinco anos e 26% em 12 anos. Os mesmos autores (SCHOYSMAN & GERRIS 1983), constataram que as porcentagens de homens com média de concentração espermática menor ou igual a 5,10,15 e 20 milhões/ml, cujas parceiras tinham concebido dentro de cinco anos, foram, respectivamente, 11%, 22%, 45% e 67%. Baseando-se nestes dados, pode-se deduzir que se a mulher é fértil, a gravidez poderá ocorrer, com o passar do tempo, mesmo em casos de concentração espermática muito baixa. Muitos outros estudos similares sobre a relação entre a concentração espermática e a fertilidade masculina estão resumidos em uma revisão feita por SILBER (1989).

Segundo essa revisão, baixas concentrações espermáticas estão associadas com baixa fertilidade, mas o valor preditivo da concentração de espermatozóides na fertilidade masculina não é muito preciso, pois alguns homens com uma concentração espermática reduzida podem engravidar sua parceira, e outros, com alta concentração espermática, não são capazes (SILBER, 1989).

Publicações de MAHADEVAN & TROUNSON (1984) e ACOSTA et al. (1989), demonstraram que a fertilização *in vitro* tem sido efetiva nos casos de oligoastenospermia não associada a teratospermia ou astenospermia.

A concentração espermática no meio utilizado para a inseminação do oócito foi relacionada com o número de espermatozóides na zona pelúcida e com a taxa de fertilização *in vitro*. Por outro lado, a concentração espermática no sêmen não apresentou valor preditivo para taxa de fertilização *in vitro* quando outras características espermáticas, tais como a morfologia, foram consideradas (LIU et al., 1988). Também neste estudo a concentração espermática no sêmen não mostrou influência na taxa de fertilização *in vitro* quando a vitalidade foi considerada. Quando estudamos a influência da concentração de espermatozóides inseminados por oócito, na análise univariada da regressão logística, não encontramos influência desta variável na probabilidade de fertilizar. E ainda, quando avaliamos a concentração de espermatozóides de forma agrupada (0 a 20 ou > 20), encontramos uma significativa diferença nas taxas de fertilização *in vitro* dos dois grupos, sendo 16,7% e 77,98% respectivamente.

A importância da morfologia espermática no diagnóstico da infertilidade masculina tem sido discutida por AITKEN et al., (1995); BARRAT (1995) OEHNINGER & KRUGER (1995) e SEIBEL & ZILBERSTEIN (1995); em recentes publicações. Considera-se a morfologia espermática uma característica de grande valor no diagnóstico da fertilidade masculina.

A investigação clínica da relação entre a qualidade do sêmen e as taxas de gravidez em um grande grupo de casais subférteis indicou que a morfologia espermática avaliada pelo método tradicional não apresentou valor preditivo significativo para a fertilidade (BAKER et al., 1985; ZAINI et al., 1985;). Estudos utilizando oócitos de hamster sugerem que espermatozóides com morfologia anormal têm reduzida habilidade para fertilizar quando comparados àqueles morfologicamente normais (ROGERS et al., 1983, KRUGER et al, 1988b).

LIU & BAKER (1992a) relataram que a maioria (80% a 100%) dos espermatozóides ligados à zona pelúcida tinham morfologia normal, o que caracteriza a zona pelúcida como altamente seletiva, ligando-se apenas a espermatozóides com morfologia normal. Foi ainda demonstrado que espermatozóides com morfologia anormal são duas vezes mais freqüentes em subpopulação de espermatozóides imóveis que naquela com espermatozóides móveis (MAKLER, 1988). Isto é concordante com estudos relatando que espermatozóides móveis selecionados após técnicas de *swim-up* ou Percoll têm, significativamente, melhor morfologia que espermatozóides no sêmen original (POUSSETTE et al., 1986; Le LANNOU & BLANCHARD, 1988). KATZ, DIEL, OVERSTREET (1982) publicaram que o espermatozóide morfologicamente normal locomove-se com mais rapidez, em trajetória retilínea, e com alta freqüência de batimento flagelar, quando comparado ao espermatozóide anormal. Foi também constatado que a velocidade do espermatozóide normal, penetrando no muco cervical, é superior à do espermatozóide anormal (KATZ et al., 1990).

A morfologia espermática, como parte integral da avaliação básica do sêmen, tem sido útil na condução dos casos severos ou moderados de infertilidade masculina. Isto vem sendo claramente demonstrado tanto em procedimentos de FIV como GIFT (KRUGER et al., 1988a; HINTING et al., 1990; MENKVELD et al., 1990; ENGINSU et al., 1991; GROW et al., 1994).

Considera-se a morfologia espermática como um dos mais significativos métodos preditores da taxa de fertilização *in vitro* (JEULIN et al., 1986; LIU et al., 1988; LIU & BAKER, 1988; LIU et al., 1989a;b).

A morfologia espermática, avaliada pelos critérios da OMS (WHO, 1987), mostrou um valor preditivo limitado nos resultados de FIV (KRUGER et al., 1988a; OEHNINGER et al., 1988; MENKVELD, et al., 1990; ENGINSU et al., 1991). Observações feitas por KRUGER et al.(1986; 1988a), sugeriram que a morfologia espermática, avaliada pelo critério estrito que considera como normais os espermatozóides com forma oval (MENKVELD et al., 1990), é o melhor parâmetro para prever a capacidade fertilizante, *in vitro*, de um espermatozóide.

Amostras de sêmen contendo um valor inferior a 14% de formas normais são considerados subférteis e aquelas contendo < 5% são consideradas severamente alteradas (KRUGER et al, 1993). Outros laboratórios têm desenvolvido diferentes critérios para a avaliação da morfologia espermática, chegando sempre a conclusões similares (HINTING et al., 1990; ENGINSU et al., 1991). Recentes estudos concordaram que a morfologia espermática

testada de acordo com o critério estrito (MENKVELD et al., 1990), que é um método relativamente simples e barato, proporciona informações semelhantes às aquelas obtidas através de outros testes mais complexos (FRANKEN et al., 1990; OEHNINGER et al., 1992) sendo também preditora dos resultados das taxas de gravidez *in vitro* ou *in vivo* (ENGINSU et al., 1991; KOBAYASHI et al., 1991; GROW et al., 1994).

Com o aperfeiçoamento do método para avaliar a morfologia espermática, homens com mais de 30% de espermatozóides morfologicamente normais raramente terão completa falha na fertilização *in vitro* (LIU et al., 1989a). Também um recente estudo realizado por GROW et al. (1994) mostrou significativa redução no potencial de fertilização no grupo de pacientes com formas normais inferiores ou iguais a 4%.

