

Pode a performance no teste de penetração dos espermatozóides na clara do ovo predizer a fertilização de oócitos em cultura?

Dr. José G. FRANCO JUNIOR *, Dr. Ricardo R. BARUFFI **
Ana L. MAURI ***, Claudia G. PETERSON ***, Márcia S. CAMPOS ***

Resumo

Esse estudo testou a hipótese de que o teste de penetração dos espermatozóides na clara do ovo (TPECO) pode identificar uma população masculina com maior probabilidade de fertilizar oócitos em cultura. O TPECO foi executado num total de 70 amostras de esperma durante a investigação prévio ao programa de fertilização "in vitro" (FIV). Um volume de 5 ml de clara de ovo foi obtido por aspiração e o pH ajustado entre 7,0 e 7,5 com tampão Hepes. Em seguida, um capilar plano foi preenchido com clara de ovo, selado na parte superior e verticalmente colocado em contacto com 200 µl de uma amostra de sêmen liquefeito. A mistura foi incubada na temperatura de 37 °C por 90 minutos. O TPECO foi considerado normal quando o espermatozóides vanguardeiro atingiu uma distância ≥ 30 mm. Posteriormente, os 70 pacientes e suas esposas participaram do programa de FIV. O nível médio de clivagem embrionária foi de $68 \pm 33,65$. A sensibilidade do TPECO foi de 0,62 e a especificidade de 0,85, o valor preditivo do teste anormal de 0,35, e o valor preditivo do teste normal de 0,95 quando usado para avaliar a habilidade da população masculina para formar embriões. A eficácia (0,73) foi próxima da obtida com a análise morfológica dos espermatozóides (0,79). Por

outro lado, quando diferentes parâmetros do sêmen (concentração, morfologia e motilidade) e o TPECO foram comparados em termos de poder de identificar populações com ≥ 50 % ou < 50 % de níveis de clivagem embrionária, somente a morfologia e o TPECO mostraram uma significativa correlação ($p < 0,05$) com as taxas posteriores de clivagem embrionária. Em conclusão, o TPECO pode identificar uma população masculina com maior probabilidade de fertilizar oócitos em cultura.

Palavras chaves: previsão de fertilização de oócitos, espermatozóides, teste de penetração na clara do ovo.

Summary

The present study was carried out to test the hypothesis that the sperm (S) egg white (EW) penetration test (PT) can identify a male population likely to fertilize oocytes in culture. The sperm egg white penetration test (SEWPT) was applied to a total of 70 sperm samples during investigation preceding a program of in vitro fertilization (IVF). A 5 ml EW volume was obtained by aspiration and pH was adjusted to 7.0 to 7.5 with Hepes buffer. A plane capillary was then filled with EW, sealed at the upper end and vertically placed in contact with a 200 µl liquefied sperm sample. The mixture was incubated at

* Director do Centro de Reprodução Humana da Maternidade Sinhá Junqueira.

** Ginecologista do Centro de Reprodução Humana da Maternidade Sinhá Junqueira.

*** Biólogas do Centro de Reprodução Humana da Maternidade Sinhá Junqueira.

37 °C for 90 minutes. The SEWPT was considered normal when vanguard sperm covered a distance ≥ 30 mm. The 70 patients and their wives then participated in the IVF program. The mean embryo cleavage rate was 68 ± 33.65 . The sensitivity of the SEWPT was 0.62 and specificity 0.85, the predictive value of the anormal test was 0.35, and the predictive value of the normal test 0.95 when used to evaluate the ability of a male population to form embryos. Efficacy (0.73) was close to that obtained by analysis of sperm morphology (0.79). When different semen parameters (concentration, morphology and motility) and the SEWPT were compared in terms of power to identify populations with ≥ 50 % or < 50 % fertilization rates, only morphology and the SEWPT showed a significant correlation ($p < 0,05$) with later fertilization rates. We conclude that the SEWPT identified a male population likely to fertilize oocytes in culture.

INTRODUÇÃO

A atividade funcional dos espermatozoides pode ser avaliada por métodos biológicos e bioquímicos, como o teste de sobrevivência dos espermatozoides ¹, a determinação do inchaço da cauda dos espermatozoides em solução hiposmótica ², a penetração dos espermatozoides no oócito de hamster sem a zona pelúcida ³, a ligação dos espermatozoides na zona pelúcida isolada de oócitos humanos ⁴ ou sua habilidade para migrar no muco cervical bovino ⁵.

