

Tratamento da infertilidade masculina por azoospermia obstrutiva pela injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

JOSÉ GONÇALVES FRANCO JÚNIOR, CLÁUDIA PETERSEN,
ANA LÚCIA MAURI, RICARDO BARUFFI, JOÃO CORNICELLI, ÉNIO FERREIRA FREITAS

Resumo - Os autores relatam a obtenção de gestações em dois casos de infertilidade masculina por azoospermia obstrutiva com o uso do método injeção de intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). (*J Bras Urol* 1995; 21(4): 183-6)

UNITERMOS: INFERTILIDADE MASCULINA, AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA, INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA.

Introdução

O método de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) apresentou nos últimos três anos resultados efetivos na terapia do fator masculino em infertilidade⁽¹⁾. Nessa técnica, injeta-se um único espermatozoide dentro do óvulo através de microagulhas guiadas por micromanipuladores. Atualmente, descrevem-se índices médios de fertilização entre 60% e 80% e taxas de gestação de 20% a 30%, mesmo em situações de oligoastenoteratozoospermias graves^(2,3).

Além disso, alguns autores relataram sucesso do ICSI em casos de azoospermias obstrutivas, porém, com espermatogênese conservada⁽⁴⁻⁶⁾. Entretanto, são escassas as gestações descritas com o uso de espermatozoides obtidos diretamente do testículo⁽⁷⁾.

A finalidade deste trabalho é descrever a experiência na solução da infertilidade masculina por azoospermia obstrutiva com espermatogênese conservada, através da coleta de espermatozoides por microcirurgia do epidídimo ou biópsia testicular, seguido do emprego do método do ICSI.

Descrição dos casos

O estudo consta de dois casais que os esposos apresentavam azoospermia obstrutiva, sendo ambos submetidos ao programa de ICSI.

Caso 1 - O paciente L.W., de 26 anos, apresentava ao exame clínico uma atrofia testicular esquerda e agenésia bilateral dos

vasos deferentes. O testículo direito era normal. A esposa, de 20 anos, apresentava exame ginecológico normal. Histeroscopia normal. O ovário foi estimulado com FSH 225 UI/dia (Metrodin, Serono) + HCG na dose de 10.000 UI (Profasi, Serono), após um bloqueio longo de 2ª fase com acetato de leuprolide. Na aspiração folicular obtiveram-se 17 óvulos, sendo 12 em metáfase II. Desde que não foram obtidos espermatozoides após a microaspiração do epidídimo, realizou-se uma biópsia testicular, sendo um fragmento tecidual macerado em placa com meio de cultura, quando se identificou um número não superior a 15 espermatozoides com ligeira mobilidade. Em seguida, aplicou-se o método do ICSI conforme descrição abaixo. Após 48 horas da aplicação do ICSI, três embriões (grau III) foram transferidos para o útero (taxa de fertilização de 25%). Um teste de gravidez positivo (B-hCG = 500 mUI/ml) foi obtido depois de 14 dias. Atualmente, uma gestação gemelar de 16 semanas evolui sem alterações.

Caso 2 - O paciente N.C., de 32 anos, apresentou quadro de azoospermia obstrutiva após epidimites recidivantes. Uma biópsia testicular revelou espermatogênese normal. A esposa V.C., de 24 anos, apresentava exame ginecológico normal. Histeroscopia normal. O ovário foi estimulado com FSH 225 UI/dia (Metrodin, Serono) depois do bloqueio longo de 2ª fase com acetato de leuprolide. Na aspiração folicular obtiveram-se sete óvulos, sendo seis em metáfase II. A aspiração microcirúrgica do epidídimo revelou alguns espermatozoides móveis, porém com contagem inferior a 100.000 por ml. Em seguida, aplicou-se a técnica de ICSI, conforme descrição abaixo. Cerca de 48 horas da aplicação do ICSI, dois embriões (grau IV, grau III) foram transferidos para útero (taxa de fertilização de 33%). Um teste de gravidez positivo (B-hCG = 450 mUI/ml) foi obtido depois de 14 dias. No momento, uma gestação gemelar de 14 semanas evolui sem problemas.

