

MARIA CRISTINA SANTORO BIAZOTTI

**DESEMPENHO DAS TÉCNICAS DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*
CONVENCIONAL E INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA,
SEGUNDO A QUALIDADE DO SÊMEN**

Tese de Doutorado

**UNICAMP
2004**

MARIA CRISTINA SANTORO BIAZOTTI

**DESEMPENHO DAS TÉCNICAS DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*
CONVENCIONAL E INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA,
SEGUNDO A QUALIDADE DO SÊMEN**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tocoginecologia, área de Tocoginecologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS BAHAMONDES

**UNICAMP
2004**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

B47d Biazotti Maria Cristina Santoro
Desempenho das técnicas de fertilização in vitro convencional e injeção intracitopasmática, segundo a qualidade do sêmen / Maria Cristina Santoro Biazotti. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Luis Bahamondes
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Espermatozóide. 2. Infertilidade. 3. Reprodução humana. 4. Óvulos. I. Luis Bahamondes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: MARIA CRISTINA SANTORO BIAZOTTI

Orientador: Prof. Dr. LUIS GUILLERMO BAHAMONDES

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

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

Data: 27/02/2004

À ma Mère,

*En ce beau jour, d'anniversaire
Ô mon aimée, ma tendre mère
Dois je te dire que l'amour
Que j'ai pour toi, la nuit, le jour
N'est que simple reconnaissance
De la bonté, la bienfaisance
De l'embassable dévouement
Que chaque jour, à tout moment
Tu m'as toujours donné la preuve,
Dans la vie et parfois l'épreuve,
Me soutenant de ton amour
Sans jamais défailler un jour
Je t'adore ô ma chère mère
De cela tu ne dois douter
Ta Cristina, aimant fille
Jamais ne pourra oublier
Tes témoignages de tendresse
Et la douceur de tes caresses
Lorsque elle était petite enfant
Et qu'elle aimé toujours autant
De bien loin, ma chère mère,
Reçois mille baisers bien doux
En attendant le jour
De me retourner près de vous
Tu voudras bien les partager
Avec ma tante bien aimé
Que j'aime bien fort elle aussi.*

*À minha mãe Hérmínia,
com muita saudade.*

*À minha tia Lucrecia,
pelas emoções não compartilhadas.*

*Ao meu pai Gabriel,
com respeito e admiração.*

*Ao Antônio David,
com amor e carinho.*

*Aos meus irmãos Luiz, Laerte, Lineu, Lorival e Mauro,
pela presença constante nos momentos difíceis.*

*À Ana Carina, Antonio David Neto, Fábio, Felipe,
Isabella, Maria Gabriela, Rafael e Thiago:
por existirem.*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Guillermo Bahamondes, pelos conselhos experientes e marcantes contribuições nestes anos todos de aprendizagem.

Ao meu amigo, Dr. Patrick Bastit, pela sabedoria, simplicidade, generosidade e por ter aberto as portas que facilitaram minha trajetória na área de Reprodução Humana, em uma época em que tudo era ainda muito obscuro. A ele, minha eterna gratidão.

Às biólogas francesas Simone Genty e Patrícia Brulin por tudo que aprendi no dia-a-dia de vários anos e pelos valiosos conhecimentos que trouxe na bagagem. Merci!

À Nathalie e Blondine, pela disponibilidade e efetivo apoio na realização deste estudo.

À minha grande amiga, Dra. Maryvonne Fouquet Robert pelo carinho e por valiosos conselhos. A ela, minha eterna admiração.

Ao conceituado estatístico Prof^o Dr. Edson Zangiacomi Martinez, brilhante profissional, pelos preciosos ensinamentos e exaustiva manipulação técnica dos dados.

Aos Profs. Drs. Dirceu Mendes Pereira e Jonathas Borges Soares, pelos bons exemplos de integridade e dinamismo e por aceitarem, prontamente, participar da Banca desta tese.

À Prof^a Dr^a Arlete Fernandez, pelas qualidades humanas, pelos bons exemplos científicos e profissionais e por ter participado da Banca do Exame de Qualificação.

Ao Prof^a. Dr^a Cristina Laguna Benetti Pinto, pela brilhante e generosa atenção dedicada a este trabalho e por ter aceitado participar da Banca do Exame de Qualificação.

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

Ao Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Costa Paiva, pela grandeza de caráter e interesse sincero na concretização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Sophie Françoise Mauricette Derchain, amiga e conselheira, pelos bons exemplos de determinação e perseverança.

À Prof^a Dr^a Viviane Herrmann, amiga e companheira, pelo carinho de sempre.

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

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, pelo carinho e amizade.

À Dr^a Mônica de Oliveira Jorge, grande 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, Neder Piagentini do Prado, Cylene Camargo, Fernanda Atibaia, Cristiane Patrícia Freitas, pela excelente atividade de apoio técnico.

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

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

À família Vicente, e em especial a Dona Dulce França Rodrigues Vicente pelo amor e carinho de todo dia.

À querida amiga Leonor Chaib Moussali, pela presença marcante nas horas difíceis. À ela, meu eterno carinho.

À Dra. Rosana Kesrouani, amiga e conselheira pela sensibilidade e sincera amizade.

À Gertrudes dos Santos Castro (Tudinha), fiel companheira, cuja alegria e simplicidade marcaram a minha trajetória.

À Vera Lúcia Sales e Gleuda Maria Jairi, afetuosas e dedicadas, por participarem direta ou indiretamente da minha vida e na finalização deste estudo.

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

Aos casais participantes do programa de FIV, 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.

La science sans conscience n'est que ruine de l'âme.

Segundo Patrick Bastit – especialista em Reprodução Humana

*“L'homme nâit avec l'esprit du bien et du mal
en lui, ,deux forces qui s'affrontent.*

*Interviennent, alors, l'éducation qu'il reçois, la
chance, la malchance et la souffrance sous
toutes leurs formes”*

Segundo papie A. Jeannin – *Capitaine au Long Cours C.H.*

Sumário

| | |
|--|----|
| Símbolos, Siglas e Abreviaturas | |
| Resumo | |
| Summary | |
| 1. Introdução | 17 |
| 1.1. Fator masculino | 23 |
| 1.1.1. Capacitação e Fecundação | 25 |
| 1.1.2. Testes de função espermática | 26 |
| 1.2. Interação espermatozóide e ZP | 28 |
| 1.3. Indicações para a técnica de ICSI | 29 |
| 2. Objetivos | 32 |
| 2.1. Objetivo geral | 32 |
| 2.2. Objetivos específicos | 32 |
| 3. Sujeitos e Métodos | 33 |
| 3.1. Desenho do estudo | 33 |
| 3.2. Tamanho da amostra | 33 |
| 3.3. Seleção dos sujeitos | 33 |
| 3.4. Critérios de inclusão | 34 |
| 3.5. Critérios de exclusão | 34 |
| 3.6. Variáveis | 34 |
| 3.6.1. Variáveis independentes | 34 |
| 3.6.2. Variável dependente | 36 |
| 3.7. Coleta das amostras de gametas | 37 |
| 3.8. Processamento das amostras | 37 |
| 3.8.1. Descrição das técnicas | 40 |
| 3.9. Processamento dos dados | 46 |
| 3.10. Análise dos dados | 46 |
| 3.11. Aspectos éticos | 47 |
| 4. Resultados | 48 |
| 5. Discussão | 57 |
| 6. Conclusões | 69 |
| 7. Referências Bibliográficas | 70 |
| 8. Bibliografia de Normatizações | 85 |
| 9. Anexos | 86 |
| 9.1. Anexo 1 – Carta de Autorização para Estudo dos Dados | 86 |
| 9.2. Anexo 2– Classificação da Morfologia Espermática segundo David et al., 1975 | 88 |
| 9.3. Anexo 3 – Ficha de Avaliação Espermática | 89 |
| 9.4. Anexo 4 – Ficha de Dados Coletados em Fertilização in vitro | 90 |

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

| | |
|-----------------|--|
| CAISM | Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher |
| Cat. | Catálogo |
| Cemicamp | Centro de Pesquisa e Controle das Doenças Materno-Infantis de Campinas |
| Concentr | Concentração de espermatozóides (milhões/ml) |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DP | Desvio padrão |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FIV | Fertilização <i>in vitro</i> |
| ICSI | Injeção intracitoplasmática |
| Mot. A | % de espermatozóides móveis do grau A |
| ml | Mililitro |
| Normais | % de espermatozóides normais |
| Óvulos | Número de óvulos maduros |
| PR | Espermatozóides progressivos rápidos |

| | |
|-------------------|-----------------------------------|
| Ref. | Referência |
| Taxa Fert. | Taxa de fertilização |
| Unicamp | Universidade Estadual de Campinas |
| USA | <i>United State of America</i> |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

Resumo

Este foi um estudo de coorte retrospectivo, que teve como objetivo comparar as técnicas de fertilização *in vitro* (FIV) convencional e injeção intracitoplasmática (ICSI), tendo como base algumas características do sêmen. Foram analisados 4.016 procedimentos de reprodução assistida, sendo 1.832 de fertilização *in vitro* convencional e 2.184 de injeção intracitoplasmática. A avaliação dos gametas e as técnicas de FIV foram realizadas no Laboratório de Reprodução Humana da Clínica Saint-Antoine na cidade de Bois Guillaume – França. Para análise dos dados foram consideradas variáveis independentes o ano de realização dos procedimentos de FIV convencional e ICSI, a idade das mulheres submetidas à FIV, a concentração de espermatozóides, a porcentagem de espermatozóides progressivos rápidos, a porcentagem de espermatozóides normais, a qualidade espermática, o número de óvulos e a técnica de fertilização *in vitro*. A variável dependente foi a taxa de fertilização. Para avaliação estatística utilizou-se a análise de regressão logística múltipla. A única variável que teve influência na

taxa de fertilização foi a técnica utilizada. As variáveis espermáticas estudadas não tiveram influência na taxa de fertilização quando se considerou a amostra de sêmen normal. Concluindo, em mulheres até 38 anos de idade, cujos companheiros tinham sêmen normal ou anormal leve e moderado, a técnica de FIV foi superior à técnica de ICSI, considerando-se a taxa de fertilização.

Summary

This was a retrospective cohort study, which compared the conventional *in vitro* fertilization technique (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) according to some characteristic of the semen. A total of 4,016 procedures of assisted reproductive procedures, included 1,832 conventional IVF and 2,184 ICSI. The evaluation of gametes and the IVF's techniques were performed at the Laboratory of Human Reproduction of the Clínica Saint-Antoine Bois Guillaume, France. For the analysis of the data, it considered as independent variables the year when the procedures (conventional IVF and ICSI) was done, the women's age, the concentration of spermatozoa, the percentage of fast progressive spermatozoa, the percentage of normal spermatozoa, the sperm quality, number of the oocytes and the technique of IVF. The dependent variable was the fertilization rate. For statistical analysis it was use the multiple logistic regression. It was observed that the variable with high association to the fertilization rate was the technique (conventional IVF and ICSI) used. The sperm variables did not

have influence in the fertilization rate when it considered sample of normal semen. In conclusion, in women up to 38 years old, whose partners had normal semen or some anormality, the conventional IVF technique was superior than ICSI, taking into account the fertilization rate.

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 e EDWARDS (1978) finalmente obtiveram sucesso durante o tratamento de uma mulher infértil, com obstrução tubária, permitindo o nascimento de Louise Brown, em Cambridge, no Reino Unido.

Durante esse 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 conhece 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 e 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 e 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 *et al.* (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 documentar a fertilização *in vitro* em coelhas, transferindo conceptos 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, entre eles,

EDWARDS *et al.* (1966) que após diversos experimentos, concluíram que o que frustrou o trabalho de pesquisadores como MENKIN e 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 e permitia um estudo mais detalhado do gameta feminino. Posteriormente, os esforços voltaram-se para a tentativa de capacitação do espermatozóide, com o propósito de torná-lo apto a fecundar (JONES, 1991).