Hoje em dia, modificações das técnicas de fertilização "in vitro" convencional (inseminação concentrada) ou de microfertilização (inseminação intracitoplasmática, sub-zonal, etc) são comumente empegadas no tratamento do fator masculino. Dessa forma, a seleção prévia por testes de função espermática de uma população masculina capaz de falhar ou de obter taxas baixas de fertilização de oócitos, seria e vital importância na decisão do uso da técnica de reprodução assistida ideal.

Raramente, o teste de penetração dos espermatozoides no muco cervical ou substituto foi investigado com relação aos dados de fertilização ou não em FIV. Hull e cols ⁶ observaram que pacientes com testes pós-coito anormais são incapazes de obter resultados normais na fertilização de oócitos em laboratório. Berberoglucil e cols ⁷ afirmam que a penetração anormal dos espermatozoides no muco cervical (Teste de Kremer)

identifica uma população masculina com taxas baixas de fertilização de oócitos apesar de aparente qualidade normal da amostra de sêmen.

A padronização do muco cervical humano permanece um problema, e por essa razão seria mais prático usar substâncias substitutas com características similares aquelas do muco cervical humano ⁸. Uma das utilizadas com essa finalidade é a clara do ovo, por sua fácil obtenção, e manejo em laboratório ⁹. Entretanto, não há referências acerca do emprego do teste de penetração dos espermatozoides na clara do ovo (TPECO) como fator de previsão da fertilização de oócitos em cultura.

Esse trabalho visa testar a eficiência do TPECO na previsão da capacidade dos espermatozoides fertilizarem oócitos em laboratório.

MATERIAL E METODOS

O material consiste de 70 amostras de esperma de 70 homens que participaram do programa de FIV juntamente com suas esposas. As amostras foram coletadas por masturbação em frascos estéreis de plástico após um período mínimo de 2 dias de abstinência sexual, durante a rotina prévia de investigação do fator masculino para FIV. Após a liquefação completa do sêmen as seguintes características espermáticas (valores normais entre parênteses) foram avaliadas pelas técnicas padrões: concentração dos espermatozoides ($\geq 30 \times 10^6$ por ml), morfologia (≥ 30 %) e motilidade progressiva (≥ 30 %).

Um volume de 5 ml de clara do ovo é obtido por aspiração sendo o pH ajustado com tempão Hepes na faixa de 7,0 até 7,5. Em seguida, um capilar plano de vidro é preenchido com a clara de ovo, vedado na sua extremidade superior, colocado verticalmente em contacto com a amostra de esperma (200 μ l) e incubado na temperatura de 37 °C por 90 minutos. O TPECO foi considerado normal quando após o tempo de 90 minutos, o espermatozoide vanguardeiro atingiu ou ultrapassou a distância de 30 mm.

A idade das pacientes variou de $31,97 \pm 4,9$ (média \pm desvio padrão), destas 52 apresentaram infertilidade primária e 18 secundária. O fator tubo-peritoneal foi causa mais frequente de infertilidade (60 % dos casos), seguido da etiologia idiopática (17,28 %),

endometriose (12,72 %) e do fator masculino (10 %). A estimulação ovariana foi realizada com ciclo semiprogramado em 47 pacientes (pílula no mês anterior seguida de citrato de clomifeno, gonadotrofina menopausal humana e dexametasona) e com análogos de GnRH (protocolo longo de 1ª fase) seguido de gonadotrofina menopausal humana em 23 casos.

Em general, após o oitavo dia de estimulação, as pacientes foram avaliadas quanto ao desenvolvimento folicular por ultra-som usando-se um transdutor vaginal de 5 MHz. Observando-se um mínimo de dois com diâmetro de 17 mm, e na ausência da descarga endógena de hormônio luteinizante (LH), uma dose 10.000 UI de gonadotrofina coriônica humana (HCG) foi injetada intramuscular. A punção aspirativa foi realizada de 34 a 36 horas após HCG, os óocitos identificados no fluido folicular foram classificados em placas de Nunc (Nunclon, Denmark) contendo Menezo B₂ (Apy-System, Montalieu-Vercieu, France) enriquecido com 10 % de soro da paciente. Após 4 a 6 horas da coleta de óocitos, espermatozóides capacitados num volume de 100 a 200 µl foram usados para inseminar os óocitos.

A clivagem embrionária foi observada após 48 horas da inseminação. A análise estatística foi realizada pelo cálculo da sensibilidade, especificidade, eficácia (sensibilidade + especificidade/2), valor preditivo do teste normal ou anormal^{10, 11} e pelo teste exato de Fischer.

RESULTADOS

Um total de 70 amostras de sêmen foram submetidas ao TPECO sendo o resultado normal em 56 casos e anormal em 14 casos.