Neste estudo, quando avaliamos a importância da morfologia espermática na probabilidade de fertilizar, também encontramos um valor significativo. Posteriormente, quando avaliamos a morfologia (porcentagens normais), de forma agrupada (5% a 14% e $\geq 14\%$), observamos uma diferença significativa na taxa de fertilização entre os dois grupos, sendo que, quando a porcentagem de espermatozóides normais foi $\geq 14\%$, a taxa de fertilização foi de 78% e, quando variou entre 5% e 14%, a taxa de fertilização correspondeu a 33%.

Segundo OEHNINGER et al. (1988), em pacientes com teratospermia severa um aumento da concentração espermática no momento da FIV proporcionará uma maior taxa de fertilização, sem aumentar o risco de

polispermia. Portanto, nestes casos, os centros de FIV podem recorrer a um aumento da concentração de espermatozóides móveis de 0,3 a $1,0 \times 10^6/\text{ml}$, sempre que possível (GROW et al., 1994), caso não possam utilizar a técnica de injeção intracitoplasmática.

Devemos considerar algumas limitações durante a realização deste trabalho, principalmente no que diz respeito à análise subjetiva, tanto da morfologia quanto da motilidade espermática. Reconhece-se que o método manual ou subjetivo de avaliação, principalmente da motilidade, está sujeito a erros, também porque não se pode precisar características detalhadas do movimento espermático.

Atualmente, técnicas objetivas têm sido desenvolvidas para avaliar a motilidade espermática. Sistemas de computadores como o *Cellsoft* (Cryo Resources Ltd., New York, NY) e *Hamilton-Thorn HTM-2030 Motility Analyser* (HTMA) para análise espermática computadorizada proporcionam uma avaliação objetiva, permitindo a medida de características do movimento espermático, como velocidades espermáticas, velocidade curvilínea (VCL); velocidade retilínea (VSL), e média de velocidade, amplitude de batimento lateral da cabeça (ALH) e frequência de batimento da cauda.

Alguns estudos, servindo-se de técnicas antigas como o tempo de exposição à fotomicrografia, publicaram que a VCL, progressão linear e ALH, são úteis indicadores de infertilidade masculina (AITKEN, et al., 1982a,b). Similarmente, HOLT, MOORE, HILLIER (1985) publicaram que a VCL do

sêmen ejaculado, medida através de um sistema de análise de imagens, semi-automático, foi altamente correlacionado com a taxa de FIV. Também, CHAN et al. (1989) demonstraram que a VCL, em espermatozóides após *swim-up*, medida com o auxílio do *Cellsoft*, foi um útil preditor da taxa de FIV. JEULIN et al. (1986) mostraram que a ALH de espermatozóides móveis, selecionados através da técnica de *swim-up*, correlacionou-se com os resultados de FIV. LIU, CLARKE, BAKER (1991) estudaram a relação entre a motilidade objetiva do espermatozóide no sêmen e em meio de inseminação, medidas com o analisador de motilidade *Hamilton-Thorn* (HTM - 2030) e as taxas de FIV em 108 pacientes. Linearidade (VSL/VCL) e o VSL foram os parâmetros mais significativamente correlacionados com a taxa de FIV através da análise de regressão logística. Muitas outras características, como a ALH, não foram significativas. Portanto, o sistema de análise computadorizado é um método prático e objetivo de avaliação da velocidade e das características de movimento do espermatozóide. Entretanto, futuros estudos serão necessários para definir as características de movimento espermático que serão de maior utilidade clínica.

Concordando com os resultados deste estudo, está claro que uma das mais importantes características do espermatozóide humano é sua capacidade de movimento. Ele precisa deste movimento para penetrar no muco cervical e migrar através do trato genital até o local da fertilização. Em seguida, necessita da motilidade para penetrar no *cumulus* e na zona pelúcida do oócito. Amostras de sêmen com motilidade inferior a 50%, ou motilidade progressiva inferior a

25%, são tradicionalmente classificados como astenospérmicos e considerados subférteis (WHO, 1987). Amostras de sêmen com imotilidade espermática completa, como na Síndrome de Kartagener, são consideradas estéreis, porém, esta é uma causa rara de infertilidade masculina (AITKEN, ROSS LEES, 1983).

Como a análise seminal de rotina tem um valor clínico limitado, vários outros testes de avaliação espermática foram desenvolvidos recentemente. Embora alguns destes testes possam sugerir um maior potencial de fertilização, não está ainda claro que sejam úteis clinicamente.

A seleção de grupos de critérios diagnósticos para prever a incidência de gravidez espontânea ou taxas de sucesso de FIV foi feita por AITKEN, IRVINE, WU, 1991; LIU & BAKER, 1992b; BAKER, 1994. Os métodos de análise de regressão múltipla continuam sendo aperfeiçoados e sua eficácia analisada prospectivamente. Estes resultados têm sido úteis e benéficos, indicando a probabilidade de uma gravidez ocorrer dentro de um tempo específico. Por exemplo, um casal jovem, com uma curta duração de infertilidade e uma oligozoospermia moderada, poderá continuar tentando a gravidez natural por mais um ano antes de considerar a necessidade de FIV, já que eles têm chance de 50% de conceber naquele ano. Em contraste, um outro casal, com teratospermia mista severa (> de 95% de anormais) pode ser aconselhado a submeter-se à técnica de injeção intracitoplasmática, devido ao alto risco de falha na fertilização em FIV tradicional e baixa chance de concepção natural, devido à longa duração da infertilidade (BAKER, 1994).

A acurácia com que a infertilidade masculina pode ser diagnosticada será também confundida pela baixa reprodutibilidade inerente a muitos dos testes diagnósticos usados de rotina pela variabilidade da qualidade espermática, devido a fatores transitórios, como a abstinência, doença febril e estresse. Entretanto, é pouco racional esperar por um teste ou testes que indicarão, com absoluta certeza, que um homem seja fértil. Porém, freqüentemente é possível dar uma indicação de infertilidade relativa e, em algumas situações, indicar métodos racionais de tratamento. Nesse contexto, os modernos laboratórios de andrologia têm um importante papel a desempenhar na avaliação clínica da infertilidade.

A maioria dos homens que se consulta por infertilidade tem anomalias na qualidade espermática de severidade variada e etiologia pobremente entendida, ficando sem tratamento. Realmente, os dados gerados pela OMS (COMHAIRE et al., 1987) sobre 7.273 casais investigados em 33 centros, revelaram que a maioria das condições detectadas apresentava etiologia desconhecida. A alteração mais encontrada foi: distúrbios na qualidade espermática, incluindo oligoastenospermia ou teratospermia idiopáticas. Enquanto estas condições são freqüentemente encontradas nos homens inférteis, precisa ser enfatizado que termos como oligozoospermia são categorias descritivas, não diagnósticos. Na ausência de patologia definida, o princípio definidor destas categorias é essencialmente arbitrário e as classificações geradas sustentam poucas implicações terapêuticas. Embora tenha sido demonstrado que a fertilidade declina de acordo com baixa concentração

espermática ou pobre morfologia, estes critérios não definem uma patologia específica. Então, enquanto estes parâmetros não forem completamente estabelecidos, utilizaremos princípios arbitrários de normalidade. Por exemplo, falha completa de fertilização *in vitro* foi associada com baixo nível de adesão na zona pelúcida (LIU & BAKER, 1992b).