Trabalho realizado no Centro de Reprodução Humana da Fundação Maternidade Sinhá Junqueira - Ribeirão Preto - São Paulo.

Endereço para correspondência: J.G. Franco Jr. - Rua D. Alberto Gonçalves, 1500 - CEP 14085-100 - Ribeirão Preto, SP.

O método do ICSI desenvolvido no Centro de Reprodução Humana da Fundação Maternidade Sinhá Junqueira pode ser resumido nos seguintes passos.

1. Os óvulos foram colhidos após punção folicular por ultrasonografia. O complexo cumulus-corona é removido pela exposição em hialuronidase (80 UI/ml - Sigma Chemical Co., St Louis, USA) diluída no meio Denu-50 (Scandinavian IVF Science AB, Göteborg, Sweden). O tempo de exposição na hialuronidase é variável, sendo os oócitos, completamente desnudados através de sucessivas passagens em pipeta Pasteur. Apenas os oócitos com o primeiro corpúsculo polar (metáfase II) foram injetados (Figura 1).

2. Quando possível os espermatozoides foram separados do fluido seminal através de gradiente descontínuo de Percoll. O ICSI foi realizado em um microscópio invertido Olympus IMT-2, equipado com um sistema de lentes Hoffman e acoplado com um micromanipulador automático MM-88. Os discos de cultura permaneceram na temperatura de 37°C, com o auxílio de uma placa de aquecimento (Swemed Lab, Västra Frölunda, Sweden). O controle da micropipeta de transporte e da injeção do espermatozoide foi realizado por um micromanipulador hidráulico MO 202 (Narishige Co, Tokio, Japan). Uma micropipeta (Swemed Lab, Västra Frölunda, Sweden) foi usada para fixação do oócito, sendo guiada para essa função por um micromanipulador MN-155 (Narishige Co, Tokio, Japan). Os microinjetores usados foram do tipo IM6B (Narishige Co, Tokio, Japan). Utiliza-se uma solução de polivinilpirrolidina (PVP, Scandinavian IVF Science AB, Göteborg, Sweden) na concentração de 10% de IVF-50 para a imobilização dos espermatozoides. Para execução do ICSI, usa-se o aumento de 200x.

3. Óvulo é fixado com o primeiro corpúsculo polar colocado na posição de 6 ou 12 horas, e uma micropipeta com o espermatozoide é introduzida horizontalmente na posição de três horas dentro do ooplasma. Cuidadosamente, uma gentil sucção é aplicada para quebrar o oolema e evidenciar a presença do 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 liberado.

4. Os oócitos são observados após 16 a 18 horas para verificar a 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. A transferência embrionária ocorreu com 48 horas.

Discussão

As principais causas de azoospermia obstrutiva são as provenientes de lesões do epidídimo por causa infecciosa, as deferenciais por vasectomia, a agenesia congênita bilateral dos deferentes etc. O tratamento cirúrgico das azoospermias obstrutivas são de baixa eficiência, exceto na reversão pós-vasectomia. O tratamento da agenesia bilateral de deferentes

