

Tratamento do Fator Masculino Grave em Infertilidade pela Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI)

Primeiras Gestações Obtidas com a Coleta de Espermatozoides do Testículo

Treatment of Severe Male Factor Infertility by Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)

First Pregnancies Obtained with Sperm Collection from Testicle

RESUMO

Esse trabalho analisou o emprego da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) no tratamento da infertilidade masculina grave. Um total de 51 casos foram submetidos ao método da ICSI. A idade média das esposas foi de 31.4 ± 46.1 anos, realizou-se um total de 51 ciclos de punção ovariana. Os óvulos colhidos por ultra-som vaginal tiveram o complexo cumulus-corona removido por hialuronidase (80 UI/ml) diluída no meio Denu-50 (Scandinavian IVF Science, Sweden). Somente os oócitos em metáfase II foram microinjetados. A injeção foi realizada num microscópio invertido Olympus IMT-2 equipado com um sistema de lentes Hoffman, acoplado com manipulador automático MM-88. O controle das micropipetas de injeção dos espermatozoides foi realizado por um micromanipulador hidráulico MO 202 (Narishige, Japan). A fixação dos oócitos foi executada por um manipulador MN-155 (Narishige, Japan). Uma solução de polivinilpirrolidona (PVP, Scandinavian IVF, Sweden) na concentração de 10% em IVF-50 (Scandinavian IVF Science, Sweden) foi usada para imobilização dos espermatozoides. O esperma coletado foi preparado com gradientes de Percoll (40%, 90%). Um total de 51 ciclos foram realizados, sendo colhidos 469 oócitos, com uma média de 9.20 ± 5.63 oócitos por punção. Além disso, 379 oócitos estavam em metáfase II (80%). A taxa média de fertilização foi de 53.6%, com uma média de embriões transferidos de 3.16 ± 1.84 . O índice de gestação por punção foi de 31,3% e por transferência de embriões, 34,7%. A taxa de implantação foi 16,1%. Em cinco casos, onde os espermatozoides foram retirados do testículo, obteve-se após a ICSI uma taxa de fertilização dos oócitos de 45%, sendo a taxa de gravidez clínica por punção de 60% (três gestações) e a taxa de implantação de 40%. Concluindo, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) é um excelente método para o tratamento do fator masculino grave em infertilidade.

Palavras-chave: injeção intracitoplasmática; espermatozoide; infertilidade masculina grave.

Rev Bras Ginec Obstet, 17:967, 1995

José G. FRANCO JUNIOR
Cláudia G. PETERSEN
Ana Lúcia MAURI
Ricardo Luiz R. BARUFFI
Enio F. FREITAS
Getúlio URSOLINO

Centro de Reprodução Humana da Fundação Maternidade
Sinhá Junqueira - Ribeirão Preto - SP

Introdução

A injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) como método de investigação em biologia não é um fato novo. Em 1914, Lillie refere a injeção de espermatozoides no óvulo do peixe-estrela, porém com resultados não conclusivos.

Em 1962, Hiramoto observou nos oócitos do ouriço do mar, após a ICSI, uma ativação oocitária seguida de uma descondensação dos espermatozoides. Em 1976, Uehara e Yanagimachi publicaram um artigo sobre a injeção de espermatozoides em oócitos de *hamster*, verificando a formação de pronúcleo masculino e uma ativação oocitária, que poderia ocorrer pela simples ação mecânica das pipetas, desde que houvesse a presença de íons cálcio no meio.

Em 1988, Lanzendorf *et al.* descrevem pela primeira vez a ICSI na espécie humana, com o relato da obtenção de pronúcleos após a microinjeção de 20 oócitos (taxa de fertilização de 35%). Inicialmente, esses oócitos apresentavam vesícula germinativa, sendo apenas subme-

tidos a ICSI quando liberaram o primeiro corpúsculo polar. Não houve transferência uterina dos pronúcleos obtidos nessa investigação.

Em 1991, Ng *et al.* analisaram o emprego da ICSI no tratamento de casos com oligoastenoteratozoospermia severa. Um total de 38 óocitos em metáfase II foram microinseminados, obtendo-se uma taxa de fertilização de 10,5%, com lesão dos óocitos em 31,6% das vezes. Os pronúcleos obtidos foram transferidos para a trompa, porém não ocorreram gestações. Naquela ocasião, o autor desaconselhou o uso da ICSI como terapia do fator masculino severo.