Em 1980, LOPATA *et al.* documentaram o primeiro sucesso em fertilização *in vitro* na Austrália, Universidade de Melbourne, com o nascimento de Candice Reed, após a transferência de um pré-embrião no estágio de oito células, originário de um único oócito aspirado com o auxílio da laparoscopia, durante um ciclo natural (LOPATA *et al.*, 1980). Na mesma época, nos Estados Unidos (EUA), pesquisadores obtinham gametas femininos em ciclos naturais, realizavam transferências de embriões, porém não conseguiam 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).

A técnica de fertilização *in vitro* evoluiu consideravelmente e foi utilizada com maior frequência no tratamento da infertilidade por diversas causas; entretanto, quando realizada no tratamento da infertilidade masculina severa,

está associada a baixas taxas de fertilização e gravidez (MAHADEVAN *et al.*, 1983; ACOSTA *et al.*, 1986; LANZENDORF *et al.*, 1988). Esta técnica inicial levou ao desenvolvimento de várias outras, entre elas a técnica de GIFT (*gamete intrafallopian transfer*) descrita por ASCH *et al.* (1986). Cada etapa continuou a ser aperfeiçoada, sendo que a simplificação do método e o aperfeiçoamento na qualidade dos resultados foram desenvolvidos por diversas equipes.

A FIV foi inicialmente desenvolvida para tratar a infertilidade feminina, porém o interesse potencial nas alterações 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.

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 de espermatozóides, utilizando-se um hemocítômetro, foi realizada por LODE² (1895). Anos após, MACLEOD e GOLD (1951) deram um passo significativo no conhecimento do sêmen humano, realizando um vasto estudo comparativo em mais de mil 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,

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.

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.

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

Nos últimos 20 anos, diversas técnicas de reprodução assistida vêm sendo desenvolvidas na tentativa de melhorar as chances de gravidez para casais inférteis devido ao fator masculino, ou ainda para auxiliar os casais em que a FIV convencional não foi satisfatória.

Na tentativa de melhorar as possibilidades terapêuticas, várias outras técnicas foram surgindo. MANHES e 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 (*Zygotu intra-Fallopian Transfer* ou ZIFT), em casos de esterilidade por fator masculino associado ao auto-anticorpo e à ausência de alteração tubária, o que, posteriormente, foi aplicado por outros autores (PALERMO *et al.*, 1989). BALMACEDA *et al.*, (1988) relataram outra possibilidade de tratar o fator

masculino, que consistia na transferência do embrião para o interior da trompa. Entretanto, nem sempre se obteve sucesso nos casos de fator masculino severo.

Várias técnicas de micromanipulação, progressivamente mais invasivas, foram sendo desenvolvidas para transpor a zona pelúcida, ultrapassando a barreira entre o óvulo e espermatozóides e aumentando as chances de fertilização. Em 1989, MALTER e COHEN permitiram uma melhora nos resultados de FIV com a dissecação parcial da zona pelúcida (PZD), previamente à inseminação do oócito.

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).

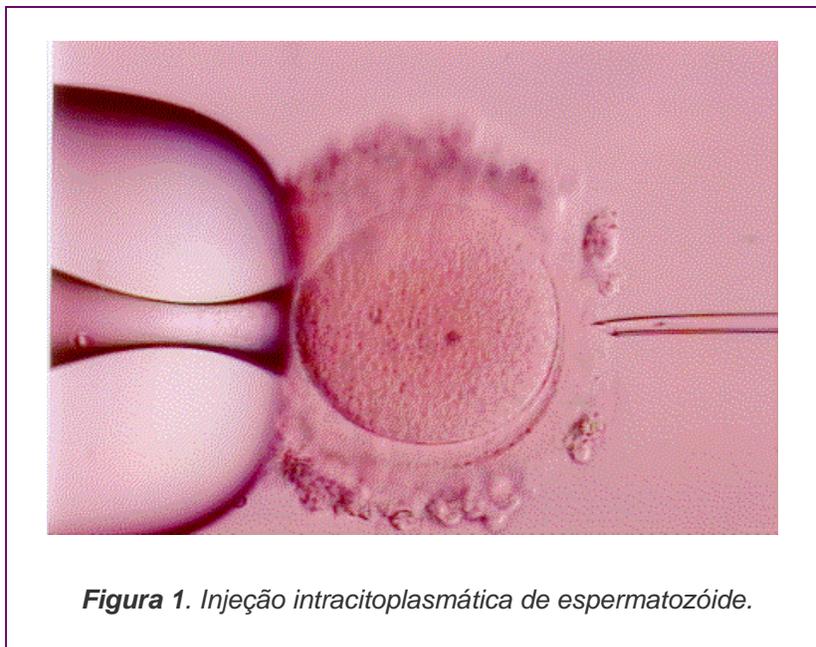


Figura 1. Injeção intracitoplasmática de espermatozóide.

A ICSI tornou possível a concepção em muitos casais com infertilidade masculina, e vem sendo indicada nos casos de falha na fertilização após FIV convencional (KASTROP *et al.*, 1999; FISHEL *et al.*, 2000), disfunção ejaculatória, infertilidade imunológica e tratamento de pacientes com câncer submetidos a quimioterapia ou radioterapia (NAYSMITH *et al.*, 1998; HORNE *et al.*, 2001).

1.1. Fator masculino

Fator masculino de infertilidade é um termo utilizado por especialistas em reprodução assistida e descreve casais em que a incapacidade de conceber está associada a problemas identificados no parceiro masculino. Este distúrbio espermático pode estar associado à baixa produção de espermatozóides (oligospermia), alteração na motilidade (astenospermia) ou morfologia anormal (teratospermia).

Em uma análise convencional, parâmetros normais incluem: concentração espermática superior a 20 milhões de espermatozóides por mililitro de sêmen; motilidade espermática superior a 50% e acima de 30% de espermatozóides morfolologicamente normais (WHO, 1992). Dados de programas de reprodução assistida sugerem que, quando a morfologia espermática for inferior a 15% de formas normais, usando métodos e definições descritos no manual de laboratório da Organização Mundial de Saúde, a taxa de fertilização *in vitro* diminui (WHO, 1999). KRUGER *et al.* (1988), 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 espermatozoides normais inferior a 14% apresentam um pior prognóstico nos resultados de FIV (GROW *et al.*, 1994). Isto foi demonstrado tanto nos procedimentos de FIV como na transferência de gametas para o interior da trompa (KRUGER *et al.*, 1988; HINTING *et al.*, 1990; MENKVELD *et al.*, 1990; ENGINSU *et al.*, 1991; GROW *et al.*, 1994).

Quando, na avaliação do casal infértil, houver suspeita de alteração no fator masculino, serão necessárias uma avaliação clínica e laboratorial detalhada e várias análises seminais. Em algumas situações indicam-se testes adicionais. Para homens com azoospermia ou severa oligozoospermia (concentração espermática inferior a cinco milhões por mililitro de sêmen), deve-se considerar a possibilidade de anomalias do cariótipo como Síndrome de Klinefelter. E ainda, 13% dos pacientes com azoospermia têm microdeleções no cromossomo Y (SCHLEGEL e GIRARDI, 1997). Para homens com agenesia congênita do canal deferente, unilateral ou bilateral, é necessário um estudo genético para afastar a presença do gen regulador da fibrose cística (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* - CFTR) considerando que 55% a 82% dos homens com agenesia congênita do canal deferente carregam mutações detectáveis deste gen (SCHLEGEL *et al.*, 1996). Em adição, estima-se que pacientes com obstrução epididimal idiopática têm 47% de chance de carrear uma mutação da CFTR (JARVI *et al.*, 1995). Caso exista outra suspeita de alteração genética como, por exemplo, Síndrome de Klinefelter ou em casais em que a parceira tiver mais de 40 anos, recomenda-se o aconselhamento genético antes do tratamento com fertilização *in vitro*.

A grande maioria dos homens inférteis é passível de tratamento e pode recorrer a técnicas de reprodução assistida; porém, antes de recorrer a uma técnica mais invasiva, deve-se preconizar o tratamento clínico ou cirúrgico caso seja possível e necessário: varicocele, distúrbios endócrinos, infecção do trato genital ou obstruções passíveis de correção cirúrgica. Caso a gravidez não aconteça, poderá ser indicada uma técnica de reprodução assistida. Estas técnicas incluem: inseminação intra-uterina (IIU), fertilização *in vitro* (FIV convencional), e FIV com micromanipulação (ICSI). Em algumas situações, o tratamento específico do homem pode ser menos invasivo, mais efetivo, menos custoso e de menor risco que a FIV.

1.1.1. 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 seminal 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: aumentam as amplitudes 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 et al., 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, *et al.*, 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.

1.1.2. Testes de função espermática

A avaliação espermática e os testes funcionais no sêmen são necessários no diagnóstico da infertilidade masculina e seleção de pacientes para FIV convencional ou ICSI. Na FIV convencional a função espermática é essencial para que ocorra fertilização: o espermatozóide precisa ser capaz de atingir a zona pelúcida (ZP), desencadear a reação acrossômica, atravessar a zona pelúcida e atingir o citoplasma, permitindo que ocorra a fertilização. Em contraste, a maioria das funções espermáticas não é necessária para a fertilização quando se utiliza a técnica de ICSI, já que o espermatozóide atravessa a ZP e a membrana citoplasmática através da introdução de uma fina agulha para o interior do citoplasma do óvulo. A decisão clínica sobre a indicação de FIV

convencional ou ICSI depende dos resultados dos testes espermáticos. Porém, a análise espermática convencional não permite informações suficientes sobre o potencial de fertilização do sêmen, considerando-se que muitas alterações não podem ser detectadas. Diversos testes de função espermática são necessários para detectar defeitos na qualidade do sêmen e, conseqüentemente, possíveis falhas na FIV convencional. A morfologia estrita está fortemente relacionada com a taxa de fertilização na FIV convencional e é bastante útil na seleção de pacientes para ICSI (LIU e BAKER, 2002).

Nos últimos 15 anos muitos autores vêm desenvolvendo testes para avaliar a interação espermatozóide e ZP, buscando informações importantes sobre a habilidade de fertilizar, que tenham valor clínico no prognóstico da taxa de fertilização no FIV convencional (LIU e BAKER, 2000). Estes autores desenvolveram vários testes de função espermática e avaliaram o valor clínico de cada um deles. Entre eles: união espermatozóide-ZP (*sperm ZP-binding*), penetração espermatozóide-ZP e indução da reação acrossômica -ZP. Segundo estes autores, os dois primeiros são os mais poderosos indicadores da habilidade do espermatozóide em fertilizar *in vitro*. A indução da reação acrossômica-ZP está fortemente relacionada à penetração espermatozóide-ZP. Portanto, a combinação da análise seminal com testes avançados de função espermática permite importante informação diagnóstica e prognóstica para infertilidade masculina e é crucial na seleção de pacientes para tratamento com FIV convencional ou ICSI.

Vários estudos sobre testes de função espermática foram realizados para avaliar a relação existente entre defeitos no sêmen e falha na fertilização *in vitro*

(LIU e BAKER, 1992a; 1994). A análise estatística mostrou que a proporção de ZP penetrada, o número de espermatozóides presentes na ZP e a porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais mantiveram estreita relação com a taxa de fertilização *in vitro*. Um estudo posterior realizado em oócitos de 369 casais, submetidos a FIV convencional, com total falha de fertilização, revelou que a maior causa de falha na FIV é um defeito na interação espermatozóide e ZP (LIU e BAKER, 2000).

1.2. Interação espermatozóide e ZP

A interação espermatozóides e ZP está relacionada com a integridade funcional de ambos os gametas. Anomalias no sêmen ou óvulo afetam a interação espermatozóide e ZP. Entretanto, a maturidade do oócito humano não afeta esta etapa. Não existe relação entre o número de espermatozóides presentes na ZP e a qualidade do oócito (LIU *et al.*, 1989; LIU e BAKER, 1992b). Estudos posteriores concluíram que casais com completa falha da fertilização e presença de raros espermatozóides na zona pelúcida devem apresentar alterações no sêmen, e não nos oócitos. De modo geral, quando a maioria, ou todos os oócitos, não fertilizar, existe um distúrbio no sêmen (LIU e BAKER, 2000).