O conceito filosófico atual é que a fertilidade masculina seja definida baseando-se na concentração de espermatozóides móveis e morfologicamente normais. Entretanto, a experiência clínica revela que não é o número absoluto de espermatozóides que prediz a fertilidade, mas, sim, a sua competência funcional. Como resultado, testes *in vitro* continuam sendo desenvolvidos para avaliar a competência funcional destas células e predizer a capacidade fertilizante do espermatozóide humano com razoável acurácia.

6. Conclusões

1. As variáveis espermáticas que influenciaram ou não na fertilização do oócito *in vitro* foram:

- ? A concentração espermática inicial; a porcentagem de espermatozóides móveis do Grau A; a porcentagem de espermatozóides vivos; a porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais; a porcentagem de espermatozóides maduros, tiveram influência na fertilização do oócito *in vitro*.
- ? A porcentagem de espermatozóides com membrana íntegra não influenciou a fertilização *in vitro*.
- ? A concentração de espermatozóides recuperados e a porcentagem de espermatozóides do Grau A, pós-capacitação espermática, tiveram influência na fertilização *in vitro*.
- ? O número de microlitros utilizados para inseminação do oócito teve influência negativa sobre a fertilização do oócito *in vitro*, e o número de espermatozóides inseminados por oócito não teve influência na fertilização do oócito *in vitro*.

2. Quanto maior o número de óvulos maduros, maior a probabilidade de fertilizar.
3. A taxa de FIV aumentou significativamente quando a porcentagem de espermatozóides normais foi superior a 14%.
4. A taxa de FIV aumentou significativamente quando a motilidade espermática grau A foi superior a 30%.
5. A taxa de FIV aumentou significativamente quando a concentração espermática inicial foi superior a 20 milhões/ml.
6. As variáveis de maior influência na probabilidade de fertilizar foram: a porcentagem de espermatozóides móveis do grau A e o número de óvulos maduros.

7. Summary

This was a descriptive clinical study, which aimed at evaluating whether there is any influence in determined variables, among them some spermatic parameters and number of mature ovules, with regards of fertilization *in vitro* of human gametes. Ninety eight samples of semen and 678 oocytes of couples, attended at the Infertility Clinic of UNICAMP, were analyzed. The evaluation of the gametes and the technique of *in vitro* fertilization (IVF) were performed at the Laboratory of Genetics of Reproduction of CAISM. For the data analysis, the independent variables were: the sperm count in the fresh semen; the percentage of motile, live, normal, mature spermatozoa and those with complete membrane; the leucocyte concentration in semen; the concentration of spermatozoa and the percentage of rapid progressive spermatozoa recovered after spermatic capacitation; the number of microliters inseminated per oocyte and the number of mature ovules used in the process of *in vitro* fertilization. The dependent variable was the occurrence or not of fertilization of the oocyte *in vitro* and the rate of fertilization *in vitro*. During statistics evaluation an analysis of univariate logistic regression was done, followed by multiple

analysis. The variables with greater influence in the fertilization of the oocyte *in vitro* were: grade A motility and the amount of mature ovules. Others spermatic variables which influenced fertilization of the oocyte *in vitro* were: initial spermatic concentration; percentage of live spermatozoa; percentage of morphologically normal spermatozoa and percentage of mature spermatozoa. The amount of microliters used for the insemination of the oocyte had a negative influence on the fertilization *in vitro* of the oocyte. The rate of fertilization *in vitro* increased significantly when the percentage of normal spermatozoa was greater than 14%; grade A motility was greater than 30% and the spermatic concentration was greater than 20 million per milliliter of fresh semen. Data obtained from the ROC curve showed that the cut point for the percentage of spermatozoa with grade A motility was ≥ 30 / <30 , with sensitivity and specificity values at 65.2% and 65.5% respectively. Based on these values, the odds for fertilization, when the percentage of motile grade A spermatozoa is greater than 30%, is 1.89.

8. Referências Bibliográficas

ACOSTA, A.A.; OEHNINGER, S.; MORSHEDI, M.; SWANSON, R.J.; SCOTT, R.; IRIANNI, F. – Assisted reproduction and treatment of male factor. *Obstet. Gynecol. Surv.*, **44**:1-18, 1989.

AGRESTI, A.. – **Categorical data analysis**, New York, John Wiley & Sons Inc, 1990. 558p.

AITKEN, R. J.; BEST, F.S.M.; RICHARDSON, D.W.; DJAHANBAKHCH, O.; MORTIMER, D.; TEMPLETON, A. A., LEES, M.M. - An analyses of sperm function in cases of unexplained infertility: conventional criteria, movement characteristics, and fertilizing capacity. *Fertil. Steril.*, **38**: 212-21, 1982a.

AITKEN, R. J.; BEST, F.S.M.; RICHARDSON, D.W.; DJAHANBAKHCH, O.; MORTIMER, D.; TEMPLETON, A. A., LEES M.M.. - An analyses of semen quality na sperm function in case of oligozoospermia. *Fertil. Steril.*, **38**: 705-11, 1982b.

AITKEN, R.J.; ROSS, A.; LEES, M.M. - Analysis of sperm function in Kartagener's syndrome. *Fertil. Steril.*, **40**:696-8, 1983.

- AITKEN, R. J.; IRVINE, D.S.; WU, F.C. – Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **17**:542-51, 1991.
- AITKEN, R.J. – A free radical theory of male infertility – **Reprod. Fertil. Dev.**, **6**: 19-23, 1994.
- AITKEN, R. J.; BAKER, H.W.G.; IRVINE, D.S. - On the nature of semen quality and infertility. **Hum. Reprod.**, **10**: 248-9, 1995.
- ALMEIDA, M.; GAZAGNE, I.; JEULIN, C.; HERRY, M.; BELAISCH-ALLART, J.; FRYDMAN, R.; JOUANNET, P.; TESTART, J. – In-vitro processing of sperm with autoantibodies and in-vitro fertilização results. **Hum. Reprod.**, **4**:49-53, 1989.
- AMERICAN FERTILITY SOCIETY – Revised American Fertility Society classification of Endometriosis: 1985. **Fertil. Steril.**, **43**: 351-2, 1985.
- AMERICAN FERTILITY SOCIETY, FOR ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY (1994), Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1992 results generated from the American Fertility Society/ Society for Assisted Reproductive Technology Register. **Fertil Steril.**, **62**:1121-8, 1994.
- ANONYMOUS - **Guideline for practice: unexplained infertility**. Birmingham: The American Fertility Society, 1992.
- ARICI, A.; ORAL, E.; BUKULMEZ, O.; DULEBA, A.; OLIVE, D.L.; JONES, E.E. – The effect of endometriosis on implantation: results from the Yale University *in vitro* fertilization and embryo transfer program. **Fertil. Steril.**, **65**:603-7, 1996.