Em 1992, Palermo *et al.* descreveram o emprego da ICSI em 47 óocitos pré-ovulatórios (metáfase II), verificando que 38 permaneceram intactos após a microinjeção, 31 fertilizaram (taxa de fertilização de 66%) e 15 embriões foram transferidos para o útero. Um total de quatro gestações foram obtidas após oito ciclos de tratamento (duas gestações únicas, uma gemelar e um aborto pré-clínico).

Em 1993a, Van Steirteghem *et al.* compararam a inseminação subzonal (SUZI) com a ICSI, num total de 300 ciclos de tratamento, numa população de pacientes que não obtiveram fertilização ou apresentaram em ciclo prévio de fertilização *in vitro* uma taxa de fertilização inferior a 5%. Entretanto, a taxa de fertilização após a ICSI (51%) foi superior à da SUZI (14,3%) em amostras com parâmetros semelhantes do esperma.

Nagy *et al.* (1994) verificaram a eficiência da ICSI em casos de criptozoospermia, astenozoospermia e teratozoospermia total (100% de comprometimento).

Por outro lado, duas das principais causas de infertilidade masculina com espermatogênese normal são a agenesia congênita bilateral dos deferentes e a azoospermia obstrutiva sem possível correção cirúrgica. O protocolo básico para solução destes casos consistia na aspiração microcirúrgica do epidídimo proximal e subsequente aplicação da técnica de fertiliza-

ção *in vitro*. Algumas gestações foram obtidas com esse procedimento (Temple-Smith *et al.*, 1985), entretanto, as taxas de fertilização com espermatozoides obtidos do epidídimo era baixa e os índices de gravidez não excediam 9%. Em 1995, Silber *et al.* relataram uma taxa de fertilização de 46% e gestação de 42%, num total de 12 ciclos de ICSI, onde os espermatozoides foram retirados por biópsia testicular.

Em vista destes fatos, esse trabalho apresenta as normas de instalação, os resultados e as conclusões obtidas, em nossa unidade, com o desenvolvimento do programa de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Apresenta-se, em especial, as modificações laboratoriais que facilitaríamos para outros grupos a implantação dessa metodologia no Brasil. Além disso, descrevem-se os primeiros casos de gravidez no Brasil, com espermatozoides obtidos do testículo.

Pacientes e Métodos

Um total de 51 pacientes e seus esposos foram submetidos ao programa de ICSI. A idade média das pacientes foi de $31,4 \pm 4,6$ anos. Previamente, todas as pacientes realizaram um exame ginecológico completo, histeroscopia diagnóstica e pesquisa de anticorpos para HIV. Obrigatoriamente, os pacientes executaram um espermograma completo e pesquisa de anticorpos para HIV. Em seguida, os casais com exames normais foram informados e esclarecidos quanto aos passos técnicos da ICSI e dos riscos do processo de coleta de óvulos. Finalmente, assinaram um consentimento para a realização da ICSI.

As indicações para a ICSI foram as seguintes: oligoastenoteratozoospermia, azoospermia obstrutiva com espermatogênese conservada, falha prévia total em fertilização *in vitro* e fator imunológico.

Os esquemas de estimulação ovariana foram o do ciclo semiprogramado e o de análogo de GnRH (acetato de leuprolide, Lupron, Abbott) associado com gonadotrofinas. O ciclo semi-

programado foi utilizado em 12 ciclos (23,5% dos casos). No semiprogramado, inicia-se um anticoncepcional de baixa dosagem (etinil-estradiol 30 µg e gestodeno 75 µg - Gynera, Berlmed-Shering) no primeiro dia do ciclo menstrual anterior ao do estímulo ovulatório, sendo empregado por um tempo mínimo de 21 dias e máximo de 28 dias. Obrigatoriamente, a estimulação ovariana começa no quinto dia após a parada da pílula, com citrato de clomifeno na dose de 100 mg/dia, durante cinco dias consecutivos. Na mesma ocasião, uma ampola de gonadotrofina menopausal humana (FSH = 150 UI e LH = 150 UI, Pergonal₁₀₀₀, Serono) é administrada em intervalos de 48 horas, num mínimo de quatro ampolas. Ao mesmo tempo, inicia-se o uso de dexametasona na dose de 0.5 mg/dia, mantendo-se até o momento da transferência embrionária (Franco Jr *et al.*, 1995).