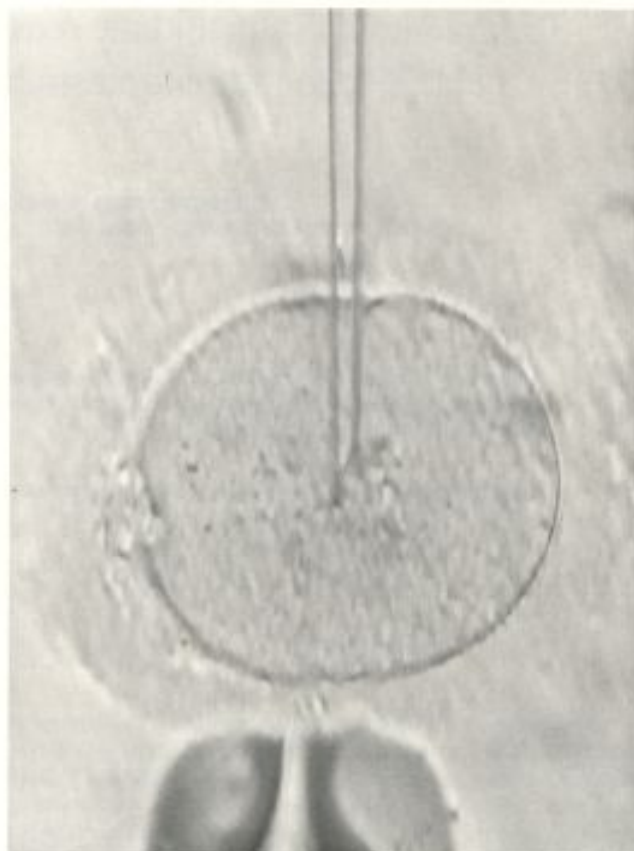


Figura 1 - Injeção intracitoplasmática de espermatozoide por micropipeta. Corpúsculo polar no horário de 12 horas.

pelo implante de espermatoceles artificiais foi abandonado pelo baixo índice de sucesso. Por outro lado, as técnicas de reprodução assistida começaram a ser aplicadas na solução dos casos de azoospermias obstrutivas pela aspiração microcirúrgica do epidídimo proximal e, subsequente, com a aplicação da técnica de fertilização *in vitro*. Dessa forma, algumas gestações foram obtidas com esse procedimento¹⁰, entretanto, as taxas de fertilização com espermatozoides do epidídimo eram baixa, e o índice de gravidez não excedia a 9%. Um estudo comparativo entre a técnica convencional de fertilização *in vitro* versus o ICSI usando-se os espermatozoides coletados do epidídimo, revelou uma taxa de fertilização de 41% no ICSI (17 casos) em relação à técnica de fertilização *in vitro* convencional (67 casos) que mostrou um índice de 6,9%, sendo os índices de gravidez em evolução de 30% e 4,5%, respectivamente¹¹.

Um grupo belga¹² analisou 40 pacientes com ausência congênita bilateral do ducto deferente e que foram submetidos a aspiração microcirúrgica do epidídimo acompanhada do ICSI. O índice de gestação clínica foi de 39% por ciclo de aspiração. Nesses pacientes não houve correlação entre taxas de fertilização e a evolução da gestação com seus fenótipos para

doença fibrocística. Recentemente, relataram também uma taxa de fertilização de 46% e de gestação de 43%, num total de 12 ciclos de ICSI, onde os espermatozoides foram retirados por biópsia testicular⁵.

Em geral, nas azoospermias obstrutivas a coleta do sêmen é realizada por aspiração microcirúrgica do epidídimo e, 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, desde que com o uso do ICSI seja reduzido o número de espermatozoides necessário para fertilizar os oócitos em laboratório.

Nos casos descritos, as taxas de fertilização de 25% e 33% com o uso de espermatozoides obtidos, respectivamente, do testículo e epidídimo, foram inferiores as obtidas em nosso serviço (taxa de fertilização média de 60%, num total de 349 oócitos micromanipulados), quando se empregou o ICSI com espermatozoides obtidos após preparo do ejaculado. Tal fato, não está claro na literatura, pois os casos de gravidez com espermatozoides coletados do epidídimo ou do testículo são raros. Entretanto, nossos resultados são animadores com o uso do ICSI na terapia da azoospermia obstrutiva com espermatozoides conservada. Além disso, confirmam que a micromanipulação de gametas (ICSI) começa a caminhar com passos seguros na solução de diferentes problemas da infertilidade masculina.

SUMMARY

The authors describe pregnancies after the treatment of male infertility for obstructive azoospermia by intracytoplasmic sperm injection.

KEY WORDS: MALE INFERTILITY, OBSTRUCTIVE AZOOSPERMIA, INTRACYTOPLASMIC INJECTION.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 1992; 340: 17-8.
2. Payne D, Flaherty SP, Jeffrey R, Warnes GM, Matthews CD. Successful treatment of severe male factor infertility in 100 consecutive cycles using intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1994; 9(11): 2051-7.
3. Van Steirteghem AC, 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*, 1993; 8(7): 1061-6.
4. Silber SJ, Nagy ZP, Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Conventional in vitro-fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod*, 1994; 9(9): 1705-9.
5. Silber S, Van Steirteghem AC, 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*, 1995; 10(1): 148-152.
6. Temple-Smith PD, Southwick GH, Yates CA, Trounson AO, de Kretser DM. Human pregnancy by IVF using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer*, 1985; 2: 119-122.
7. Tournaye H, Silber SJ, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, Van Steirteghem AC. Genetic aspects of microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection in patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. In: Proceedings of the 10th Annual Meeting of the

European Society of Human Reproduction and Embryology, 1994; Abstr. 31, Brussels.