- ASCH, R.H.; BALMACEDA, J.P.; ELLSWORTH, L.R.; WONG, P.C. - Preliminary experiences with gamete intrafallopian transfer (GIFT)?. **Fertil. Steril.**, **45**:366-71, 1986.
- BAKER, H.W.G.; BURGER, H.G.; DE KRETZER, D. M.; HUDSON, B.; RENNIE, G.C.; STRAFFON, W.G.E. - Testicular vein ligation and fertility in men with varicoceles. **Br. Med. J.**, **291**:1678-80, 1985.
- BAKER, HWG – Male infertility. In: DeGROOT, L.J. (ed). - **Endocrinology**. 3ed. W.B. Saunders, Orlando, 1994. p. 2404-15.
- BALMACEDA, J.P.; GASTALDI, C.; REMOHI, J.; BORRERO, C.; ORD, T.; ASCH, R.H. - Tubal embryo transfer as a treatment for infertility due to male factors. **Fertil. Steril**, **50**:476-9, 1988.
- BARFIELD, A.; MELO, J.; COUTINHO, E.; ALVAREZ-SANCHEZ, F.; FAUNDES, A.; BRACHE, V.; LEON, P.; FRICK, J.; BARTSCH, G.; WEISKE, W.H.; BRENNER, P.; MISHELL, D.; BERNSTEIN, G.; ORTIZ, A. - Pregnancies associated with sperm concentration below 10 million/ml in clinical studies of potential male contraceptive method, monthly depot medroxyprogesteron acetate and testosterone esters. **Contraception**, **20**: 121-7, 1979.
- BARRATT, C.L.R.; OSBORN, J.C.; HARRISON, P.E.; MONKS, N.; DUNPHY, B.C.; LENTON, E.A. et al. - The hypo-osmotic swelling test the sperm mucus penetration test in determining fertilization of human oocyte. **Hum. Reprod.**, **4**:430-4, 1989.
- BARRATT, C.L.R. - On the accuracy and clinical value of semen laboratory tests. - **Hum. Reprod**, **10**:250-2, 1995.

- BATTAGLIA, D.E.; KOEHLER, J.K.; KLEIN, N.A.; TUCKER, M.J. – Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm. **Fertil. Steril.**, **68**:118-22, 1997.
- BERGER, T.; MARRS, R.P.; MOYER, D.L. – Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. **Fertil. Steril.**, **43**:268-73. 1985.
- BOSTOFTE, E.; SERUP, J.; REBBE, H. - Relation between sperm counts and semen volume and pregnancies obtained during a twenty year follow up period. **Int. J. Androl.**, **5**:267-75, 1982.
- BORDSON, B.L. & LEONARDO, V.S. - The appropriate upper age limit for semen donors: a review of the genetic effects of paternal age. **Fertil. Steril.**, **56**: 397-401, 1991.
- BURGER, H.G. & BAKER, H.W.G. - Therapeutic considerations and results of gonadotrophin treatment in male hypogonadotropic hypogonadism. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **438**:447-52, 1984.
- BUSSACA, M.; VIGANO, P.; MAGRI, B.; VIGNALI, M. – The adhesion molecules on human endometrial stromal cells. Immunological implications. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **734**: 43-6, 1994.
- CATES, W. & WASSERHEIT, J.N. – Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **164**: 1771-81, 1991
- CHAN, S.Y.W.; FOX, E.J.; CHAN, M.M.C; TSOI, W.; WANG, C.; TANG, L.C.H.; TANG, G.W.K.; PARK-CHUNG, H.O. - The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analyses and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay - **Fertil. Steril.**, **44**:668-72, 1985.

- CHAN, S.Y.W.; WANG, C.; CHAN, S.T.H; HO, P.C.; SO, W.W.K. - Predictive value of sperm morphologie and movement characteristics in the outcome of *in vitro* fertilization of human oocytes. **J. Int. Vitro Fert. Embryo Transfer**, **6**:142-8, 1989.
- CHAN, S.Y.W.; WANG, C.; CHAN, S.T.H; HO, P.C. - Differential evaluation of human sperm hypoosmotic swelling test and its relationship with the outcome of in vitro fertilization of human oocytes. **Hum. Reprod.**, **5**:84-8, 1990.
- CHANDLEY, A.C. - The chromosomal basis of human infertility. **Br. Med. Bull.**, **35**:181-6, 1979.
- CHANG, M.C. - Fertilization of rabbit ova in vitro. **Nature**, **184**:466-7, 1959.
- CHECK, J.H.; EPSTEIN, R.; NOWROOZI, K.; SHANIS, B.S.; WU, C.H., BOLLENDORF, A. - The hypoosmotic swelling test as a useful adjunct to the sêmen analysis to predictive fertility potential. **Fertil. Steril.**, **52**:159-61, 1989.
- CLARKE , G.N.; LOPATA, A.; McBAIN, J.C.; BAKER, H.W.G.; JONHSTON, W.I.H. Effect of sperm antibodies in males on human *in vitro* fertilization. **Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.**, **8**:62-6, 1985.
- CLERMONT, Y. - The cycle of the seminiferous epithelium in man. **Am. J. Anat.**, **112**:35-51, 1963.
- COLLEU, D.; LESCOAT, D.; BOUJARD, D.; LE LANNOU, D. - Human sperm nuclear maturity in normozoospermia and asthenozoospermia. **Arch. Androl.**, **21**: 155-62, 1988.
- COLLEU, D.; LESCOAT, D.; GOURANTON, J. – Nuclear maturity of human spermatozoa selected by swim up or by Percoll gradient centrifugation procedures. **Fertil. Steril.**, **65**:160-4, 1996.

COMHAIRE, F.H.; DE KRETZER, D.; FARLEY, T.M.M.; ROWE, P.J. - Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *Int. J. Androl.*, **7**(suppl.):1-53, 1987.

CRAFT, I – In vitro fertilization. Clinical methodology. *Br. J. Hosp Med.*, **31**:90-4, 1984.

DADOUNE, J.P.; MAYAUX, M.J.; GUIHARD-MOSCATO, M.L. - Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*, **20**:211-7, 1988.

DAUZIER. L.; THIBAUT C.; WINTENBERGER S. - La fecundation in vitro de l'oeuf de la lapine. *Comp. Rendus Acad. Scienc.*, **238**:844-5, 1954.

DECHAUD, H.; DAURES, J.P.; ARNAL, F.; HUMEAU, C.; HEDON, D. – Does previous salpingectomy improve implantation and pregnancy rates in patients with severe tubal factor infertility who are undergoing *in vitro* fertilization? A pilot prospective randomized study. *Fertil. Steril.*, **69**: 1020-5, 1998.