Num total de 39 ciclos (76,4%), empregou-se o acetato de leuprolidê em bloqueio longo de segunda fase, com início no 21º dia do ciclo menstrual prévio ao estímulo ovulatório. No 15º dia, após o uso do análogo, e desde que tenha ocorrido o fluxo menstrual, realizou-se a estimulação ovariana com FSH 225 UI por dia (Metrodin HP, Serono) até atingir-se uma resposta ovariana ideal. Dessa forma, independente do esquema de poliovulação ovariana, a observação do desenvolvimento folicular teve início no oitavo dia da estimulação, através de uma avaliação ultra-sonográfica com transdutor de 5 MHz (Ultramark 4 - ATL Advanced). Em ambos os protocolos, quando um mínimo de três ou mais folículos de 17 mm no maior diâmetro foram identificados, administrou-se o hormônio gonadotrófico coriônico (hCG - Profasi HP, Serono) na dose de 10.000 UI por via IM. Em nenhum dos protocolos foram utilizadas dosagens hormonais no controle da estimulação ovariana.

A punção aspirativa folicular foi realizada de 34 a 36 horas após o hCG, sob sedação com etomidato (Hypnomidato), através de agulha de 17 G guiada pelo transdutor vaginal.

Material e Métodos

O líquido folicular aspirado foi depositado em placas de cultura (cat 25010, Corning, New York), os oócitos foram identificados e transferidos com auxílio de pipeta Pasteur para placas de cultura de Nunc (cat. 176740, Roskilde, Denmark) contendo 1 ml de meio de cultura IVF-50 (Scandinavian IVF Science, Göteborg, Sweden). Posteriormente, o complexo *cumulus*-corona é removido pela exposição em hialuronidase na concentração de 80 UI/ml (cat. 44272, Sigma Chemical Co., St Louis, USA) diluída no meio DENU-50 (Scandinavian IVF Science, Göteborg, Sweden), previamente aquecido na temperatura de 37°C por duas horas.

O tempo de exposição na hialuronidase é variável, sendo os oócitos completamente desnudados através de sucessivas passagens em pipetas Pasteur estiradas. O procedimento de desnudação foi executado em placas de Nunc.

Os oócitos desnudados foram incubados no meio IVF-50 até o momento da ICSI. Apenas os oócitos com o primeiro corpúsculo polar (metáfase II) foram injetados.

Em seguida, as amostras de espermatozoides foram coletadas por masturbação em placas de cultura (cat 25010, Corning, New York, USA) e mantidas na temperatura de 37°C. Após a liquefação, foram analisadas em microscópio de contraste de fase, sendo a contagem dos espermatozoides executada na câmara de Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel). Nos casos indicados, após anestesia local, retirou-se um fragmento do tecido testicular de aproximadamente 0,5 cm. O material biopsiado foi depositado em placa Corning estéril (cat 25010) contendo IVF-50 aquecido, observando-se os túbulos seminíferos (aumento 14x) que foram abertos com o auxílio de duas agulhas 27G acopladas em seringa de tuberculina. Não se obtendo espermatozoides com esse procedimento, o tecido testicular é macerado com o auxílio de uma placa Corning estéril (cat 25010). Após a visualização dos espermatozoides no meio, estes foram separados dos demais elementos celulares.

A separação dos espermatozoides do fluido seminal ou de outros componentes celulares foi realizada através de gradiente descontinuo de Percoll (osmolaridade entre 280 - 290 mOsm/Kg H₂O) em tubos cônicos (Corning, New York, USA) com gradientes de 1 ml das frações de 40% e 90% de Percoll, diluído no meio Ham 10x concentrado (Penicilina G, Sigma P 468/dose 60 mg/ml). Após centrifugação em 300 G por 20 minutos, a camada de 90% e o sedimento são transferidos para novo tubo e ressuspensos em 6 ml de IVF-50. Após nova centrifugação em 150 G por dez minutos, o sobrenadante é desprezado, e um volume variável de meio de cultura é adicionado ao sedimento. Nessa ocasião, a amostra de espermatozoides é analisada e estocada em cultura, na atmosfera de CO₂ 5%, até o momento do uso para ICSI.