Vários aspectos da função espermática afetam a interação espermatozóide e ZP. Morfologia espermática normal é uma das mais significantes variáveis da análise do sêmen, relacionada à interação espermatozóide e ZP (LIU *et al.*, 1988; 1989; LIU e BAKER, 1992b). Isto pode explicar porque a morfologia espermática

normal está fortemente relacionada à taxa de fertilização *in vitro* convencional. Motilidade e concentração espermática, avaliadas no meio de inseminação, também estão relacionadas com a interação espermatozóide e ZP (LIU *et al.*, 1988;1989). Os testes de interação espermatozóide e ZP refletem múltiplas funções espermáticas (LIU e BAKER, 1992a) e os resultados estão significativamente relacionados com as taxas de fertilização *in vitro* convencional.

1.3. *Indicações para a técnica de ICSI*

A técnica de ICSI transpõe as anormalidades espermáticas associadas a uma inadequada concentração (oligospermia) e/ou defeitos na motilidade (astenospermia) devido a deficiências funcionais ou estruturais. Permite ainda a fertilização nos casos com morfologia espermática alterada (teratospermia), geralmente associada à disfunção na membrana espermática e/ou acrossoma, resultando em uma inadequada interação com a ZP e/ou membrana citoplasmática. A ICSI também está indicada quando anticorpos anti-espermatozoides estão presentes, talvez por impedir seu efeito negativo sobre a motilidade espermática.

Se por um lado, a injeção intracitoplasmática é capaz de superar as disfunções espermáticas relacionadas ao transporte do espermatozóide através das camadas do óvulo, por outro, é pouco provável que auxilie nos casos em que a falha na fertilização esteja associada a alterações espermáticas nucleares (cromatina ou DNA) e conseqüente distúrbio no processo de descondensação celular, impedindo a formação do pronúcleo masculino.

Em se tratando do gameta feminino, pode-se especular que a ICSI permite a fertilização quando deficiências isoladas na ZP estão presentes. Estes defeitos podem ser estruturais ou funcionais. Em adição, a técnica de ICSI pode superar defeitos isolados na membrana citoplasmática. Entretanto, é conhecido que anormalidades na ZP, particularmente de origem genética, estão associadas a distúrbios mais severos (GREENHOUSE *et al.*, 1998) e em alguns casos a técnica de ICSI não traz resultados satisfatórios. É ainda duvidoso se a ICSI pode ser usada nos casos de aneuploidia ou alteração no DNA, ou quando severas aberrações citoplasmáticas (estruturais ou funcionais) estão presentes resultando em falha no processo de ativação oocitária, formação do pronúcleo feminino e divisão celular inicial.

Diversos grupos têm publicado diferentes critérios para pacientes que seriam beneficiados com ICSI. Estes critérios incluem anomalias detectadas na análise do sêmen, desde uma severa oligospermia ($< 2 \times 10^6$ espermatozoides/ml), acentuada astenospermia ($< 5\%$ espermatozoides móveis), teratospermia severa ($< 4\%$ formas ovais), necessidade de cirurgia para captação do espermatozoide e falha na FIV convencional. Indicações relativas incluem anticorpo antiespermatozoide e inadequada fertilização em ciclo precedente (SCHLEGEL e GIRARDI, 1997). Em adição, LUDWIG e KATALINIC (2003) propuseram a indicação de ICSI, independentemente da qualidade do sêmen, em casais com um número reduzido de óvulos.

É consenso firmado que a técnica de ICSI é efetiva e deve ser indicada no tratamento de casais inférteis com sêmen anormal. Porém, alguns autores

advogam o uso da injeção intra-citoplásmica para todos os casais com indicação para FIV.

As evidências atuais sinalizam que a técnica de ICSI não deveria ser oferecida a todos os casais que necessitem de FIV, mas somente para casais com fator masculino severo e/ou falha na fertilização, quando utilizado FIV convencional. Este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho das técnicas de FIV convencional e ICSI no tratamento de casais inférteis com sêmen normal e alterado.

2. Objetivos

2.1. *Objetivo geral*

Avaliar o desempenho das técnicas de FIV convencional e ICSI em casais inférteis, com diferentes qualidades de sêmen.

2.2. *Objetivos específicos*

- Comparar as taxas de fertilização *in vitro* nas técnicas de FIV convencional e ICSI em casais com sêmen normal, *borderline* e anormal.
- Comparar as taxas de fertilização *in vitro* nas técnicas de FIV convencional e ICSI em casais com sêmen anormal (leve, moderado).
- Avaliar a influência da concentração, motilidade e morfologia espermática na taxa de fertilização em casais submetidos à técnica de FIV convencional e ICSI.

3. Sujeitos e Métodos

3.1. *Desenho do estudo*

Estudo de coorte retrospectivo não randomizado.

3.2. *Tamanho da amostra*

A amostra constituiu-se da análise secundária de dados provenientes de 4.016 casais inférteis submetidos à fertilização assistida, utilizando-se as técnicas de FIV convencional e ICSI.

3.3. *Seleção dos sujeitos*

Os dados dos casais foram obtidos a partir de um banco contendo informações de todos os pacientes atendidos no Ambulatório de Infertilidade Conjugal da Clínica Saint-Antoine, em Bois Guillaume (França), participantes do programa de Fertilização Assistida, no período de 1998 a 2002.

3.4. ***Critérios de inclusão***

—Casais inférteis inscritos no Programa de Fertilização Assistida da Clínica Saint-Antoine em Bois Guillaume (França), submetidos a tratamento pelas técnicas de FIV convencional e ICSI.

3.5. ***Critérios de exclusão***

- Pacientes com azoospermia;
- Pacientes com espermocultura positiva;
- Pacientes com recrutamento insuficiente de óvulos e cancelamento do ciclo;
- Mulheres inférteis com idade superior a 38 anos.

3.6. ***Variáveis***

3.6.1. ***Variáveis independentes***

- Ano de realização dos procedimentos de FIV convencional e ICSI, no serviço estudado - período de 1998 a 2002.
- Técnica de fertilização in vitro - processo de fertilização do óvulo pelo espermatozóide, em laboratório, classificada em FIV convencional ou ICSI.
- Idade da mulher - categorizadas em faixas de 20 - 24; 25 - 29; 30 - 34 e 35 - 38 anos.

- Concentração de espermatozoides: número de espermatozoides por mililitro de sêmen, medido com o auxílio da câmara de Thomas ou de Makler, expresso em milhões/ml. Categorizada em 3 grupos: <10 milhões/ml; 10 a 20 milhões/ml, > 20 milhões/ml.
- Motilidade grau A: porcentagem de espermatozoides móveis classificados em progressivos linear e rápido. Categorizada em 2 grupos: < 25% e \geq 25% de espermatozoides com motilidade progressiva linear e rápida.
- Morfologia: porcentagem de espermatozoides normais e anormais, em cada amostra de sêmen, analisados após a coloração pelo método de Papanicolaou e contagem de 200 células. Categorizada em 2 grupos: < 14% e \geq 14% de espermatozoides com morfologia normal.
- Qualidade espermática: Quanto à qualidade espermática, as amostras de sêmen foram classificadas em normal, *borderline* e anormal (Quadro 1).

QUADRO 1

CLASSIFICAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN

| Concentração | Motilidade | Morfologia | Qualidade sêmen |
|----------------------|---------------|--------------------|-------------------|
| \leq 20 milhões/ml | \geq 25% PR | \geq 14% normais | <i>borderline</i> |
| < 20 milhões/ml | < 25% PR | < 14% normais | anormal |
| \leq 20 milhões/ml | < 25% PR | \geq 14% normais | <i>borderline</i> |
| \leq 20 milhões/ml | \geq 25% PR | < 14% normais | <i>borderline</i> |
| > 20 milhões/ml | < 25% PR | \geq 14% normais | <i>borderline</i> |
| > 20 milhões/ml | < 25% PR | < 14% normais | <i>borderline</i> |
| \geq 20 milhões/ml | \geq 25% PR | \geq 14% normais | normal |
| > 20 milhões/ml | \geq 25% PR | < 14% normais | <i>borderline</i> |

- Qualidade espermática anormal: Quanto à qualidade espermática anormal, as amostras de sêmen foram classificadas em anormal leve, moderada e severa (Quadro 2).

QUADRO 2

CLASSIFICAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN, CONSIDERANDO SÊMEN ANORMAL

| Concentração | Motilidade | Morfologia | Qualidade sêmen |
|----------------|---------------------|--------------|-----------------|
| < 5 milhões/ml | ≥ 5 % prog. rápidos | ≥ 4% normais | moderado |
| < 5 milhões/ml | < 5% prog. rápidos | < 4% normais | severa |
| < 5 milhões/ml | < 5% prog. rápidos | ≥ 4% normais | moderado |
| < 5 milhões/ml | ≥ 5% prog. rápidos | < 4% normais | moderado |
| ≥ 5 milhões/ml | < 5% prog. rápidos | ≥ 4% normais | moderado |
| ≥ 5 milhões/ml | < 5% prog. rápidos | < 4% normais | moderado |
| ≥ 5 milhões/ml | ≥ 5 % prog. rápidos | ≥ 4% normais | leve |
| ≥ 5 milhões/ml | ≥ 5 % prog. rápidos | < 4% normais | moderado |

- Óvulo maduro: gameta feminino, apto a fertilizar, que se encontra na metáfase II da meiose, recuperado e classificado pós-punção folicular, expresso em número absoluto.

3.6.2. Variável dependente

- Taxa de fertilização: Relação entre o número de oócitos fertilizados e o número de oócitos submetidos ao processo de fertilização *in vitro*, através da técnica de FIV convencional ou ICSI, expressa em porcentagem.

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 Reprodução Humana da Clínica Saint-Antoine em Bois Guillaume (França), após o período necessário para o processo de liquidação. Após avaliação espermática as amostras foram classificadas quanto à concentração espermática (milhões/ml); porcentagem de espermatozoides móveis (progressivos rápidos, desordenados, circulares e imóveis), porcentagem de espermatozoides vivos e porcentagem de espermatozoides normais e anormais.

Os óvulos foram coletados após indução da ovulação, através de punção por via transvaginal sob visão ecográfica. A punção do líquido folicular foi realizada com o auxílio de uma agulha adaptada ao guia da sonda ecográfica vaginal. Após a punção folicular, os óvulos foram classificados em maduros ou imaturos, respectivamente, segundo a presença ou não de corpúsculo polar (VEECK, 1990) e, quando considerados aptos a fecundar, foram submetidos ao processo de fertilização *in vitro*.

3.8. *Processamento das amostras*

Para a análise da motilidade do espermatozoide, uma gota foi depositada entre lâmina e lamínula e observada sob microscópio equipado de sistema óptico de contraste de fase, com platina aquecida, mantendo o material à

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 ou ausência de células redondas e aglutinação espermática.

A concentração de espermatozóides foi determinada após a diluição de uma gota de sêmen em 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 câmara de contagem (câmara de Thomas). Após alguns 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 e motilidade dos espermatozóides, sem necessidade de imobilizar as células espermáticas.

Para avaliação da vitalidade utilizou-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 a cabeça ovalada com contornos regulares, com o acrossoma recobrando mais de um terço da superfície da cabeça. Foram analisadas 200 células e classificadas segundo os critérios de normalidade de DAVID *et al.*, (1975).

Todas as amostras de sêmen foram avaliadas previamente ao dia da fertilização *in vitro*. Aquelas que apresentavam concentração espermática superior a 5×10^6 por mililitro de sêmen foram submetidas ao processo de capacitação espermática e posteriormente avaliadas quanto à concentração espermática, utilizando-se a técnica de Percoll.

Para a capacitação do sêmen a ser inseminado, no dia da FIV, realizou-se uma técnica de migração descendente utilizando-se duas camadas (45% e 90%) de um gradiente de densidade descontínua (PureSperm, Nidacon Laboratories, Goteborg, Sweden). O gradiente descontínuo de Percoll, utilizado anteriormente ao dia da FIV, foi proibido para utilização clínica em janeiro de 1997.