Além disso, a análise espermática das mesmas amostras evidenciaram uma concentração de espermatozóides (média ± desvio padrão) de 94,37 ± 58,14 (variação, 1 - 253), morfologia de 34,11 ± 11,15 (variação, 8 - 72) e motilidade de 61 ± 13,17 (variação, 14 - 90).

O número médio de óocitos colhidos foi de 6,46 ± 3,51, e a taxa média de clivagem embrionária de 68 ± 33,65 (variação, 0 - 100%) após 48 horas.

Na Tabela I comparou-se a população masculina com prévio TPECO normal ou anormal versus sua performance posterior no programa de FIV. Um total de 62 pacientes apresentaram clivagem de um ou mais embriões, e em 8 casos, não ocorreu clivagem.

Tabela 1

Comparação entre os resultados do teste de penetração dos espermatozóides na clara do ovo (TPECO) e a presença ou ausência de clivagem embrionária

TPECO	Embriões	
	um ou mais	nenhum
Normal	53	3
Anormal	9	5

A Tabela II mostra numa mesma população, a sensibilidade, especificidade, eficácia e o valor preditivo dos resultados do teste normal e anormal dos parâmetros convencionais da análise espermática (concentração, morfologia, motilidade) e do TPECO versus a capacidade de formar ou não embriões em cultura.

Tabela 2

Estatísticas propriedades da análise convencional dos parâmetros do esperma e do teste de penetração dos espermatozóides na clara do ovo na previsão da capacidade e uma população masculina formar embriões em cultura

Estatísticas propriedades	Concentração ≥ 20 x 10 ⁶ /ml	Morfologia ≥ 30 %	Motilidade ≥ 30 %	TPECO ≥ 30 mm
Sensibilidade	0,37	0,87	0,25	0,62
Especificidade	0,87	0,72	1,00	0,85
Eficácia	0,62	0,79	0,62	0,73
VPTA	0,27	0,29	1,00	0,35
VPTN	0,92	0,97	0,91	0,95

VPTA = valor preditivo do teste anormal.

VPTN = valor preditivo do teste normal.

TPECO = teste de penetração dos espermatozóides na clara do ovo.

A Tabela III apresenta a distribuição dos valores normais e anormais dos parâmetros convencionais do esperma e do TPECO versus o número de casos com taxa de clivagem $\geq 50\%$ ou $< 50\%$. O teste exato de Fisher identificou que apenas os dados obtidos pela análise da morfologia e do TPECO mostraram uma associação significativa com as taxas de fertilização ($p < 0,05$).

Tabela 3

Abilidade dos parâmetros (concentração, morfologia, motilidade) normais e anormais do sêmen e do teste de penetração dos espermatozóides na clara do ovo na identificação de indivíduos com $\geq 50\%$ ou $< 50\%$ de taxas de clivagem embrionária.

Parâmetro	Taxa clivagem		Teste de Fisher
	$\geq 50\%$	$< 50\%$	
Concentração			
Normal	49	13	NS
Anormal	4	4	
Morfologia			
Normal	39	7	$p < 0,05$
Anormal	14	10	
Motilidade			
Normal	53	15	NS
Anormal	0	2	
TPECO			
Normal	46	10	$p < 0,05$
Anormal	7	7	

NS = not significant

DISCUSSÃO

Em geral, avalia-se um teste de função espermática por sua capacidade de separar uma população masculina fértil de uma infértil, pelo poder de identificar "in vitro" uma população masculina com taxas de fertilização $\geq 50\%$ daquela com $< 50\%$, ou de detectar populações com falha total na fertilização.

Barrat e cols.¹² evidenciaram que o teste de penetração dos espermatozóides no muco cervical poderia ter valor preditivo da fertilização do oócitos humanos, com ausência de resultados falso positivo, isto é, nenhuma fertilização ocorreu quando não foi observa-

da penetração no muco cervical.

Em 1993, Berberoglucil e cols.⁷ observaram que os pacientes com testes anormais de penetração dos espermatozóides no muco cervical (teste de Kremer) possuíam uma diminuição da habilidade de fertilizar oócitos "in vitro" apesar das amostras de esperma serem consideradas normais. Além disso, aqueles com amostras de sêmen normais apresentaram diferentes taxas de fertilização, dependendo dos resultados obtidos no teste de Kremer. Dessa forma, uma penetração anormal no muco cervical estaria associada com taxas de fertilização baixas e um alto risco de falha total na fertilização.