A ICSI foi realizada num microscópio invertido Olympus IMT-2 (Olympus, Tokio, Japan) equipado com um sistema de lentes Hoffman e acoplado com um manipulador automático MM-88. Os discos de cultura são mantidos na temperatura de 37°C por uma placa de aquecimento (Swemed Lab, Västra Frölunda, Sweden), sendo os controles realizados por micromanipulador hidráulico MO 202 (Narishige Co, Tokio, Japan) para a micropipeta (diâmetro interno de 4.8 µm a 5.6 µm e externo de 6.8 µm a 7.2 µm com angulação de 30°) de transporte e injeção do espermatozoide. Um manipulador MN-155 (Narishige Co, Tokio, Japan) com uma micropipeta (diâmetro interno de 18 µm - 25 µm e externo 100 µm - 120 µm com angulação de 30°) foi usado para fixação do oócito. Os microinjetores usados foram do tipo IM6B (Narishige Co, Tokio, Japan).

O óleo mineral (Sigma Chemical Co, St Louis, USA) usado para evitar alterações importantes do pH no sistema foi lavado por duas vezes com água ultrapurificada (Sistema Milli-Q UF, Millipore Co, São Paulo, Brasil) e uma vez com Menezo B₂, mantendo-se nessa condição até seu emprego. Em seguida, colocado por uma noite em equilíbrio numa atmosfera com CO₂ 5% e temperatura de 37°C (mínimo uma noite/máximo uma semana).

Utiliza-se uma solução de polivinilpirrolidina (PVP, cat. 1001, Scandinavian IVF Science AB, Göteborg, Sweden) na concentração de 10% de IVF-50 para a imobilização dos espermatozoides. A solução viscosa de PVP é produzida especialmente para o procedimento de ICSI e testada previamente para a presença de DNA e endotoxinas. A solução de PVP foi estocada em -4°C até o momento do uso, quando foi equilibrada na temperatura de 37°C na atmosfera de CO₂ 5%. Uma pipeta Eppendorf (cat. 4810.000.045, Eppendorf-Netheler, Hamburg, Germany) equipada com ponteira estéril (cat. 0030.065.506, Eppendorf-Netheler, Hamburg, Germany) não pirogênica, livre de DNA, RNase e ATP, deposita uma gota de 5 µl de IVF-50 contendo Hepes 15 mM no centro da placa de cultura (Corning, cat 25010, New York, USA) e quatro gotas ao redor. As gotas devem ser cobertas imediatamente com óleo mineral pré-equilibrado para evitar evaporação. Antes de iniciar o procedimento de ICSI, a gota central é removida e substituída por PVP no volume de 5 µl. Em seguida, adiciona-se uma gota de sêmen (1 µl) no centro da gota de PVP. O espermatozoide é aspirado da periferia da gota de PVP.

Em 200x de aumento, a micropipeta de ICSI deve ser posicionada na periferia da solução de PVP e um espermatozoide morfológicamente normal é imobilizado por passagens sucessivas na micropipeta. Em seguida, a micropipeta contendo o espermatozoide é removida desta gota e transferida para a periferia da gota que contém o oócito. O oócito deve ser delicadamente aspirado com a micropipeta de fixação. O primeiro corpúsculo polar é posicionado na posição de seis ou 12 horas, e a micropipeta com o espermatozoide, introduzida horizontalmente na posição de três horas dentro do ooplasma. Uma gentil sucção é aplicada cuidadosamente para quebrar o oolema e evidenciar a presença de ooplasma dentro da micropipeta. Tal fato confirma a deposição intracitoplasmática do espermatozoide (não na invaginação do oolema). O espermatozoide imobilizado é inserido junto com o ooplasma aspirado no mínimo volume possível de PVP. A pipeta de ICSI deve ser

delicadamente removida e o oócito posteriormente liberado. Os oócitos injetados devem ser lavados em IFV-50 e transferidos para um novo IFV-50, suplementado com 10% de soro da paciente.