Quando a concentração dos espermatozoides foi inferior a 5×10^6 por mililitro de sêmen, uma fração do ejaculado foi separada e submetida à centrifugação e lavagem durante 10 minutos (2400rpm/min), utilizando-se o meio de cultura B1 (Laboratório CCD, França). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e uma gota do *culot* foi depositada no PVP (Polyvinylpyrrolidone, Cat. ref: 5288, Sigma), previamente à injeção intracitoplasmática.

3.8.1. *Descrição das técnicas*

—● **Técnica de Percoll:** solução de Percoll puro (*Amersham Pharmacia Biotech* AB ref: 17-0891-02) foi adicionada a meio de cultura (*Minimum essential medium Eagle* – Sigma Chemical Co) na proporção de 9:1 para se obter uma solução isotônica chamada de solução-mãe. Foram obtidas soluções decrescentes de Percoll diluindo-se a solução-mãe em meio de cultura (B1 Laboratório CCD). Na avaliação espermática, pré FIV, um gradiente descontínuo de Percoll foi preparado em um tubo estéril de poliestireno, colocando-se cuidadosamente no fundo do tubo a concentração de 90% e, posteriormente, a concentração de 45%, em partes iguais de 1ml. Em seguida uma amostra de 1ml de sêmen foi depositada sobre o gradiente e centrifugada durante 15 minutos, a 2000rpm. Depois de retiradas as concentrações de 90% e 45%, o *culot* foi lavado duas vezes com 5ml de meio de cultura B1 (10 minutos a 2400rpm). Posteriormente o sobrenadante foi desprezado, acrescentando-se ao *culot* 1ml de meio de cultura para posterior análise da concentração espermática.

- **Técnica de Puresperm para capacitação espermática no dia da FIV convencional:** O PureSperm consiste em uma solução salina isotônica contendo partículas silico-coloidais, recobertas de silane

(composto hidrogenado de silício) e não é tóxica. Em fertilização assistida é utilizada para preparação de gradientes de centrifugação de concentrações diferentes, por exemplo, 45% e 90%, após diluição apropriada com meio de lavagem de esperma, com o intuito de separação e purificação de espermatozóides, previamente à inseminação do oócito no processo de fertilização *in vitro* (Figura 2).

Preparo do Gradiente de centrifugação

- Solução- mãe: PureSperm (27ml) + meio de cultura (3ml BM1)

- PureSperm 90%: Solução-mãe (10ml)

- PureSperm 45%: Solução-mãe a 90% (10ml) + meio de cultura (10ml BM1)

- Gradiente de centrifugação:
 - 1ml de solução-mãe a 90%
 - 1ml de solução a 45%

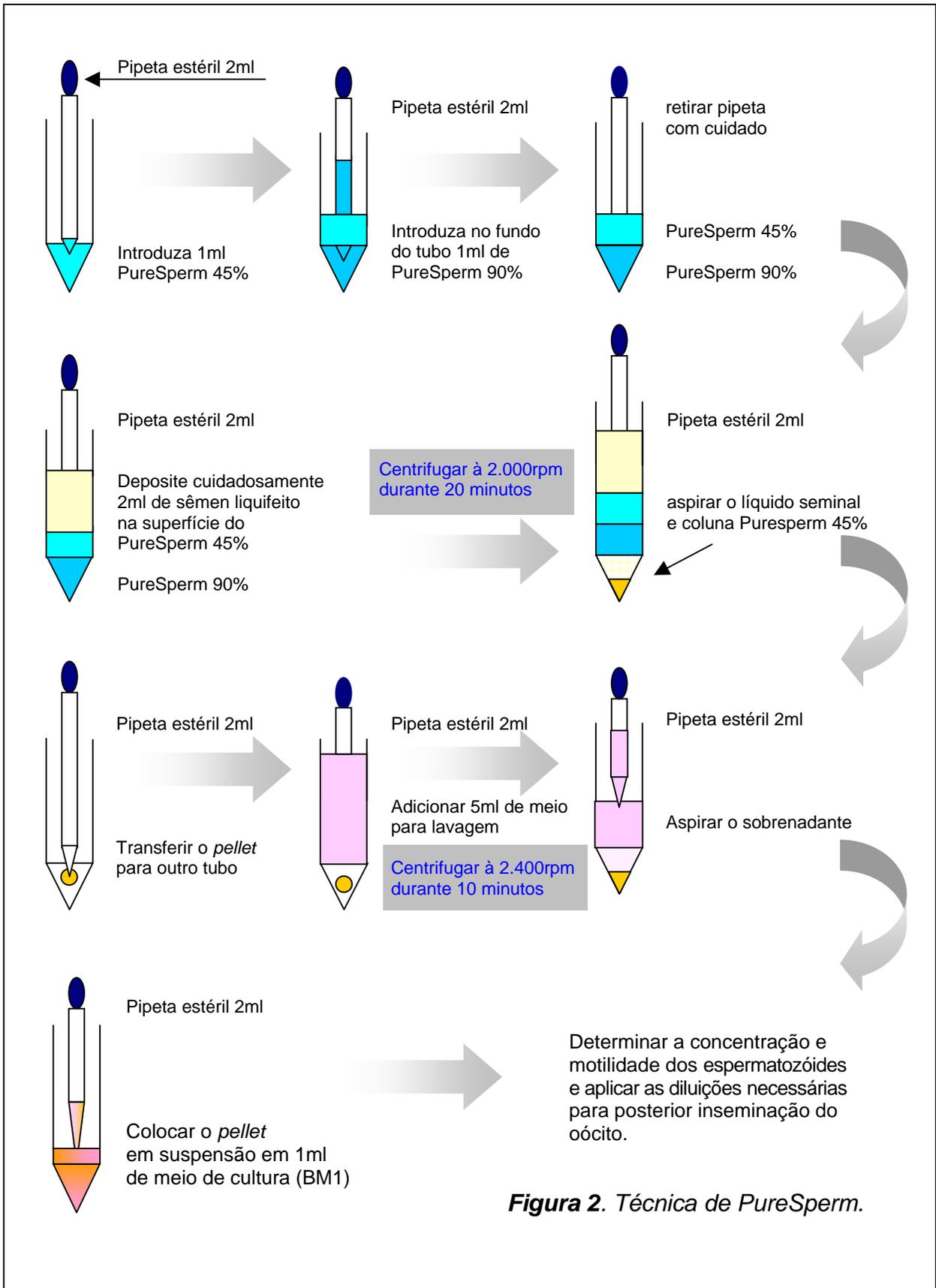


Figura 2. Técnica de PureSperm.

—● **Técnica de FIV convencional:** após a punção folicular e classificação dos óvulos, cada oócito maduro foi incubado em 0,9ml de meio de cultura (BM1, Laboratoires Ellios Bio Tek, Paris, França). O 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).

- **Técnica de ICSI:** Após a punção folicular, as células do *cumulus oophorus* e *corona radiata* foram removidas com o auxílio de uma solução de hialuronidase (Type VI S, Sigma Chemical Company, ref: H3631), seguida de denudação mecânica utilizando-se uma pipeta com diâmetro aproximado de 150µm (VAN DE VELDE et al., 1998). Posteriormente, os oócitos foram lavados várias vezes em meio de cultura (BM1, Laboratoires Ellios Bio Tek, Paris, França) e após serem avaliados em um microscópio invertido, foram incubados em 0,9ml de meio de cultura (BM1, Laboratoires Ellios Bio Tek, Paris, França) até o momento da injeção. A técnica de ICSI foi realizada utilizando-se um sistema hidráulico, controlado por *joysticks* manipuladores

(Narishige), montado em microscópio invertido (Olympus). Minutos antes da injeção, 1µl de sêmen, previamente, tratado foi pipetado em 5µl de solução de PVP (Polyvinylpyrrolidone, Cat. ref: 5288, Sigma). A injeção foi realizada em microgotas de 15µl de meio (1 x Medium 199 (modified) *with Earle's salts and 20mM hepes buffer* – ICN Biomedical, Inc.), utilizando-se micropipetas de injeção e contenção (Humagen). As microgotas foram recobertas com óleo mineral (Sigma cat. nº M-8410). Somente oócitos maduros (metáfase II da meiose) e espermatozóides móveis foram utilizados para injeção. O espermatozóide foi imobilizado após leve toque na cauda com o auxílio da pipeta injetora e introduzido (primeiramente a cabeça) no citoplasma do oócito, previamente posicionado, mantendo-se o corpúsculo polar às 6 ou 12 horas para evitar a passagem da micropipeta injetora através da região citoplasmática que pudesse conter o material cromossômico. Oócitos e embriões foram cultivados em gotas de 50µl e 20µl, respectivamente, sob uma camada fina de óleo mineral (Sigma cat. nº M-8410). Os oócitos injetados foram incubados em estufa com atmosfera de CO₂ a 5% (*Forma Scientific, USA*) e avaliados 16 a 20 horas após a injeção, para determinar a presença do pronúcleo masculino e o número de corpúsculos polares.

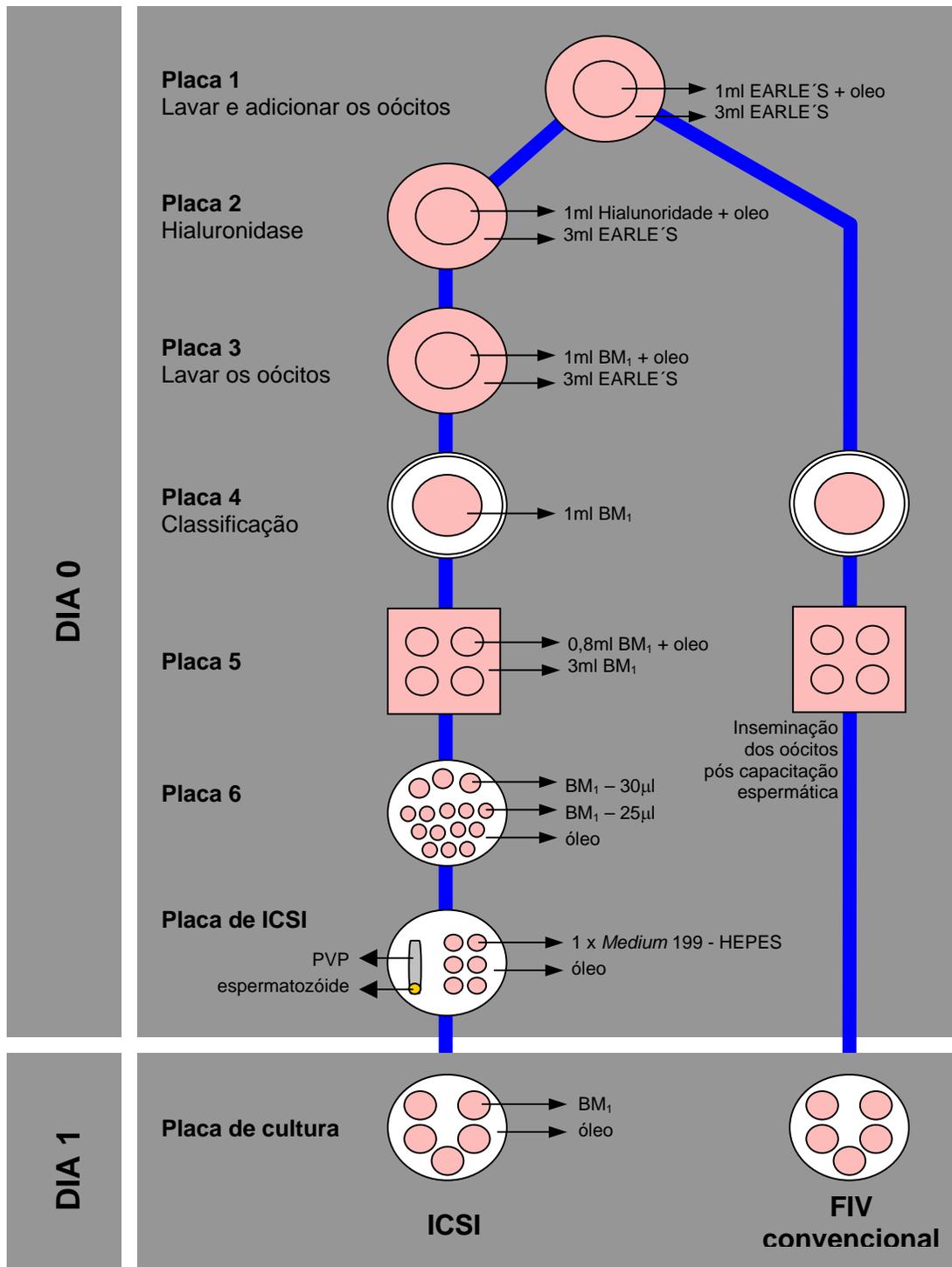
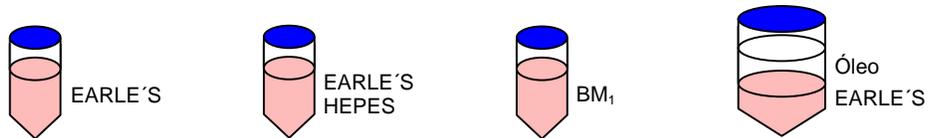


Figura 3. Técnica de FIVconvencional e ICSI.