DECLARACIÓN DE HELSINKI.- Recomendaciones para guiar a los médicos en la investigación biomédica en seres humanos. *Bol. Sanit. Panam.*, **108** (5-6): 626-9, 1990.

DEVROEY, P.; BRAECKMANS, P.; SMITZ, J.; WAESBERGHE, L.; WISANTO, A.; VAN STEIRTEGHEM, A.; HEYTENS, L.; CAMU, F. - Pregnancy after translaparoscopic zygote intrafallopian transfer in a patient with sperm antibodies. *Lancet* **1**:1329, 1986.

DREVIUS, L. O. The 'sperm – rise' test. *J. Reprod. Fertil.* **24**:427-9, 1971.

- EDWARDS, R.G., DONAHUE, R.P., BARAMKI Jr., T.A., JONES, H.W. - Preliminary attempts to fertilize human oocytes matured *in vitro* - **Am. J. Obstet. Gynecol.** **96**:192-200, 1966.
- EDWARDS, R.G.; FISHEL, S. B.; PURDY, J. – In vitro fertilization of human eggs: analysis of follicular growth, ovulation fertilization. In: BEIER, H.M. & LINDENER, H.R. **Fertilization of human eggs in vitro**. Berlin, Springer-Verlag, 1983. p.169-75.
- EDWARDS, R.G. – Recent analyses on implantation in mammals. In: FILICORI, M. & FLAMIGNI, C. (eds.) – **Treatment of infertility: the new frontiers**. Bologna, Communication media for education, 1998. p.29-35.
- ENGINSU, M.E.; DUMOULIN, J.; PIETERS, M.; BRAS, M.; EVERS, J.; GERAEDTS, J. - Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quick staining: correlation of morphology with fertilization in vitro. **Hum. Reprod.**, **6**:854-9, 1991.
- FILICORI, M. & FLAMIGNI, C. (eds.). - **Ovulation induction update '98**. The Parthenon Publishing Group Limited, Carnforth, Lancs., UK, 1988.
- FRANKEN, D. R.; KRUGER, T.F.; MENKVELD, R; OEHNINGER, S.; CODDINGTON, C.C.; HODGEN, G.D. – Hemizona assay and teratozoospermia: increasing sperm insemination concentration to enhance zona pellucida binding. **Fertil Steril**, **54**:497-503, 1990.
- GARDNER, D.K.; SCHOOLCRAFT, W.B.; WAGLEY, L.; SCHLENKER, T.; STEVENS, J.; HESLA, J. – A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in vitro fertilization. **Hum. Reprod.**, **13**:3434-40, 1998.

- GLEICHER, N.; FRIBERG, J.; FULLAN, N.; GIGLIA, R.V.; MAYDEN, K.; KESTY, T. SIEGEL, I. - Egg retrieval for *in vitro* fertilization by sonographically controlled vaginal culdocentesis. **Lancet**, **2**:508, 1983.
- GORUS, F.K. & PIPELEERS, D.G. - A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. **Fertil. Steril.**, **35**:662-5, 1981.
- GROW, D.R.; OEHNINGER, S.; SELTMAN, H.J.; TONER, J.P.; SWANSON, R.J.; KRUGER, T.F.; MUASHER, S.J. - Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large *in vitro* fertilization population. **Fertil. Steril.**, **62**:559-67, 1994.
- GUÉRIN, J.F.; MATHIEU, C.; PINATEL, M.C.; LORNAGE, J.; BOULIEU, D. - Improvement of survival and fertilizing capacity of human spermatozoa tested in a *in vitro* fertilization program by selection on discontinuous Percoll gradients - **Hum. Reprod.**, **4**:798-804, 1989.
- HARRIS, J.; MILLIGAN, M.P.; MASSON, G.M.; DENNIS, K.J. - Improved separation of motile sperm in asthenospermia and its application to artificial insemination homologos. **Fertil. Steril.**, **36**:219-21, 1981.
- HEAPE W. - Preliminary note on the transplantation and growth of mamalian ova within a uterine foster mother. **PROC R SOC.**, **48**:457-8, 1891.
- HEUCHEL, V.; SCHWARTZ, D.; PRICE, W. - Within subject variability and the importance of abstinence period for sperm count, semen volume and prefreeze and post-thaw mobility. **Andrologia**, **13**:479-85, 1981.
- HINTING, A.; COMHAIRE, F.; VERMEULEN, L.; DHORT, M.; VERMEULEN, A.; VANDEKERCKHOVE, D. - Value of sperm characteristics and the results

of *in vitro* fertilization for predicting the outcome of assisted reproduction.
Int. J. Androl., **13**:59-66, 1990.

HOSMER, D.W. & LEMESHOW, S. - **Applied Logistic Regression**. New York, John Wiley & Sons Inc, 1989.

HOLLANDER, M. & WOLFE, D.A. – **Nonparametric Statistical Methods**. New York, John Wiley & Sons Inc, 1973. 503p.

HOLT, WV; MOORE, H.D.M.; HILLIER, S.G. - Computer-assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: correlation of results with *in vitro* fertilization assays. **Fertil. Steril.**, **44**:112-9, 1985.

JEULIN, C.; FENEUX, D.; SERRES, C.; JOUANNET, P.; GUILLET-ROSSO, F.; BELAISCH-ALLART, J. - Sperm factors related to failure of human *in vitro* fertilization. **J. Reprod. Fertil.**, **76**:735-44, 1986.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PERES-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. -Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fertil.**, **70**:219-28, 1984.

JOEL, C.A. - Historical survey of research on spermatozoan from antiquity to the present.. In: JOEL, C.A. - **Fertility disturbances in men and women**. Karger, Bâle, 1971.p.3-47.

JONES, H.W.JR.; JONES, G.S.; ANDREWS, M.C.; ACOSTA, A.; BUNDREN, C.; GARCIA, J.; SANDOW, B.; VEECK, L.; WILKES, C.; WITMYER, J.; WORTHAM, J.E.; WRIGHT, G. - The program for *in vitro* fertilization at Norfolk. **Fertil Steril.**, **38**:14-21, 1982.

JONES, H. W. JR. - In the beginning there was Bob. **Hum. Reprod.**, **6**:5-7, 1991.

JOUANNET, P. - Exploration du testicule exocrine. In: MAUVAIS-JARVIS, P. (ed) - **Medicine de la reproduction masculine**. 2ed., France, 1986. p.211-28.

KATZ, D.F.; DIEL, L.; OVERSTREET, J.W. - Differences in the movement of morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa. **Biol. Reprod.**, **26**: 556-70, 1982.

KATZ, D.F.; MORALES, P.; SAMUELS, S.J.; OVERSTREET, J.W. - Mechanisms of filtration of morphologically abnormal human sperm by cervical mucus. **Fertil. Steril.**, **54**:513-6, 1990.