Os oócitos são observados dentro de 16 a 18 horas para a visualização da presença ou não de pronúcleos. O processo de fertilização normal é definido pela formação de dois pronúcleos distintos, seguido do aparecimento de clivagem embrionária após 24 horas da fertilização. Um máximo de quatro embriões são transferidos através de um cateter de Frydman, após 48 horas de cultura, sendo os excedentes criopreservados.

Uma dosagem sérica de β -hCG foi sempre executada no 14º dia após a transferência de embriões para diagnosticar a gestação inicial. Além disso, um exame ultra-sonográfico vaginal foi programado para a sexta semana de gestação com a finalidade de detectar a presença de batimentos cardíacos fetais (gestação clínica).

Resultados

As Tabelas 1 e 2 mostram os resultados obtidos com o programa de ICSI num total de 51 punções. O número de oócitos coletados foi de 469, com uma média de 9.20 ± 5.63 oócitos por punção, sendo que 379 (80,8%) estavam em metáfase II. A taxa média de fertilização normal foi de 53,6%. A taxa média de embriões transferidos foi de 3.16 ± 1.84 . Por outro lado, a idade média das pacientes foi de 31.4 ± 4.6 . A oligoastenoteratozoospermia foi indicação para a ICSI em 74,5% dos casos; a azoospermia obstrutiva esteve presente em 11,7%, a falha prévia total de fertilização, em 9,8%, e o fator imunológico em 3,9% dos casos. Em 12 casos, usou-se o ciclo semiprogramado para estimulação ovariana com a observação de quatro gestações clínicas (33,3%). Por outro lado, empregando-se o acetato de leuprolide e gonadotrofinas em 39 casos, identificaram-se 12 gestações clínicas (30,7%). A taxa de gravidez clínica por punção foi de 31,3%, sendo a taxa de gravidez clínica por transferência de embriões de 34,7%. A taxa de implantação embrionária foi de 16,1%. Com relação ao uso de espermatozoides do testículo, um total

de cinco casos resultaram numa taxa de gravidez clínica por punção de 60% (três gestações) e uma taxa de implantação de 40%. Num único caso de azoospermia obstrutiva obteve-se uma gestação com espermatozoides coletados por aspiração microcirúrgica do epidídimo. Até o momento da redação deste trabalho, as 16 gestações clínicas evoluem normalmente com idades entre sete e 27 semanas.

Tabela 1
Dados gerais sobre as gestações clínicas no programa de ICSI

| Fator masculino | Ciclos | Gestações | Taxa |
|--|--------|-----------|------|
| Oligoastenoteratozoospermia | 38 | 9 | 23,6 |
| Azoospermia obstrutiva: | 6 | 4 | 66,6 |
| espermatozoides do epidídimo | 1 | 1 | |
| espermatozoides do testículo | 5 | 3 | 60 |
| Falha prévia total de fertilização | 5 | 3 | 60 |
| Fator imunológico | 2 | 0 | |
| Taxa de gravidez clínica por punção | 51 | 16 | 31,3 |
| Taxa de gravidez clínica por transferência | 46 | 16 | 34,7 |
| Taxa de implantação | | | 16,1 |

Tabela 2
Dados gerais sobre o emprego de espermatozoides do testículo no programa de ICSI

| | Testículo |
|---|-----------|
| Ciclos | 5 |
| Oócitos injetados | 22 |
| Taxa de fertilização | 45% |
| Número de embriões transferidos | 10 |
| Número de gestações clínicas (2 gestações simples/1 gestação gemelar) | 3 |
| Taxa de gravidez clínica por punção | 60% |
| Taxa de gravidez clínica por transferência | 60% |
| Taxa de implantação | 40% |
| Número de sacos gestacionais/número de embriões transferidos: | 4/10 |

Discussão

As informações aqui relatadas poderiam facilitar a implantação de outros programas de ICSI no Brasil. Tais informações comprovam que alguns conceitos fundamentais estão abalados com o atual sucesso da ICSI na terapia da infertilidade no fator masculino – especialmente nos casos de azoospermias obstrutivas, onde as gestações foram obtidas após a coleta de reduzido número de espermatozoides por biópsia testicular.