3.9. *Processamento dos dados*

Após a coleta das amostras, os dados obtidos foram registrados em ficha própria, utilizada de rotina, na Clínica Saint Antoine, para análise e registro dos dados (Anexos 2, 3 e 4). O Anexo 1 corresponde à Carta de Autorização para utilização dos dados da Clínica.

3.10. *Análise dos dados*

A análise dos dados utilizou um modelo específico de regressão logística, onde a variável resposta (dependente) indica o número de sucessos em um número variante de tentativas. No presente estudo, o número de tentativas refere-se ao número de oócitos submetidos ao processo de fertilização *in vitro* e o número de sucessos indica o número de oócitos fertilizados. A razão entre estes sucessos e tentativas corresponde, assim, à taxa de fertilização (COX e SNELL, 1989). Neste modelo de regressão logística, a significância de cada variável independente em prever a taxa de fertilização é medida por um teste qui-quadrado de Wald e, quando adequado, a grandeza do efeito de cada variável é medida por um usual *odds ratio* ou como risco relativo (RR). O uso de modelos com múltiplas variáveis independentes permite o ajuste do efeito de uma variável pelas demais. Foi utilizada a técnica de seleção de variáveis *stepwise* para assegurar o resultado obtido no modelo de regressão logística múltipla.

De forma usual, adotou-se neste estudo um nível de significância de 5%.

A distribuição do número de óvulos inseminados ou injetados e do número de óvulos fertilizados foi comparada entre as mulheres submetidas às técnicas de FIV convencional e ICSI através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes (HOLLANDER e WOLFE, 1999).

Neste estudo, para cada variável analisada, foram calculadas estatísticas descritivas: o valor médio e o desvio padrão.

3.11. Aspectos éticos

O presente estudo foi realizado a partir de amostras de gametas analisadas de rotina no Laboratório de Reprodução Humana da Clínica Saint Antoine em Bois Guillaume (França), 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 III (2000).

4. Resultados

Foram analisados 4.016 procedimentos de fertilização *in vitro*, sendo 1.832 pela técnica de FIV convencional e 2.184 pela técnica de ICSI. A idade média no grupo total de mulheres e homens foi, respectivamente, $31 \pm 3,5$ anos e $34 \pm 5,2$ anos.

A Tabela 1 mostra o número de procedimentos de ICSI e FIV convencional segundo a faixa etária e sua taxa de fertilização. A maior concentração de procedimentos ocorreu na faixa etária de 30 a 34 anos e houve maior número de procedimentos de ICSI, entretanto, não houve diferença significativa na taxa de fertilização, para FIV convencional e ICSI, nas diferentes faixas etárias ($p = 0,054$).

TABELA 1
TAXA DE FERTILIZAÇÃO PARA TÉCNICAS DE FIV CONVENCIONAL
E ICSI, SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA DAS MULHERES

| Faixa etária | Técnica | n | Taxa fertilização (Média) | Desvio padrão |
|--------------|---------|-----|------------------------------|---------------|
| 20-24 | FIV | 35 | 0,85 | 0,14 |
| | ICSI | 116 | 0,77 | 0,19 |
| 25-29 | FIV | 503 | 0,82 | 0,18 |
| | ICSI | 714 | 0,73 | 0,19 |
| 30-34 | FIV | 886 | 0,83 | 0,19 |
| | ICSI | 940 | 0,74 | 0,20 |
| 35-38 | FIV | 369 | 0,82 | 0,21 |
| | ICSI | 379 | 0,72 | 0,22 |

Teste qui-quadrado de Wald (ajustado pela técnica), $p=0,054$

Em relação à taxa de fertilização e ao número de procedimentos de FIV convencional e ICSI segundo o ano de realização, pode-se observar que houve diferença significativa na taxa de fertilização, segundo cada procedimento e o ano de realização, quando consideramos os anos de 1998, 1999, 2000 e 2002 (p valor $<0,01$). Em 1.798 procedimentos de FIV convencional houve uma taxa de fertilização média de $0,83 \pm 0,2$ (média \pm DP) enquanto que este valor para os casos de ICSI foi de $0,74 \pm 0,2$ (média \pm DP) (Tabela 2).

TABELA 2

**TAXA DE FERTILIZAÇÃO PARA TÉCNICAS DE FIV CONVENCIONAL
E ICSI, ANUALMENTE, NO PERÍODO DE 1998 A 2002**

| Faixa etária | Técnica | n | Taxa fertilização (Média) | Desvio padrão |
|--------------|---------|-----|------------------------------|---------------|
| 1998 | FIV | 359 | 0,82 | 0,19 |
| | ICSI | 368 | 0,80 | 0,19 |
| 1999 | FIV | 385 | 0,79 | 0,22 |
| | ICSI | 361 | 0,70 | 0,20 |
| 2000 | FIV | 382 | 0,84 | 0,18 |
| | ICSI | 465 | 0,71 | 0,20 |
| 2001 | FIV | 338 | 0,85 | 0,18 |
| | ICSI | 481 | 0,75 | 0,20 |
| 2002 | FIV | 334 | 0,85 | 0,17 |
| | ICSI | 480 | 0,73 | 0,19 |

Ano 1998 vs 2002: Teste qui-quadrado de Wald (ajustado pela técnica), $p < 0,01$

Ano 1999 vs 2002: Teste qui-quadrado de Wald (ajustado pela técnica), $p < 0,01$

Ano 2000 vs 2002: Teste qui-quadrado de Wald (ajustado pela técnica), $p < 0,01$

Ano 2001 vs 2002: Teste qui-quadrado de Wald (ajustado pela técnica), $p < 0,10$

A distribuição do número de óvulos inseminados ou injetados e do número de óvulos fertilizados foi comparada, entre as mulheres submetidas às técnicas de FIV e ICSI, através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes e esta diferença foi significativa (Tabela 3 e 4).

TABELA 3

**NÚMERO MÉDIO DE ÓVULOS INSEMINADOS OU INJETADOS NA
REALIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE FIV CONVENCIONAL E ICSI**

| Técnica | n | Óvulos (Média) | Percentil (25%) | Percentil (75%) | Mínimo | Máximo |
|---------|------|-------------------|--------------------|--------------------|--------|--------|
| FIV | 1798 | 10 | 6 | 14 | 1 | 40 |
| ICSI | 2155 | 10 | 7 | 14 | 1 | 41 |

Teste de Mann-Whitney para amostras independentes, $p = 0,01$

TABELA 4**ANÁLISE DESCRITIVA DO NÚMERO MÉDIO DE ÓVULOS FERTILIZADOS
APÓS REALIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE FIV CONVENCIONAL E ICSI**

| Técnica | n | Óvulos Fert. (Média) | Percentil (25%) | Percentil (75%) | Mínimo | Máximo |
|---------|------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------|--------|
| FIV | 1798 | 8 | 5 | 12 | 1 | 36 |
| ICSI | 2155 | 7 | 5 | 11 | 1 | 30 |

Teste de Mann-Whitney para amostras independentes, $p=0,01$

No total de amostras analisadas, a concentração de espermatozóides apresentou uma média de $35,1 \times 10^6 \pm 38,9$ por mililitro (média \pm DP), um percentual médio de espermatozóides progressivos rápidos de $21,1 \pm 12,8$ (média \pm DP) e um percentual médio de espermatozóides normais de $37,1 \pm 20,8$ (média \pm DP).

Quanto à morfologia espermática foram observadas 3.406 amostras de sêmen, utilizadas na realização das técnicas de FIV convencional e ICSI, sendo que 580 tinham menos de 14% de formas normais e 2.826 apresentavam valor igual ou superior a 14%. O valor médio da taxa de fertilização para cada grupo foi, respectivamente, $0,75 \pm 0,2$ e $0,80 \pm 0,2$ (média \pm DP) e esta diferença não foi significativa. Entretanto, houve apenas 43 procedimentos de FIV convencional quando a porcentagem de espermatozóides normais foi inferior a 14% (Tabela 5).

TABELA 5

TAXA DE FERTILIZAÇÃO PARA TÉCNICAS DE FIV CONVENCIONAL E ICSI, COM BASE NA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

| Morfologia normal | Técnica | n | Média | Desvio padrão | Mínimo | Máximo |
|-------------------|---------|------|-------|---------------|--------|--------|
| <14% | FIV | 43 | 0,82 | 0,20 | 0,00 | 1,00 |
| | ICSI | 537 | 0,74 | 0,19 | 0,19 | 1,00 |
| ≥ 14% | FIV | 1585 | 0,84 | 0,16 | 0,00 | 1,00 |
| | ICSI | 1241 | 0,74 | 0,19 | 0,00 | 1,00 |

Teste qui-quadrado de Wald (ajustado pela técnica), $p=0,71$

Quanto à concentração espermática, os valores médios das taxas de fertilização para cada grupo estudado foram: $0,75 \pm 0,2$; $0,80 \pm 0,2$ e $0,82 \pm 0,2$ (média \pm DP) sem diferenças significativas (Tabela 6).

TABELA 6

TAXA DE FERTILIZAÇÃO PARA TÉCNICAS DE FIV CONVENCIONAL E ICSI, COM BASE NA CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA (MILHÕES/ML)

| Concent. | Técnica | n | Taxa fertilização (Média) | Desvio padrão | Mínimo | Máximo |
|----------|---------|------|---------------------------|---------------|--------|--------|
| <10 | FIV | 184 | 0,79 | 0,20 | 0,00 | 1,00 |
| | ICSI | 1074 | 0,74 | 0,19 | 0,00 | 1,00 |
| 10 a 20 | FIV | 210 | 0,83 | 0,15 | 0,35 | 1,00 |
| | ICSI | 196 | 0,76 | 0,19 | 0,18 | 1,00 |
| ≥20 | FIV | 1234 | 0,85 | 0,16 | 0,14 | 1,00 |
| | ICSI | 411 | 0,73 | 0,19 | 0,14 | 1,00 |

Teste qui-quadrado de Wald (ajustado pela técnica), $p=0,19$

Quanto à porcentagem de espermatozóides progressivos rápidos, observaram-se 1.744 amostras de sêmen com motilidade inferior a 25% e 1.308 amostras com motilidade superior ou igual a 25%. A taxa de fertilização para as técnicas de FIV convencional e ICSI, com base na porcentagem de espermatozóides progressivos rápidos não apresentou diferença significativa (Tabela 7).