KOBAYASHI, T.; JINNO, M.; SUGIMURA, K.; NOZAWA, S.; SUGIYAMA, E.; IIDA, E. Sperm morphological assessment based on strict criteria and IVF outcome. **Hum. Reprod.**, **6**:983-6, 1991.

KRUGER, T.F.; MENKVELD, R.; STANDER, F.S.H.; LOMBARD, C.J.; VAN DER MERWER, J.P.; VAN ZYL, J.A.; SMITH, K.. Sperm morphologic features as a prognostic factor *in vitro* fertilization. **Fertil. Steril.**, **46**:1118-23, 1986.

KRUGER, T.F.; ACOSTA, A. A.; SIMMONS, K.F.; SWANSON, R.J.; MATTA, J.F.; OEHNINGER, S. Predictive value of abnormal sperm morphology in *in vitro* fertilization. **Fert. Steril.**, **49**:112-7, 1988a.

KRUGER, T.F.; SWANSON, R.J.; HAMILTON, M.; SIMMONS, K.; ACOSTA, A.A.; MATTA, J.F.; OEHNINGER, S.; MORSHEDI, M. - Abnormal sperm morphology and others semen parameters related to the outcome of the hamster oocyte human sperm penetration as assay. **Int. J. Androl.**, **11**:107-13, 1988b.

KRUGER, T.; DUTOIT, T.; FRANKEN, D.; ACOSTA, A. A.; OEHNINGER, S. MENKVELD, R.; LOMBARD, C. - A new computerized method of reading

(striter criteria) is as efficient as technician reading. **Fertil. Steril.**, **59**:202-9, 1993.

Le LANNOU, D. & BLANCHARD, Y. - Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim up procedure. **J. Reprod. Fertil.**, **84**: 551-6, 1988

LENZ, S.; LAURITSEN, G.; KJELLOW, M. - Collection of human oocytes for IVF by ultrasonically guided follicular puncture. **Lancet**, **1**:1163, 1981.

LIU, D.Y. & BAKER, H.W.G. - The proportion of human sperm with poor morphology but normal intact acrosomes detected with pisum sativum agglutinin correlates with fertilization in vitro. **Fertil. Steril.**, **50**:288-93, 1988.

LIU, D.Y.; DU PLESSIS, Y.P.; NAYUDU, P.L.; JOHNSTON, W.I.H.; BAKER, H.W.G. - The use of *in vitro* fertilization to evaluate putative tests of human sperm function. **Fertil. Steril.**, **49**:272-7, 1988.

LIU, D.Y.; CLARKE, G.N.; LOPATA, A., JOHNSTON, W.I.H.; BAKER, H. W. G. - A sperm-zona pellucida binding test and *in vitro* fertilization. **Fertil. Steril.**, **52**:281-7, 1989a.

LIU, D.Y.; LOPATA, A.; JONHSTON, W.I.H.; BAKER, H.W.G. - Human sperm zona-binding, sperm characteristics and *in vitro* fertilization. **Hum. Reprod.**, **4**:696-701, 1989b.

LIU, D.Y.; CLARKE, G.N.; BAKER, H. W. G. - Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn Motility Analyser and fertilization rates *in vitro*. **J. Androl.**, **12**:231-9, 1991.

- LIU, D.Y. & BAKER, H.W.G. - Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, **94**:71-84, 1992a.
- LIU, D.Y. & BAKER, H.W.G. - Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphologie, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates *in vitro*. **Fertil. Steril.**, **58**:1178-84, 1992b.
- LIU, D.Y. & BAKER, H.W.G. - A new test for the assesement of sperm-zona pellucida penetration: relationship with results of other sperm tests and fertilization *in vitro*. **Hum. Reprod.**, **9**:489-96, 1994a.
- LIU, D.Y. & BAKER, H.W.G. – Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona pellucida penetration and reduced fertilization *in vitro*. **Hum. Reprod.**, **9**:1694-700, 1994b.
- LIU, J. NAGGY, Z.; JORIS, H.; TOURNAYE, H.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A. – Successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection in patients with globozoospermia. **Hum. Reprod.**, **10**:626-9, 1995.
- LOMEO, A.M. & GIAMBERSIO, A.M.; - Water-test: a simple method to assess sperm-membrane integrity. **Int. J. Androl.**, **14**:278-82, 1991.
- LOPATA, A., PATULLO, J.M.; CHANG, A.; JAMES, B. - A method for colletion motile spermatozoa from human semen. **Fertil. Steril.**, **27**: 677-84, 1976.
- LOPATA, A.; JONHSTON, I.W.H.; HOULT, I.J.; SPEIRS, A.I. - Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by *in vitro* fertilization of a preovulatory egg. **Fertil. Steril.** **33**:117-21, 1980.

- MacLEOD, J.M. & GOLD, R.Z. - The male factor in fertility and infertility. II Spermatozoon counts in 1.000 men of known fertility and in 1.000 cases of infertile marriage. **J. Urol.**, **66**:436-49, 1951.
- MAKLER, A. - Modern methods in semen analysis evaluation. In: BERHMAN, S. J.; KISTNER, J.W.Jr.; PATTON, J.W. (eds.) - **Progress infertility. Boston.** Little Brown and company, 1988. p.633-61.
- MALLIDIS, C.; HOWARD, E.J.; BAKER, H.W.G. - Variation of semen quality in normal men. **Int. J. Androl.** **14**:99-107, 1991.
- MAHADEVAN, M. M. & TROUNSOON, A. O. - The influence of seminal characteristics on the success rate of human *in vitro* fertilization. **Fertil. Steril.**, **42**:400-5, 1984.
- MANHES, H. & HERMABESSIEREN, J. - Fécondation Intrapéritonéal. Première grossesse obtenue sur indication masculine. Oral Presentation. In: 3^e INTERNATIONAL FORUM OF ANDROLOGY. june 1985, Paris, France.
- MAROULIS, G.B.; EMERY, M.; VERKAUF, B.S.; SAPHIER, A.; BERNHISEL, M.; YEKO, T.R. – Prospective randomized study of human menotropin versus a follicular and a luteal phase gonadotropin-releasing hormone analog-human menotropin stimulation protocols for *in vitro* fertilization. **Fertil. Steril.**, **55**:1157-64, 1991.
- MAUVAIS-JARVIS, P. **Medicine de la reproduction masculine.** 2ed., France, 1986. 453p.
- McCLURE, R.D.; NUNES, L.; TOM, R. - Semen manipulation: improved sperm recovery and function with a two-layer Percoll gradient. **Fertil. Steril.**, **51**: 874-7, 1989.