Em geral, as principais indicações para a aplicação da ICSI não variaram das habitualmente descritas na literatura, mas confirmaram a eficiência da ICSI na correção da oligoastenoteratozoospermia (número de casos = 38; 23,6% de gestações clínicas), azoospermia obstrutiva (número de casos = 6; 66% de gestações clínicas) e na falha prévia total em fertilização *in vitro* (número de casos = 5; 60% de gestações clínicas). Fica claro que nas duas últimas situações o número total de casos é ainda reduzido, entretanto a série de gestações nos casos de coleta de espermatozoides do testículo é a primeira do Brasil.

Por outro lado, a comprovação de 33,3% de gestações por ICSI após uma estimulação ovariana com ciclos semiprogramados mostra a viabilidade destes esquemas menos agressivos no preparo do ovário antes da aplicação da ICSI.

Os resultados gerais obtidos nesse trabalho (taxa média de fertilização normal de 53,6%, taxa de gravidez clínica por punção de 31,3%, taxa de gravidez clínica por transferência embrionária de 34,7% e taxa de implantação de 16,1%) são compatíveis com os referidos pelos principais grupos internacionais que empregam a ICSI.

Em 1993, Palermo *et al.* aplicaram a ICSI em 716 oócitos pré-ovulatórios, obtendo uma taxa de fertilização de 44% numa população com fator masculino alterado. Em 1993b, Van Steirteghem *et al.* confirmaram o sucesso do uso da ICSI no tratamento de 150 pacientes que não conseguiram fertilização dos oócitos em ciclos prévios de fertilização *in vitro* e/ou não foram aceitas no programa convencional de fertilização *in vitro*, pois não havia uma quantidade suficiente de espermatozoides. Um total de 1409 oócitos em

metáfase II foram inseminados e, após 18 horas, 64,2% dos oócitos inseminados mostraram pronúcleos. As taxas de fertilização não foram influenciadas pelas características do sêmen. Apenas quinze pacientes (10%) não tiveram embriões para transferência. O resultado final foi de 35,3% de gestações clínicas por punção e 39,2% por transferência embrionária.

Na Austrália, Payne *et al.* (1994) analisaram os resultados com os 100 primeiros casos de ICSI. O índice geral de fertilização foi de 71%, ocorrendo uma transferência de 2,6 embriões por ciclo. Obtiveram-se 30 gestações clínicas com um índice de 32% de gestações por transferência embrionária. A taxa de implantação foi de 15%. Vanderzwalmen *et al.* (1994) também descreveram resultados satisfatórios com o uso da ICSI em pacientes com infertilidade masculina severa do tipo astenoteratozoospermia. O índice de fertilização foi de 38%, com taxa de implantação de 12%, taxas de gestação clínica de 20% por ciclo e 22% por transferência.

Na Inglaterra, Tsirigotis *et al.* (1994) realizaram a ICSI em 69 pacientes com longa história de infertilidade, sendo que 48 pacientes apresentavam falha de fertilização em ciclo anterior, 15 pacientes apresentavam menos que um milhão de espermatozoides no ejaculado e seis casos foram de azoospermia obstrutiva. Um total de 967 oócitos foram coletados, dos quais 784 foram micromanipulados (81%). Uma fertilização normal (dois pronúcleos) ocorreu em 52% dos casos. A transferência embrionária foi realizada em 64 casos, obtendo-se uma taxa de gravidez por punção de 36,2% e por transferência embrionária de 39%. O nível de implantação foi de 16%, sendo o índice de perda da gestação de 24%.

Em geral, nas azoospermias obstrutivas a coleta do sêmen é realizada por aspiração microcirúrgica do epidídimo. Entretanto, nem sempre o epidídimo fornece uma quantidade suficiente de espermatozoides para o emprego da fertilização *in vitro* convencional. A obtenção de um reduzido número de espermatozoides, por punção do epidídimo (microcirurgia do epidídimo, punção percutânea) ou de uma

amostra do tecido testicular, poderia ser suficiente com o uso da ICSI para a obtenção de embriões em laboratório e subseqüentes gestações (Shrivastav *et al.*, 1994; Silber *et al.*, 1995).

Por outro lado, no caso de repetição do processo por falha na obtenção de gestação, novo ato cirúrgico poderia ser evitado com a conduta de congelar várias alíquotas do material colhido previamente, já que com o emprego da ICSI é reduzido o número de espermatozoides necessários para fertilizar os óocitos em laboratório.