TABELA 7

TAXA DE FERTILIZAÇÃO PARA TÉCNICAS DE FIV E ICSI, COM BASE NA PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES PROGRESSIVOS RÁPIDOS

| Progressivos rápidos (%) | Técnica | Taxa fertilização (Média) | Desvio padrão | Mínimo | Máximo |
|---------------------------------|----------------|----------------------------------|----------------------|---------------|---------------|
| <25 | FIV | 0,83 | 0,17 | 0,00 | 1,00 |
| | ICSI | 0,74 | 0,19 | 0,10 | 1,00 |
| ≥ 25 | FIV | 0,85 | 0,16 | 0,00 | 1,00 |
| | ICSI | 0,71 | 0,20 | 0,00 | 1,00 |

Teste qui-quadrado de Wald (ajustado pela técnica), $p=0,41$

Avaliaram-se 311 amostras de sêmen anormais, 2.145 no limite de normalidade (*borderline*) e 799 normais, utilizando-se a classificação da qualidade do sêmen (Quadro 1). A média da taxa de fertilização para cada um dos grupos descritos foi, respectivamente, $0,77 \pm 0,2$; $0,77 \pm 0,2$ e $0,80 \pm 0,2$ (média \pm DP),

sem diferença significativa entre os grupos quando comparadas as duas técnicas (Tabela 8).

TABELA 8
TAXA DE FERTILIZAÇÃO PARA TÉCNICAS DE FIV CONVENCIONAL
E ICSI, COM BASE NA QUALIDADE DO SÊMEN

| Técnica | Qualidade sêmen | n | Média | Desvio padrão | Mínimo | Máximo |
|----------------|------------------------|----------|--------------|----------------------|---------------|---------------|
| FIV | anormal | 79 | 0,80 | 0,19 | 0,00 | 1,00 |
| | <i>borderline</i> | 848 | 0,82 | 0,19 | 0,00 | 1,00 |
| | normal | 603 | 0,83 | 0,18 | 0,00 | 1,00 |
| ICSI | anormal | 224 | 0,75 | 0,20 | 0,00 | 1,00 |
| | <i>borderline</i> | 1297 | 0,74 | 0,19 | 0,00 | 1,00 |
| | normal | 196 | 0,71 | 0,20 | 0,00 | 1,00 |

Teste qui-quadrado de Wald (ajustado pela técnica), $p=0,16$

Posteriormente, quando se considerou a população de homens com sêmen anormal, subdividida em três grupos: leve; moderado e severo (Quadro 2) observou-se que as amostras de sêmen com anormalidade severa não foram consideradas para este estudo, já que, com tal anormalidade espermiática, não estaria indicado realizar a técnica de FIV convencional.

Quando foi considerada a taxa de fertilização, segundo a qualidade do sêmen anormal (leve e moderada), observou-se que esta foi superior, quando a anormalidade espermiática era leve. Esta diferença foi significativa em ambas as

técnicas utilizadas, havendo maior taxa de fertilização nos casais submetidos à técnica de FIV convencional quando comparados a ICSI (Tabela 9).

TABELA 9
TAXA DE FERTILIZAÇÃO PARA TÉCNICAS DE FIV CONVENCIONAL
E ICSI, COM BASE NA QUALIDADE DO SÊMEN (ANORMAIS)

| Técnica | Sêmen anormal | n | Taxa fert. (média) | Desvio padrão | Mínimo | Máximo |
|---------|---------------|------|--------------------|---------------|--------|--------|
| FIV | moderado | 147 | 0,81 | 0,20 | 0,00 | 1,00 |
| | leve | 1383 | 0,83 | 0,19 | 0,00 | 1,00 |
| ICSI | moderado | 410 | 0,73 | 0,21 | 0,00 | 1,00 |
| | leve | 1307 | 0,74 | 0,19 | 0,00 | 1,00 |

Teste qui-quadrado de Wald (ajustado pela técnica e faixas etárias), $p = 0,02$

Para a análise de regressão logística múltipla foi utilizada, como variável dependente, a taxa de fertilização, com o intuito de avaliar a influência das variáveis, previamente estudadas, sobre a FIV, baseando-se na técnica utilizada (FIV convencional e ICSI), na faixa etária das mulheres tratadas, na concentração espermática, na motilidade progressiva rápida e na porcentagem de espermatozoides normais. Esta análise mostrou que a única variável com influência na taxa de fertilização *in vitro* foi a técnica utilizada, sendo superior na FIV convencional (Tabela 10). Um modelo estatístico utilizando a técnica de seleção de variáveis *stepwise*, confirmou este resultado.

TABELA 10

ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA MÚLTIPLA AVALIANDO-SE A INFLUÊNCIA DE DETERMINADAS VARIÁVEIS SOBRE A TAXA DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

| Efeito | GL | Qui-quadrado de Wald | <i>p</i> |
|----------------------|----|----------------------|----------|
| Técnica | 1 | 327,51 | <0,0001 |
| Faixa etária | 3 | 4,4286 | 0,2188 |
| Progressivos rápidos | 1 | 1,8442 | 0,1745 |
| Concentração | 2 | 4,8916 | 0,0867 |
| Normais | 1 | 0,0009 | 0,9766 |

GL: Graus de liberdade

A análise de regressão logística múltipla mostrou, também, que o *odds ratio* da variável técnica em relação à taxa de fertilização foi de 1,9 ($p < 0,01$). Este *odds ratio* foi ajustado pela qualidade do sêmen e por faixa etária. O *odds ratio* para um sêmen com anormalidade espermática leve foi 1,1 ($p < 0,02$). Este *odds ratio* também foi ajustado pela técnica e por faixa etária (Tabela 11). Sendo o *odds ratio*, relativo à técnica, maior que o *odds ratio* relativo à qualidade do sêmen, os resultados sugerem que, perante a taxa de fertilização, a técnica teria uma importância maior que a qualidade do sêmen.

TABELA 11

RESULTADO DA REGRESSÃO LOGÍSTICA MÚLTIPLA*SEGUNDO TÉCNICA E QUALIDADE DE SÊMEN (ANORMAL) EM CASAS SUBMETIDOS A FIV CONVENCIONAL E ICSI

| Variável | Referência | <i>Odds ratio</i> (IC 95%) | valor de p^{**} |
|---------------|-----------------|----------------------------|-------------------|
| Técnica | FIV x ICSI | 1,91 (1,79-2,03) | < 0,01 |
| Sêmen anormal | Leve x Moderado | 1,11 (1,01-1,21) | 0,02 |

*Com ajuste por faixa etária

**Teste qui-quadrado de Wald

5. Discussão

Neste estudo, avaliou-se o desempenho das técnicas de FIV convencional e ICSI, baseando-se na qualidade do sêmen. Concluída a análise de regressão logística, constatamos que características espermáticas estudadas (concentração espermática; porcentagem de espermatozóides progressivos rápidos e porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais) não tiveram influência na taxa de fertilização, tanto na técnica de FIV convencional, quanto na ICSI. A única variável que mostrou influência significativa na taxa de fertilização foi a técnica utilizada durante o procedimento de fertilização assistida, com melhores taxas de fertilização para a técnica de FIV convencional. A análise de regressão logística mostrou, ainda, que o *odds ratio*, considerando-se a variável técnica utilizada em relação à probabilidade de fertilização foi de 1,9 ($p < 0,01$). Este OR foi ajustado pela qualidade do sêmen e por faixa etária. Quando consideramos a qualidade do sêmen anormal (leve) o OR foi 1,1 ($p < 0,02$). Este valor também foi ajustado pela técnica e por faixa etária, embora se considerando apenas mulheres com idade igual ou inferior a 38 anos. É bem conhecido que o aumento da idade está relacionado a uma diminuição nas chances de gravidez, seja através

da fertilização natural ou após fertilização assistida (SCOTT et al., 1995; DEVROEY et al., 1996; GRIMBIZIS et al., 1998). Com o avanço da idade as reservas ovarianas diminuem, levando a uma diminuição no número de oócitos obtidos (FADDY e GOSDEN, 1996), um aumento na incidência de aneuploidia em oócitos (MUNNÉ et al., 1995), e oócitos de má qualidade (NAVOT et al., 1991). A idade é, portanto, o mais importante fator limitante de sucesso em fertilização assistida para mulheres com idade superior a 37 anos. Sendo assim, neste estudo, optamos por avaliar, somente, os resultados obtidos de mulheres com idade igual ou inferior a 38 anos. Pudemos observar que, independente da técnica utilizada, não houve diminuição nas taxas de fertilização com o aumento da idade da mulher.

A FIV foi inicialmente desenvolvida para o tratamento das mulheres com obstrução tubária que não tinham possibilidades de engravidar por outros meios. Entretanto, logo se estendeu para diversas outras causas de infertilidade, assim como anovulação, infertilidade sem causa aparente, fator imunológico de infertilidade e falha no tratamento por outros métodos. Entretanto, vários estudos têm mostrado que está associada a baixas taxas de fertilização e gravidez, quando realizada no tratamento da infertilidade masculina severa (MAHADEVAN et al., 1983; ACOSTA et al., 1986; LANZENDORF et al., 1988).

Por outro lado, a ICSI (PALERMO et al., 1992) foi introduzida para o tratamento de casais com infertilidade masculina severa que não se beneficiavam com a FIV convencional devido à má qualidade espermática, já que nestes casos o tratamento do sêmen não permite uma recuperação suficiente (50.000

espermatozóides móveis por oócito), ou para casos de azoospermia obstrutiva e não obstrutiva (SCHOYSMAN e GERRIS, 1983; SCHOYSMAN *et al.*, 1993; TOURNAYE, *et al.*, 1994).

Atualmente, é consenso entre especialistas em reprodução assistida, que a ICSI está indicada quando o fator masculino de infertilidade está presente, evidenciado por uma análise espermática anormal severa. Portanto, decisões concernentes ao tratamento de escolha (FIV ou ICSI), são usualmente feitas após a avaliação do fator masculino (PLACHOT *et al.*, 2002). A alteração espermática se expressa clinicamente em graus variáveis de oligoastenoteratospermia, presença de anticorpo anti-espermatozóide, ou azoospermia (obstrutiva ou não obstrutiva), onde a ICSI é combinada com a punção de testículo ou epidídimo para a recuperação de espermatozóides (SCHOYSMAN *et al.*, 1993; TOURNAYE, *et al.*, 1994). A ICSI também é recomendada em casos onde houve falha de fertilização em um ciclo de FIV (KASTROP *et al.*, 1999; FISHEL *et al.*, 2000). Nestes casos de falha prévia na fertilização, que ocorre em 10% a 20% dos ciclos, a indicação da técnica de ICSI evitaria que um possível defeito no gameta masculino ou feminino impedisse a fertilização (FISHEL *et al.*, 2000).

Não se observou, no presente estudo, diferenças nas taxas de fertilização utilizando-se as técnicas de FIV convencional e ICSI quando se considerou a concentração, motilidade progressiva rápida ou morfologia espermática. Publicações recentes têm feito comparações entre FIV e ICSI e exibido discrepantes resultados. Estudos prospectivos compararam a eficácia de ICSI e FIV convencional em óvulos de uma mesma paciente, para diferentes indicações masculinas.

Alguns deles (ABOULGHAR et al, 1996a; CALDERON et al. 1995), mostraram resultados fortemente satisfatórios para a técnica de ICSI. Outros compararam FIV e ICSI em casos de teratospermia severa. De acordo com alguns autores, uma alta proporção de formas anormais pode ser superada, na FIV convencional, por uma maior concentração de espermatozóides, na inseminação do oócito (HALL et al, 1995; OEHNINGER et al., 1996). Devido ao uso de diferentes concentrações na inseminação do oócito, divergentes taxas de fertilização têm sido demonstradas. Devemos assumir que a diferença na eficiência entre FIV convencional e ICSI, por questões espermáticas, depende: de critérios de inclusão para FIV convencional, experiência do serviço estudado e concentração e qualidade dos espermatozóides inseminados.

Neste estudo, quando consideramos a qualidade do sêmen (normal, *borderline* e anormal), não observamos diferença significativa na taxa de fertilização. Porém, quando avaliamos a taxa de fertilização, segundo a qualidade de sêmen anormal leve e moderada, constatamos que esta foi superior quando a anormalidade era leve, em ambas as técnicas utilizadas, e esta diferença foi significativa, havendo maior taxa de fertilização nos casos de FIV convencional.