Por outro lado, as informações são raras sobre o uso do TPECO como método de avaliação da função espermática, apesar da clara do ovo ser um adequado substituto para o muco cervical humano. Em 1988, Marmar⁹ mostrou que 98,1% dos indivíduos com provada fertilidade apresentaram TPECO normal, enquanto que 47,9% dos inférteis mostraram TPECO anormal. Desde que a penetração no muco cervical é influenciada pela velocidade dos espermatozóides e pelo descolamento lateral da cabeça dos espermatozóides^{13, 14}, a penetração na clara de ovo poderia estar diretamente associada com estas propriedades.

Os dados desse trabalho (Tabela 1) mostraram que o TPECO normal está associado com uma maior capacidade de formar embriões em laboratório. Uma análise comparativa das propriedades estatísticas (Tabela 2) da população masculina evidenciou que os parâmetros de maior eficácia para prever a fertilização de no mínimo um oócito foram a morfologia dos espermatozóides (0,79) e o TPECO (0,73).

Na Tabela 3 compara-se o poder de diferentes parâmetros de avaliação da função espermática na identificação de populações com taxas de fertilização $\geq 50\%$ ou $< 50\%$, outra vez observa-se que apenas os resultados prévios da morfologia e do TPECO possuem significativa associação ($p < 0,05$) com os índices posteriores de clivagem embrionária.

Em conclusão, o TPECO é um método barato de avaliação da função espermática simple e barato. Além disso, possui eficácia semelhante a morfologia na identificação da presença ou ausência de fertilização de oócitos em cultura, e na previsão da população masculina com taxas de clivagem $\geq 50\%$ ou $< 50\%$.

BIBLIOGRAFIA

- 1 PURDY JM: Methods for fertilization and embryo culture in vitro. In: Human conception in vitro. Eds. RG Edwards, JM Purdy - Academic Press. London 1982. p. 135 - 148.
- 2 JEYENDRAN RS, VAN DER VEN HH, PEREZ-PELAZ M, CRABO BG, ZANEVELD LJD: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984, 70: 219.
- 3 STENCHEVER MA, SPADONI LR, SMITH WD, KARPLE, SHY KK, MOORE DE, BERGER R: Benefits of the sperm (hamster ova) penetration assay in the evaluation of the infertile couple. *Am J Obstet Gynecol* 1982, 143: 91.
- 4 CODDINGTON CC, FULGHAM DL, ALEXANDER NJ, JOHNSON D, HERR JC, HODGEN GD: Sperm bound pellucida in hemizona assay demonstrate acrosome reaction when stained with T-6 antibody. *Fertil Steril* 1990, 54: 504.
- 5 BARRATT CLR, MCLEOD ID, DUNPHY BC, COOKE ID: Prognostic value of two putative sperm function tests: hypo-osmotic swelling and bovine sperm mucus penetration test (Penetrak). *Human Reprod* 1992, 7: 1240.
- 6 HULL MGR, MCLEOD FN, JOYCE DN, RAY BD, MAC DERMOTT A: Human in vitro fertilization, in vivo sperm penetration of cervical mucus and unexplained infertility. *Lancet* 1984, 2: 245.
- 7 BERBEROGLUCIL P, ENGLERT Y, VAN DEN BERGH M, RODESCH C, BERTRAND E, BIRAMANE J: Abnormal sperm-mucus penetration test predicts low in vitro fertilization ability of apparently normal semen. *Fertil Steril* 1993, 59: 1228.
- 8 BLASCO L: Clinical tests of sperm fertilizing ability. *Fertil Steril* 1984, 41: 177.
- 9 MARMAR JL: Idiopathic male infertility. In: Current therapy of infertility. Eds. CR Garcia, L Mastroianni. RD Amelar, L Dubin - BC Decker Inc. Toronto 1988. p. 196 - 201.
- 10 PENG HQ, COLLINS EH, WILSON EH, WRIXON W: Receiver-operations characteristics curves for semen analysis variables: methods for evaluation of diagnostic tests for male gamete function. *Gamete Res* 1987, 17: 229.
- 11 STEMPEL LE: Eerie, eerie, mini, mo..... What do the data really show? *Am J Obstet Gynecol* 1982, 144: 745.
- 12 BARRAT CLR, OSBORN JC, HARRISON PE, MONKS N, DUNPHY BC, LENTON EA, COOKE ID: The hypo-osmotic swelling test and the sperm-mucus penetration test in determining fertilization of the human oocyte. *Hum Reprod* 1989, 4: 430.
- 13 AITKEN RJ, SUTTON M, WARNER P, RICHARDSON DW: Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona free hamster oocyte. *J Reprod Fertil* 1985, 73: 441.
- 14 MORTIMER D, PANDYA IJ, SAWERS RS: Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *J Reprod Fertil* 1986, 78: 93.