- MENGE, A.C. & BEITNER, O. - Interrelationships among semen characteristics, antiesperm antibodies, and cervical mucus penetration assays in infertile human couples. **Fertil. Steril.**, **51**:486-92, 1989.
- MENKIN, M.F. & ROCK, J. - In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **55**:440-51, 1948.
- MENKVELD, R.; STANDER, F.S.H.; KOTZE, T.J.W.; KRUGER, T.F.; VAN ZYL, J.A. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. **Hum. Reprod.**, **5**:586-92, 1990.
- MORTIMER, S.T. & MORTIMER, D. – Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. **J. Androl.**, **11**:195-203, 1990.
- MILLER, K.A.; PITTAWAY, D.E.; DEATON, J.L. - The effect of serum from infertile women with endometriosis on fertilization and early embryonic development in a murine *in vitro* fertilization model. **Fertil. Steril.**, **64**:623-6, 1995.
- MURRAY, D.L.; SAGOSKIN, A. W.; WIDRA; E.A.; LEVY, M.J. – The adverse effect of hydrosalpinges on *in vitro* fertilization pregnancy rates and the benefit of surgical correction. **Fertil. Steril.**, **69**:41-5, 1998.
- NAVOT, D.; MUASHER, S.J.; OEHNINGER, S.; LIU, H.C.; VEECK, L.L.; KREINER, D.; ROSENWAKS, Z.- The value of *in vitro* fertilization for the treatment of unexplained infertility. **Fertil. Steril.**, **49**:854-7, 1988.
- NIESCHLAG, E.; LAMMERS, C.; FREISCHEM, C.W.; LANGER, K.; WICKINGS, E.J. - Reproductive function in young fathers and grandfathers. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **55**:676-81, 1982.

- OEHNINGER, S.; ACOSTA, A. A.; MORSHEDI, M.; VEECK, L.; SWANSON, R.J.; SIMMONS, K.; ROSENWAKS, Z. - Corrective measures and pregnancy outcome in *in vitro* fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. **Fertil. Steril.**, **50**:283-7, 1988.
- OEHNINGER S.; TONER J. P.; MUASHER, S. J.; CODDINGTON, C.C.; ACOSTA, A. A., HODGEN, G.D. – Prediction of fertilization in vitro with human gametes: is there a litmus test? **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **167**: 1760-7, 1992.
- OEHNINGER, S. & KRUGER, T. - The diagnosis of male infertility by semen quality: Ciclical significance of sperm mophology assessment. - **Hum. Reprod.**, **5**:1037-41, 1995.
- OHMORI, K.; MATSUDA, T.; HORII, Y.; YOSHIDA, O. – Three cases with different types if short-tailed spermatozoa. **Urol. Int.**, **50**:174-8, 1993.
- OLIVENNES, F.; FANCHIN, R.; BOUCHARD, P.; TAIEB, J.; SELVA, J.; FRYDMAN, R. – Schedule administration of a gonadotrophin-releasing hormone antagonist (Cetrorelix) on day 8 of in-vitro fertilization cycles: a pilot study. **Hum. Reprod.**, **10**:1382-6, 1995.
- PALERMO, G.; DEVROEY, P. CAMUS, M., GRAUWE, E.De., KHAN, I.; STAESSEN, C.; WISANTO, A.; VAN STEIRTEGHEM, A.C.- Zygote intra-fallopian transfer as an alternative treatment for male infertility. **Hum. Reprod.** , **4**:412-5, 1989.
- PALERMO, G.; JORIS, H.; DEVROEY, M.P.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. - Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. **Lancet**, **340**:17-8, 1992.

PINCUS, G.-Observations on the living eggs of the rabbit. **Proc. R. Soc. Lond. (Biol)**, 107:132-69,1930.

PINCUS, G. & ENZMANN, E.V. - Can mammalian eggs undergo normal development in vitro? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 20:121-2, 1934.

PITTAWAY, D.E. – Diagnosis of endometriosis. **Infertil. Reprod. Med. Clin. North Am.**, 3:619-31, 1992.

POUSSETTE, A.; AKERLOF, E.; ROSENBORG, L.; FREDRICSSON, B. - Increase in progress motility and improved morphology of human spermatozoa following their migration through Percoll gradients. **Int. J. Androl.**, 9:1-13, 1986.

ROBERTSON, L.; WOLF, D.P.; TASH, J.S. – Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. **Biol. Reprod.**, 39:797-805, 1988.

RON-EL, R.; HERMAN, A.; GOLAN, A.; NACHUM, H.; SOFFER, Y.; CASPI, E. – Gonadotropins and combined gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropins protocols in a randomized prospective study. **Fertil. Steril.**, 55:574-8, 1991.

ROGERS, B.J.; BENTWOOD, B.J.; VAN CAMPDEN, H.; HELMBRECHT, G.; SODERDAHL, D.; HALE, R.W. - Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. **J. Androl.**, 4: 119-25, 1983.

ROWE, P.J.; COMHAIRE, F.H.; HARGREAVE, T.B.; MELLOWS, H.J., WHO **Manual for the Standardized Investigation of the Infertile Couple**. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1993.

- RUTHERFORD, A.J., SUBAK-SHARPE, R.J.; DAWSON, K.J.; MARGARA, R.A.; FRANKS, S.; WINSTON, R.M. - Improvement of *in vitro* fertilization after treatment with buserelin, na agonist of luteinising hormone releasing hormone. **Br. Med. J.**, **296**:1765-8, 1988.
- SCHMIADY, H.; RADKE, E.; KENTENICH, H. – Round-headed spermatozoa – contraindication for IVF. **Geburt. Fruenh.**, **52**:301-3, 1992.
- SCHWARTZ, D.; MAYAUX, M.J.; SPIRA, A.; MOSCATO, M.L.; JOUANNET, P.; CZYGLIK, F.; DAVID, G. - Semen characteristics as a function of age in 833 fertile men. **Fertil. Steril.**, **39**:530-5, 1983.
- SCHOYSMAN, R. & GERRIS, J. - Fertility potential of sperm with regard to duration of infertility or the time factor. In: INTERNATIONAL ANDROLOGY SYMPOSIUM, Pisa, Italy, 1982.
- SCHOYSMAN, R. & GERRIS, J. - Twelve year follow up study of pregnancies rates in 1921 couples with idiopathically impaired male fertility. **Acta Eur. Fertil.**, **14**:51-5, 1983.
- SEIBEL, M.M. & ZILBERSTEIN, M. - The diagnosis of male infertility by semen quality: the shape of sperm morphology. - **Hum. Reprod.**, **10**:247-8, 1995.
- SILBER, S.J. - The relationship of abnormal semen parameters to male fertility. **Hum. Reprod.**, **4**:947-53, 1989.
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. – Estatistical Methods. 7^a Ed. Ames: Iowa State Univ. Press, 1980.
- SOUFIR, J.C. - Exploration Biochimique du sperme humain. in: Mauvais-Jarvis P. Schaison G., Bouchard P., Mahoudeau J., Labrie F., ed. - **Médecine de la Reproduction Masculine**. 2.ed. Paris, 1986. p.69-83.