STAESSEN et al. (1999) publicaram que casais com infertilidade tubária e normozoospermia não apresentaram diferenças na taxa de fertilização, quando comparados os resultados de FIV convencional e ICSI. Também FISHEL et al. (2000) concluíram que a ICSI resultou em uma taxa superior de fertilização, quando comparada a FIV convencional ou FIV com alta concentração de espermatozóides inseminados, devendo ser utilizada em todos os casos com

falha prévia da fertilização de origem idiopática, e em casos com inadequada qualidade espermática. Estes autores sugeriram que a ICSI oferece a vantagem de ultrapassar as barreiras da fertilização, que podem ser de origem espermática ou estar ligada ao óvulo, oferecendo um melhor resultado nos distúrbios de origem espermática. Todavia, estes estudos não concluíram que a ICSI é a resposta para todos os casos de infertilidade que necessitem fertilização *in vitro*.

Embora alguns estudos tenham mostrado um desenvolvimento embrionário de baixa qualidade em ICSI quando comparada a FIV (ou devido ao uso de qualidade espermática deficiente ou devido à técnica propriamente dita) (OLA et al., 2001), outros relataram taxas de implantação semelhantes em estudos randomizados, em casos de fator masculino normal (ABOULGHAR et al., 1996a;b). HSU et al. (1999) observaram qualidade embrionária e taxas de gravidez semelhantes em ICSI e FIV, e nenhum impacto da oligoastenoteratospermia severa sobre os resultados da implantação, quando comparadas ICSI e FIV convencional em ciclos com óvulos doados (modelo favorável para controle de qualidade do oócito) (OEHNINGER et al., 1998).

BARRAT et al. (1995) apresentaram uma análise da literatura referente à técnica de ICSI com ênfase na fertilização (sucesso e fracasso), desenvolvimento do embrião, efetividade de custo e segurança (OLA et al., 2001). As conclusões principais foram: (1) mais estudos serão necessários para identificar, prospectivamente, quais casos com sêmen aparentemente normal apresentarão baixa taxa de fertilização em FIV; (2) considerando-se os dados científicos disponíveis, efetividade de custo e considerações de segurança, os autores não

sustentaram o uso de rotina da ICSI em todos tratamentos de FIV. Assim sendo, a ICSI somente deveria ser considerada em casos onde o sucesso com a técnica de FIV convencional fosse considerado improvável.

Desde a introdução da ICSI, a maior preocupação tem sido a segurança na utilização desta técnica (CUMMINS e JEQUIER, 1994), considerando que ela permite a seleção arbitrária e injeção de um único espermatozóide para o interior do citoplasma do óvulo, ultrapassando vários passos anatômicos e fisiológicos no processo de fertilização. A preocupação ficou mais evidente quando se realizou a técnica de ICSI com espermatozoides imaturos, pois foi assumido um risco devido à alta incidência de aberrações cromossômicas na população masculina com azoospermia obstrutiva ou não obstrutiva. Em razão disto, vários estudos de crianças nascidas após ICSI têm sido realizados, revelando não haver diferença quando se consideraram as malformações congênitas, porém, parece haver um aumento no risco de transmissão de aberrações cromossômicas, principalmente anomalias cromossômicas sexuais (PALERMO et al., 1996; BONDUELLE et al., 1998; TARLATZIS e BILI, 1998; BONDUELLE et al., 1999).

É fato bem estabelecido que alguns casos de infertilidade severa estão associados a aberrações e/ou anomalias cromossômicas, como microdeleções do cromossomo Y, mutações associadas à ausência congênita dos ductos deferentes e outros (KENT-FIRST et al., 1996; MARTIN et al., 1998; ST JOHN, 1999; ROVIO et al., 2001). Além de aneuploidia e microdeleções, espermatozoides de homens inférteis podem conter outras alterações nucleares, como distúrbios na estrutura do DNA. Defeitos no DNA podem ocorrer como resultado de anomalias

durante a espermatogênese ou após, como consequência de um stress oxidativo (AITKEN et al., 1989; 1998; BARROSO et al., 2000).

Devido ao fato da técnica de ICSI ser utilizada na ausência de um diagnóstico etiológico ou fisiopatológico, existe uma preocupação com o risco de transmissão de doença cromossômica ou genética (CUMMINS e JEQUIER, 1994; 1995). Existem ainda evidências que a falha reprodutiva possa se originar de uma teratogenicidade mediada pelo fator masculino (BRINKWORTH, 2000) e, incertezas sobre as consequências do DNA danificado no espermatozóide e prováveis contribuições potencialmente negativas durante a embriogênese (SAKKAS et al., 1998).

Teoricamente, o procedimento de injeção intracitoplasmática poderia danificar estruturas citoplasmáticas presentes no oócito resultando em agressão celular e anomalias cromossômicas numéricas que prejudicariam o desenvolvimento embrionário. Um estudo realizado por DUMOULIN et al. (2001), revelou que certos aspectos técnicos no procedimento de injeção podem afetar o desenvolvimento embrionário, mas não parece influenciar a taxa de anomalias cromossômicas.

Apesar das preocupações, a saúde das crianças concebidas através da técnica de ICSI vem sendo globalmente assegurada (BONDUELLE et al., 1999). A incidência de malformações maiores é, aproximadamente, 3% a 4%, que é semelhante à população em geral (VAN STEIRTEGHEM et al., 1998; PALERMO et al., 2000). Outro estudo de BONDUELLE et al. (2002) comparou dados neonatais de 2.889 bebês nascidos após ICSI e 2.995 bebês nascidos

após FIV, e não observou aumento no risco de malformações e/ou complicações neonatais no grupo de ICSI. Adicionalmente, estudos neurológicos caso-controle bem definidos do desenvolvimento destas crianças, não revelaram nenhuma diferença (SUTCLIFFE et al., 2001; BONDUELLE et al, 2003).

LOFT et al. (1999) avaliaram 665 crianças nascidas através da ICSI, na Dinamarca, e não observaram problemas em relação a malformações, e os resultados pré-natais foram similares a de outros tipos de nascimentos. É importante destacar a possibilidade de viés, por não se haver comparado os resultados com outras crianças da população geral.

Apesar dos relatos disponíveis não comprovarem aumento das malformações, a taxa de hipospadias tem sido relatada maior que a esperada para a população geral (SUTCLIFFE et al., 1998; WENNERHOLM et al., 2000; ERICSON e KALLEN, 2001), especialmente nas gravidezes obtidas de homens oligospermicos. Uma das possíveis explicações para este tipo de malformação, quando se realiza ICSI, é que como estas gravidezes são obtidas, em geral, de homens com defeitos na espermatogênese e anomalias testiculares, provavelmente carreguem algum defeito genético que condicione a transmissão deste tipo de problema. Especula-se que o mesmo defeito genético pudesse ser o fator que tenha provocado o distúrbio na fertilidade.

Foram avaliadas as anormalidades cromossômicas entre 447 casais participantes de um ciclo de FIV. O número de aberrações encontradas foi superior ao esperado para a população geral, e apesar das aberrações cromossômicas

encontradas terem um risco menor de transmissão aos recém nascidos, o que surpreendeu foi o alto número de aberrações encontradas entre as mulheres. Os autores dessas observações sugeriram que não só os homens, mas também suas parceiras, deverão ser avaliadas do ponto de vista genético, antes de submeter-se a um procedimento de ICSI (MESCHEDE et al., 1998).

Publicações recentes mostraram que aneuploidia no cromossoma sexual e anomalias autossômicas estruturais estão significativamente aumentadas em crianças nascidas pós ICSI (VAN DE VELDE et al., 1998; VAN STEIRTEGHEM et al., 2002). Outro estudo atual, realizado na Austrália, mostrou que 8,6% e 9% das crianças nascidas por ICSI e FIV, respectivamente, apresentaram malformações no primeiro ano de vida significativamente maior que os 4,2% observados em crianças concebidas naturalmente, concluindo que crianças nascidas pós ICSI tinham risco de malformações duas vezes maior que aquelas concebidas naturalmente. Estas constatações são um alerta para avaliações futuras em outros países (HANSEN et al., 2002)

Certamente mais estudos serão necessários, particularmente controlando a idade materna. A vigilância é exigida para monitorar a técnica e identificar qualquer impacto negativo, em longo prazo, na saúde destas crianças (FADDY et al., 2001; OEHNINGER, 2001). Hoje destacamos a importância de concentrar esforços direcionados à identificação da etiologia e fisiopatologia de lesões e/ou disfunções no espermatozóide ou oócito, responsáveis pela deterioração no processo de fertilização, e ainda contribuições potenciais para uma embriogênese defeituosa.

Embora milhares de bebês tenham nascido através da técnica de ICSI (BONDUELLE et al., 1992; PALERMO et al., 1992; VAN STEIRTEGHEM et al., 1993; OEHNINGER et al., 1995; PALERMO et al., 1999; BONDUELLE et al., 2002) existem relatos sobre o potencial de anomalias durante a fertilização e também no bebê, como resultado desta técnica, (KENT-FIRST et al., 1996; HEWITSON et al., 2000; TERADA et al., 2000) indicando a necessidade de mais testes de ICSI em animais, em busca de um maior entendimento das conseqüências desta técnica a longo termo (YANAGIMACHI, 1995). Embora um vasto estudo não tenha evidenciado diferenças em defeitos no nascimento (BONDUELLE, et al., 2002), é possível que problemas resultantes desta técnica seja revelados mais tarde (BAVISTER, 2002).

No momento atual, especialistas em reprodução assistida discutem sobre as indicações da ICSI no tratamento do casal infértil (STAESSEN et al. 1999; FISHEL et al. 2000; OEHNINGER, 2001; OLA et al., 2001). A análise de resultados publicados e os apresentados nesta tese indicam que não existem dados sugestivos que a ICSI deva ser realizada em todos os casos de fertilização *in vitro* (OLA et al., 2001), principalmente quando o fator masculino não estiver presente. Portanto, novos estudos devem ser realizados na tentativa de elaborar critérios que permitam uma indicação mais precisa desta técnica, juntamente com o desenvolvimento de alternativas dirigidas, mais simples, menos caras e mais seguras.

No nosso estudo, considerando a taxa de fertilização, pudemos observar que a técnica de FIV convencional superou a técnica de ICSI, independentemente

da qualidade espermática, excluindo-se a anormalidade severa. Em 2003, uma revisão da literatura realizada por VAN RUMSTE *et al.*, com o intuito de investigar se ICSI aumenta a taxa de bebês nascidos, em comparação com FIV convencional, constatou não haver dados de estudos randomizados, comparando taxa de nascidos vivos. O único estudo randomizado identificado foi realizado por BHATTACHARYA *et al.* (2001), que não encontrou diferença na taxa de gravidez (OR 1,4, 95% IC 0,95 - 2,2). Ainda neste estudo, a taxa de implantação foi mais alta no grupo de FIV que no grupo de ICSI (95/318 – 30%) versus (72/325 – 22%). A taxa de gravidez por ciclo também foi mais alta após FIV e, ainda, o tempo gasto no laboratório foi mais curto com FIV que com ICSI. Segundo estes autores, a técnica de ICSI não oferece nenhuma vantagem sobre FIV em casais com fator masculino normal, concluindo que este procedimento deva ser reservado para casais inférteis com fator masculino severo (VAN RUMSTE *et al.*, 2003).

O presente estudo contribuiu nesse sentido, ao avaliar o desempenho das técnicas de FIV convencional e ICSI, tendo como base a qualidade do sêmen, e concluiu que a técnica de FIV é superior a de ICSI, quando tratados casais com sêmen normal e anormal (leve e moderado). Baseando-se nos dados deste estudo, podemos afirmar que a ICSI não deve ser indicada para casais inférteis com sêmen normal e com anormalidade leve e moderada, a menos que a recuperação espermática prévia não seja satisfatória e a concentração de espermatozóides necessários a inseminação do oócito *in vitro* não seja suficiente. Ainda neste estudo, é importante considerar que a escolha da técnica a ser utilizada não foi aleatória, mas baseada na avaliação clínica e

laboratorial dos casais candidatos à fertilização assistida. Isto pode, de alguma forma, ter influenciado nos resultados entre as duas técnicas . Entretanto, cabe ressaltar que, embora processos de randomização sejam considerados adequados para homogeneização da amostra, por questões éticas, fica difícil justificar a escolha da técnica para determinado casal sem embasamento na avaliação clínica e laboratorial dos mesmos.