Em 1995, Silber *et al.* relataram uma taxa de fertilização de 46% e de gestação de 42%, num total de 12 ciclos de ICSI, onde os espermatozoides foram retirados por biópsia testicular. Na mesma série descreve uma taxa de fertilização de 42% e de gestação de 63%, num total de 19 ciclos de ICSI, quando os espermatozoides foram obtidos por aspiração microcirúrgica do epididimo.

Nosso grupo também confirma os excelentes resultados (taxa de fertilização de 45% e taxa de gestações clínicas por punção de 60%) com a utilização de espermatozoides retirados por biópsia testicular e subseqüente ICSI, em casos de azoospermia obstrutiva, onde o epididimo estava alterado. As três gestações clínicas em evolução demonstram a potencialidade

desta metodologia na solução de problemas de infertilidade masculina, até então insolúveis.

Dessa forma, acredita-se que a utilização do banco de sêmen (inseminações heterólogas) deve sofrer uma redução obrigatória, pois esse processo teria indicação apenas nos indivíduos cuja biópsia testicular não revele espermatogênese. Entretanto, deve-se lembrar que a gestação com espermatogônias já é um fato descrito na literatura (Solikitis *et al.*, 1995).

Atualmente, os espermatozoides podem ser vistos como simples transportadores de DNA, desde que as barreiras naturais para a seleção dos espermatozoides acabam mecanicamente sendo ultrapassadas. Por isso, existe um temor natural quanto à transmissão de alterações genéticas. Entretanto, até o momento, a análise dos recém-nascidos provenientes dessa técnica não apresentou uma incidência de malformações congênitas diferente da FIV convencional (Bonduelle *et al.*, 1994).

Finalmente, a ICSI abriu novas perspectivas e mudanças importantes nos conceitos sobre a correção do fator masculino em infertilidade.



SUMMARY

The present study is an analysis of the use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in the treatment of severe male infertility. A total of 51 subjects were submitted to the ICSI method. Mean wife age was 31.4 ± 46.1 years, and a total of 51 ovarian puncture cycles were performed. The eggs collected by vaginal ultrasound were submitted to removal of the cumulus-corona complex with hyaluronidase (50 IU/ml) diluted in Denu-50 medium (Scandinavian IVF Science, Sweden). Only oocytes in metaphase II were microinjected. The injection was performed under an inverted Olympus IMT-2 microscope equipped with a Hoffman lens system and coupled to an MM-88 automatic manipulator. The micropipettes used for sperm injection were controlled with an MO 202 hydraulic micromanipulator (Narishige, Japan). A 10% polyvinylpyrrolidone solution (PVP, Scandinavian IVF Science, Sweden) in IFV-50 (Scandinavian IVF Science, Sweden) was used for sperm immobilization. The collected sperm was performed with Percoll gradients (40%, 90%). Fifty-one cycles were performed and 469 oocytes were collected, with a mean number of 9.20 ± 5.63 oocyte per puncture. In addition, 379 oocytes were in metaphase II (80%). The mean fertilization was 53.6% with a mean rate of embryo transfer of 3.16 ± 1.84 . The pregnancy rate was 31.3% per puncture and 34.7% per embryo transfer. The implantation rate was 16.1%. In five cases in which the sperms were removed from the testicles, a 45% rate of oocyte fertilization was obtained after ICSI, with a clinical pregnancy rate of 60% (3 gestations) and an implantation rate of 40%. In conclusion, intracytoplasmic injection of sperm (ICSI) is an excellent method for the treatment of severe male factor in infertility.

Key words: intracytoplasmic injection; sperm; severe male infertility.