- SPIRA, A. & MULTIGNER, L. - The effect of industrial and agricultural pollution on human spermatogenesis. ***Hum. Reprod.***, **13**:2041-2, 1998.
- STEPTOE, P.C. & EDWARDS, R.G. - Birth after the reimplantation of a human embryo. ***Lancet***, **2**:366, 1978.
- STRANDELL, A., THORBURN J., HAMBERGER, L – Risk factors for ectopic pregnancy in assisted reproduction. ***Fertil . Steril.***, **71**:282-6, 1999.
- TERQUEM, A. & DADOUNE, J.P. - Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin: A method for evaluation of nuclear maturation. In: ANDRÉ J., (ed.). - **The sperm cell**. Proc. Ivth Int. Symp. Spermatology. The Hague: Martinus Nijhoff, 1983, p.249-52.
- TESARIK, J. & TESTART, J. - La Fecondation . ***Recherche***, **213**:1008 -19, 1989.
- THOMPSON, M.L. & ZUCCHINI, W. - On the statistical analysis of ROC – ***Statist. Med.***, **8**:1277-90, 1989.
- TROUNSON, A.O.; MOHR, L.R.; WOOD, C.; LEETON J. - Effect of delayed insemination on in vitro fertilization, culture and transfer of human embryos. ***J. Reprod. Fertil.***, **64**:285-94, 1982.
- VEECK, L.L.; WORTHAM JR, J.W.; WITMYER, J.; SANDOW, B.A.; ACOSTA, A.A.; GARCIA, J.E.; JONES, G.S.; JONES, H.W. – Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. ***Fertil. Steril.***, **39**:594-602, 1983.
- VEECK, L.L. - The morphological assessment of human oocytes and early concepti. In: KEEL, B.A.; WEBSTER, B.W., (eds.) Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. 353p.

ZAINI A.; JENNINGS, M.G.; BAKER, H.W.G. - Are conventional sperm morphology na motility assesement of predictive value in subfertil men? ***Int. J. Androl.***, **8**:427-35, 1985.

ZIEBE S. & ANDERSON C.Y. – Isolation of Percoll centrifugation, SpermPrep filtration, and swim up techniques. ***J. Assist. Reprod. Genet.***, **10**:485-7, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO - **Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction.** 2.ed. Great Britain, Cambridge University Press, 1987. 67p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO - **Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction,** Cambridge University Press, Cambridge, 1992. 107p.

YOVICH, J.M.; EDIRISINGHE, W.R.; CUMMINS, J.M.; YOVICH, J.L. - Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility. ***Fertil. Steril.***, **53**:715-22, 1990.

YANAGIMACHI, R.; YANAGIMACHI, H.; ROGERS, B.J. - The use of zona free ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. ***Biol. Reprod.***, **14**:471-6, 1976.

9. Bibliografia de Normatização

1. HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses.
BIREME, São Paulo, 1991. 45p.
2. Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses.
Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD - OF. CIR/
PRPG/06/95 - Normas ABNT. 1995. 8p.

10. Anexos

ANEXO 1

FICHA DE COLETA DE DADOS

LABORATÓRIO DE GENÉTICA DA REPRODUÇÃO - DTG - CAISM

N HC:..... N RE:.....

IDADE:.....

N CAISM/HC:..... N RE:.....

IDADE:.....

DIAS DE ABSTINÊNCIA SEXUAL:.....

ESPERMOGRAMA:

VOLUME:..... ASPECTO:..... VISCOSIDADE:.....

pH:..... COR:..... LIQUEFAÇÃO:.....

CONCENTRAÇÃO:.....milhões/ml TOTAL

VITALIDADE: VIVOS:.....%

MOTILIDADE: grau A.....% grau B.....% grau C.....%

MORFOLOGIA: normais.....% alterados.....%

MATURIDADE: maduros.....% imaturos.....%

TESTE HIPOSMÓTICO:.....% inchados

TESTE DA ÁGUA:----- % inchados

CONCENTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS.....milhões/ ml

CAPACITAÇÃO

Recuperados:.....milhões/ml grau A%

OBSERVAÇÕES:.....

.....

.....

.

Exame realizado por :

Data:

ANEXO 2

RESULTADOS

DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DA MORFOLOGIA E MOTILIDADE ESPERMÁTICA

VARIÁVEIS % n p

Morfologia

normal

anormal

Motilidade

A

B

C

VARIÁVEIS ASSOCIADAS À TAXA DE FERTILIZAÇÃO ATRAVÉS DA ANÁLISE POR REGRESSÃO MÚLTIPLA

VARIÁVEIS COEF. EPcoef. p

**ANEXO - 3 VALORES REFERENTES A SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE
BASEANDO-SE NA PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES NORMAIS**

% normais	Sensibilidade	Especificidade	Falso +
2			
4			
6			
8			
10	100	4,35	95,65
12	96,88	21,74	78,26
14	95,31	26,09	73,91
16	90,63	26,09	73,91
18	82,81	34,78	65,22
20	81,25	47,83	52,17
22	75,00	56,52	43,48
24	70,31	56,52	43,48
26	57,81	60,87	39,13
28	57,81	60,87	39,13
30	50,00	60,87	39,13
32	45,31	69,57	30,43
34	43,75	69,57	30,43
36	37,50	69,57	30,43
38	32,81	73,91	26,09
40	31,25	73,91	26,09
42	28,13	78,26	21,74
44	28,13	78,26	21,74
46	28,13	78,26	21,74
48	28,13	78,26	21,74
50	28,13	82,61	17,39
52	26,56	82,61	17,39
54	23,44	86,96	13,04
56	21,88	86,96	13,04
58	21,88	86,96	13,04
60	21,88	91,30	8,7
62	20,31	91,30	8,7
64	17,19	91,30	8,7
66	15,63	91,30	8,7
68	9,38	91,30	8,7
70	9,38	100	0
72	3,13	100	0
74	1,56	100	0

%Mob_A	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	FALSO +
5	100	17,24	82,76
7	100	17,14	82,76
10	100	17,24	82,76
11	88,41	24,14	75,86
12	88,41	24,14	75,86
15	88,41	24,14	75,86
17	88,41	24,14	75,86
20	88,41	24,14	75,86
21	65,22	65,52	34,48
22	65,22	65,52	34,48
25	65,22	65,52	34,48
27	65,22	65,52	34,48
30	65,22	65,52	34,48
31	34,78	93,10	6,90
32	34,78	93,10	6,90
35	34,78	93,10	6,90
37	34,78	93,10	6,90
40	34,78	93,10	6,90
41	11,59	100	0
42	11,59	100	0
45	11,59	100	0
47	11,59	100	0
50	11,59	100	0
51	4,35	100	0
52	4,35	100	0
55	4,35	100	0
57	4,35	100	0
60	4,35	100	0