COMENTÁRIO EDITORIAL

Os autores descrevem dois casos de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) em pacientes com quadro clínico de infertilidade masculina devido a azoospermia obstrutiva, porém com espermatogênese conservada, onde, através da coleta de espermatozoides por biópsia testicular e por aspiração epididimária, respectivamente, obtiveram os gametas masculinos.

A azoospermia representa 10% a 30% das causas de esterilidade no homem infértil. Um estudo prévio englobando 74 pacientes azoospermicos indicou que 24 (32,4%) apresentavam causa pós-testicular ou azoospermia obstrutiva, portanto, passíveis de tratamento hoje em dia pela ICSI.

As técnicas modernas de fecundação assistida para abordagem do casal infértil vêm se sofisticando rápida e vertiginosamente, culminando com a artificial e surpreendente injeção microscópica do espermatozoide no citoplasma ovular.

O casal que procura utilizar-se da tecnologia da fecundação assistida na azoospermia obstrutiva, geralmente onerosa e invasiva para ambos os cônjuges, quer saber quais são as suas reais chances de ter um filho a termo e sem alterações congênitas. O leitor avisado poderá confundir os vocábulos empregados e, com isso, ter uma falsa idéia dos resultados. Assim "fertilização" é definida pela formação de dois pró-núcleos distintos (masculino e feminino), com posterior aparecimento de clivagem embrionária após 24 horas (fase extra-uterina). Por "gravidez", entende-se a evolução satisfatória intra-uterina do(s) embrião(ões) transferido(s) e, no caso, após ICSI. Tanto a fertilização quanto a gravidez não significam, *a priori*, que a gestação irá a termo, uma vez que aborto poderá ocorrer.

Um estudo englobando 12 casais, cujos maridos tinham ausência bilateral congênita dos deferentes, realizou aspiração epididimária espermática para ICSI. O índice de fertilização foi de 58%. De 40 transferências de embriões, cinco pacientes tornaram-se grávidas, com índice global de gravidez de 35,7% e de 50% por transferência. O abortamento precoce foi de 57% e o índice de limitação do progresso da gravidez foi de 21,4%(2).

Outro estudo envolvendo homens com severa oligozoospermia comparou 1.171 embriões de ICSI com 2.495 embriões de fertilização *in vitro* (FIV) que foram congelados com dimetilsulfóxido. Desses, 413 e 969 embriões foram descongelados, respectivamente. Cinquenta e três por cento dos embriões descongelados por ICSI sobreviveram. Vinte e duas gravidezes foram alcançadas em 101 transferências, correspondendo a 21,8% de gravidez/transferência. O índice de gravidez clínica foi de 12,9% por transferência e o parto foi de 5,9% por transferência. Dos embriões FIV, 51% sobreviveram e 37 gravidezes ocorreram em 253 transferências. O índice de gravidez global e clínica e de parto foi respectivamente, de 14,6%, 10,7% e 71%. O abortamento pré-clínico ocorreu em 40,9% dos embriões criopreservados pela ICSI e 27% pela FIV⁽³⁾.

À luz destes dados, os autores obtiveram, até o presente momento nestes dois casos relatados, resultados surpreendentes!

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Esperidião S, Begliomini H, Hypolito H, Figueredo AM, Coletta ENAM, Mattos Jr. D, Sadi A: Estudo de 74 pacientes azoospermicos. *J Bras Urol* 1991; 17:35-39
2. Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, Van Steirteghem AC: Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 1994; 61:1045-51
3. Van Steirteghem AC, Van der Elst J, Van den Abbeel E, Joris H, Camus M, Devroey P: Cryopreservation of supernumerary multicellular human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994; 62:775-80.

Hélio Begliomini