Referências Bibliográficas

1. BONDUELLE, M.; DESMYTTERE, S.; BUYSSE, A.; VAN ASSCHE, E.; SCHIETECATTE, J.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. & LIEBAERS, I.: Prospective follow-up study of 55 children born after subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 9:1765-9, 1994.
2. BONDUELLE, M.; LEGEIN, J.; BUYSSE, A.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. & LIEBAERS, I.: Comparative follow-up study of 130 children born after ICSI and 130 children born after IVF. In Proceedings of the 10th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Abstr 82, Brussels, 1994.
3. FRANCO Jr, J.G.; BARUFFI, R.L.R.; MAURI, A.L.; PETERSEN, C.G. & CAMPOS, M.S.: Semiprogrammed ovarian stimulation as the first choice in *in vitro* fertilization programmes. *Hum Reprod*, 10:568-71, 1995.
4. HIRAMOTO, Y.: Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. *Exp Cell Res*, 27:416-26, 1962.
5. LANZENDORF, S.E.; MALONEY, M.K.; VEECK, L.L.; SLUSSER, J.; RODGEN G.D. & ROSENWAKS, Z.: A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril*, 49:835-42, 1988.
6. LILLIE, F.R.: Studies of fertilization VI. The mechanism of fertilization. *in Arbacia J Exp Zool*, 16:523-90, 1914.
7. NAGY, Z.P.; LIU, J.; JORIS, H.; BOCKEN, G.; TOURNAYE, H.; DEVROEY, P. & VAN STEIRTEGHEM, A.C.: Extremely impaired semen parameters and outcome of the intracytoplasmic sperm injection. In Proceedings of the 10th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Abstr 32, Brussels, 1994.
8. NG, S.; BONGSO, A. & RATNAM, S.S.: Microinjection of human oocytes: A technique for severe oligoasthenoteratozoospermia. *Fertil Steril*, 56:1117-23, 1991.
9. PALERMO, G.; JORIS, H.; DEVROY, P. & VAN STEIRTEGHEM, A.C.: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340:17-8, 1992.
10. PALERMO, G.; JORIS, H.; DERDE, M.P.; CAMUS, M.; DEVROEY, P. & VAN STEIRTEGHEM, A.: Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 59:826-35, 1993.
11. PAYNE, D.; FLAHERTY, S.P.; JEFFREY, R.; WARNES, G.M. & MATTHEWS, C.D.: Successful treatment of severe male factor infertility in 100 consecutive cycles using intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 9:2051-7, 1994.
12. SHRIVASTAV, P.; NADKARNI, P.; WENSVOORT, S. & CRAFT, I.: Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia. *Hum Reprod*, 9:2058-61, 1994.
13. SILBER, S.J.; VAN STEIRTEGHEM, A.C.; LIU, J.; NAGY, Z.; TOURNAYE, H. & DEVROEY, P.: High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod*, 10:148-52, 1995.
14. SOFIKITIS, N.; MIYAGAWA, I.; SHARLIP, I.; HELI STROM, MEKRAS, G. & MASTELOU, E.: Human pregnancies achieved by intra-cytoplasmic injections of round spermatid (RS) nuclei isolated from testicular tissue of azoospermic men. In Proceedings of the American Urological Association, Abstr 368, Las Vegas, 1995.
15. TEMPLE-SMITH, P.D.; SOUTHWICK, G.H.; YATES, C.A.; TROUNSON, A.O. & DE KRETZER, D.M.: Human pregnancy by IVF using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer*, 2:119-22, 1985.
16. TSIRIGOTIS, M.; YANG, D.; REDGMENT, C.J.; NICHOLSON, N.; PELEKANOS, M. & CRAFT, I.L.: Assisted fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 62:781-5, 1994.
17. UEHARA, T. & YANAGIMACHI, R.: Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod*, 15:467-70, 1976.
18. VANDERZWALMEN, P.; SEGAL-BERTIN, G.; LEJEUNE, B.; NIJS, M. & SCHOYSMAN, R.: Clinical results of intracytoplasmic sperm injection for severe malefactor infertility. In Proceedings of the 10th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology, Abstr 49, Brussels, 1994.
19. VAN STEIRTEGHEM, A.C.; LIU, J.; JORIS, H.; NAGY, Z.; JANSSENSWILLEN, C.; TOURNAYE, H.; DERDE, M.P.; VAN ASSCHE, E. & DEVROEY, P.: Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod*, 8:1055-60, 1993a.
20. VAN STEIRTEGHEM, A.C.; NAGY, Z.; JORIS, H.; LIU, J.; STAESSEN, C.; SMITZ, J.; WISANTO, A. & DEVROEY, P.: High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 8:1061-6, 1993b.