Embora o uso da ICSI para todos os casos de fertilização assistida possa minimizar as chances de falha total de fertilização, o uso indiscriminado desta técnica para todos os casais que necessitem de fertilização assistida não se justifica. A ICSI é um procedimento invasivo, que ultrapassa as barreiras naturais que funcionariam, em algumas situações, como filtro, impedindo a ocorrência de um desenvolvimento embrionário anormal. Deve-se ainda considerar que a ICSI é um procedimento complexo, de alto custo e maior risco, a longo prazo, para as crianças, quando comparada à FIV convencional.

Considerando-se as evidências atuais, o mais racional seria continuar em busca de um melhor conhecimento dos gametas, tentando identificar, previamente, aqueles que falhariam no processo de fertilização *in vitro*. E assim determinar qual o limite de anormalidade que autorizaria a indicação da ICSI.

6. Conclusões

1. A técnica de FIV convencional foi superior a técnica de ICSI, quando avaliada a taxa de fertilização, em casais com sêmen normal ou no limite da normalidade.
2. A técnica de FIV convencional apresentou uma taxa de fertilização superior em relação à técnica de ICSI e esta diferença foi significativa, independentemente da qualidade do sêmen.
3. A concentração, motilidade e morfologia espermática não tiveram influência na taxa de fertilização. A única variável com influência significativa na taxa de fertilização foi a técnica de FIV utilizada.

7. Referências Bibliográficas

ABOULGHAR, M.A.; MANSOUR, R.T.; SEROUR, G.I.; AMIN, Y.M.; KAMAL, A. Intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization for sibling oocytes in cases of unexplained infertility and boderlein semen. **J Assist Reprod Genet**, 13:38-42, 1996a.

ABOULGHAR, M.A.; MANSOUR, R.T.; SEROUR, G.I.; SATTAR, M.A.; AMIN, YM. Prospective controlled randomised study of in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in the treatment of tubal factor infertility with normal sperm parameters. **Fertil Steril**, 66:753-6, 1996b.

ACOSTA, A.A.; CHILLIK, C.F.; BRUGO, S.; ACKERMAN, S.; SWANSON, R.J.; PLEBAN, P. et al. In vitro fertilization and the male factor. **Urology**, 28:1-9, 1986.

AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S.; HARGREAVE, T.B.; IRVINE, D.S.; WU, F.C. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. **J Androl**, 10:214-20, 1989.

AITKEN, R.J.; BAKER, H.W.G.; IRVINE, D.S. On the nature of semen quality and infertility. **Hum Reprod**, 10:248-9, 1995.

AITKEN, R.J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J.P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z. et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. ***Biol Reprod***, 59:1037-46, 1998.

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.

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.

BARRATT, C.L.R. On the accuracy and clinical value of semen laboratory tests. - ***Hum Reprod***, 10:250-2, 1995.

BARROSO, G.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. A. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. ***Hum Reprod***, 15:1338-44, 2000.

BAVISTER, B.D. Early history of in vitro fertilization. ***Reproduction***, 124:181-96, 2002.

BHATTACHARYA, S.; HAMILTON, M. P. R.; SHAABAN, M.; SEDDLER, Y.; GHOBARA, T.; BRAUDE, P. et al. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of no-male-facto infertility: a randomized controlled trial. ***Lancet***, 357:2075-9, 2001.

BONDUELLE, M.; WILIKENS, A.; BUYASSE, A.; VAN ASSCHE, E.; WISANTO, A.; DEVROEY, P. et al. A follow-up study of children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. ***Hum Reprod***, 13(Suppl.1):196-207, 1998.

BONDUELLE, M.; CAMUS, M.; DE VOS, A.; STAESSEN, C.; TOURNAYE, H.; VAN ASSCHE, E. et al. Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children. *Hum Reprod*, 14(Suppl.1):243-64, 1999.

BONDUELLE, M.; LIEBAERS, I.; DEKETELAERE, V.; DERDE, M.P.; CAMUS, M.; DEVROEY, P. et al. Neonatal data on a cohort of 2.889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Hum Reprod*, 17:671-94, 2002.

BONDUELLE, M.; PONJAERT, I.; Van STEIRTEGHEM, A.; DERDE, M.P.; LIEBAERS, I. Developmental outcome at 2 years of age for children born after ICSI compared with children born IVF. *Hum Reprod*, 18:342-50, 2003.

BRINKWORTH, M.H. Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans. *Int J Androl*, 23:123-35, 2000.

CALDERON, G.; BELIL, I.; ARAN, B.; VEIGA, A.; GIL, Y.; BOADA, M. et al. Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in-vitro fertilization: first results. *Hum Reprod*, 10:2835-9, 1995.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Assisted Reproduction technology success rates: National Summary and Fertility Clinic Reports. US Department of Health and Human Services, Atlanta, USA. 2000. p.12-30.

CHANG, M.C. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*, 184:466-7, 1959.

CLERMONT, Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat*, 112:35-51, 1963.

COX, D.R.; SNELL, E.J. **The analysis of binary data**. 2^aed., London: Chapman and Hall; 1989. 240p.

CUMMINS, J.M.; JEQUIER, A.M. Treating male infertility needs more clinical andrology, not less. **Hum. Reprod**, 9:1214-9, 1994.

CUMMINS, J.M.; JEQUIER, A.M. Concerns and recommendations for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment. **Hum Reprod**, 10(Supp 1):138-43, 1995.

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

DAVID, G.; BISSON, J.P.; CZYGLIK, F. JOUANNET, P.; GERNIGON, C. Anomalies morphologiques du spermatozoide humain. Prognitionen pour un système de classification. **J Gynéc Obstet Biol Reprod**, 4:17-36, , 1975.

DECLARAÇÃO DE HELSINKE III: Sobre os princípios éticos para pesquisas em seres humanos. (online) Edimburgo, Escócia, 2000 (citada em 7 de outubro de 2000). Avaliável na Internet:<http://www.ibemol.com.br/declarações/helsinque>

DEVROEY, P.; BRAECKMANS, P.; SMITZ, J.; WAESBERGHE, L.; WISANTO, A.; VAN STEIRTEGHEM, A. et al. Pregnancy after translaparoscopic zigote intrafallopian transfer in a patient with sperm antibodies. **Lancet**, 1:1329, 1986.

DUMOULIN, J.M.; COONEN, E.; BRAS, M.; BERGERS-JANSSEN, J.M.; IGNOUL-VANVUCHELEN, R.C.; VAN WISSEN, L.C. et al. Embryo development and chromosomal anomalies after ICSI: effect of the injection procedure. **Hum Reprod**, 16:306-12, 2001.

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.

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.

ERICSON, A.; KALLEN, B.A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in early pregnancy. **Reprod Toxicol**, 15:371-5, 2001.

FADDY, M.J.; SILBER, S.J.; GOSDEN, R.G. Intracytoplasmic sperm injection and infertility. **Nat Genet**, 29:131, 2001.

FISHEL, S.; ASLAM, I.; LISI, F.; RINALDI, L.; TIMSON, J.; JACOBSON, M. et al. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of In-vitro conception? **Hum Reprod**, 15:1278-83, 2000.

GREENHOUSE, S.; RANKIN, T.; DEAN, J. Genetic cause of female infertility: targeted mutagenesis in mice. **Am J Hum Genet**, 62:1282-7, 1998.

GROW, D.R.; OEHNINGER, S.; SELTMAN, H.J.; TONER, J.P.; SWANSON, R.J.; KRUGER, T.F. et al. 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.

HALL, J.; FISHEL, S.; GREEN, S.; FLEMING, S.; HUNTER, A.; STODDART, N. et al. Intracytoplasmic sperm injection versus high insemination concentration in vitro fertilization in cases of very severe teratozoospermia. **Hum Reprod**, 10:493-6, 1995.

HANSEN, M.; KURINCZUK, J.J.; BOWER, C.; WEBB, S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. **N Engl J Med**, 346:725-30, 2002.

HEAPE, W. Preliminary note on the transplantation and growth of mamalian ova within a uterine foster mother. **Proc R Soc**, 48:457-8, 1891.

HEWITSON, L.; SIMERLY, C.; DOMINKO, T.; SCHATTEN, G. Cellular and molecular events after *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, 53:95-104, 2000.

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.

HOLLANDER, M.; WOLFE, D. A. Nonparametric statistical methods, 2nd ed. New York: Willey; 1999. 816p.

HORNE, G.; ATKINSON, A.; BRISON, D.R.; RADFORD, J.; YIN, J.A.; EDI-OSAGIE, E.C. et al. Achieving pregnancy against the odds: successful implantation of frozen-thawed embryos generated by ICSI using spermatozoa banked prior to chemo/radiotherapy for Hodgkin's disease and acute leukaemia. **Hum Reprod**, 16:107-9, 2001.

HSU, M.I.; MAYER, J.; ARONSHON, M.; LANZENDORF, S.; MUASHER, S.; KOLM, P. et al. Embryo implantation in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection: impact of cleavage status, morphology grade, and number of embryos transferred. **Fertil Steril**, 72:679-85, 1999.

JARVI, K.; ZIELINSKI, J.; WILSCHANSKI, M.; DURIE, P.; BUCKSPAN, M.; TULLIS, E. et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and obstructive azoospermia. **Lancet**, 345:1578, 1995.

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. et al. 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.

KASTROP, P.M.M.; WEIMA, S.M.; VAN KOOIJ, R, J.; VELDE, E.R. Comparison between intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization (IVF) with high insemination concentration after total fertilization failure in a previous IVF attempt. **Hum Reprod**, 14:65-9, 1999.

KENT-FIRST, M.G.; KOL, S.; MUALLEM, A.; BLAZER, S.; ITSKOVITZ-ELDOR, J. Infertility in intracytoplasmic-sperm-injection derived sons. **Lancet**, 348:332, 1996.

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, 1988.

LANZENDORF, S.E.; MALONEY, M.K.; VEECK, L.L.; SLUSSER, J.; HODGEN, D.; ROSENWAKS, Z. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. **Fertil Steril**, 49:835-42, 1988.

LIU, D.Y.; LOPATA, A.; JONHSTON, W.I.H.; BAKER, H.W.G. A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize *in vitro*. **Fertil Steril**, 50:782-8, 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, 1989.

LIU, D.Y.; BAKER, H.W.G. Test of human sperm function and fertilization *in vitro*. **Fertil Steril**, 58:465-83, 1992a.

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, 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, 1994.

LIU, D.Y.;BAKER, H.W.G. Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure in clinical *in-vitro* fertilization. **Hum Reprod**, 15:702-8, 2000.

LIU, D.Y.; BAKER, H.W.G. Evaluation and assessment of semen for IVF/ICSI. **Asian J Androl**, 4:281-5. 2002

LOFT, A.; PETERSEN, K.;ERB, K.; MIKKELSEN, A.L.; GRINSTED, J.; HALD, F. et al. A Danish national cohort of 730 infants born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) 1994-1997. **Hum Reprod**, 14:2143-8, 1999.

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.

LUDWIG, M.; KATALINIC, A. Pregnancy course and health of children born after ICSI depending on parameters of male factor infertility. **Hum Reprod**, 18:351-7, 2003.

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.

MAHADEVAN, M.M.; TROUNSON, A.O.; LEETON, J.F. The relationship of tubal blockage, infertility of unknown cause, suspected male infertility, and endometriosis to success of in vitro fertilization and embryo transfer. **Fertil Steril**, 40:755-62, 1983.

MALTER, H.E.; COHEN, J. Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. **Fertil Steril**, 51:139-48, 1989.

MANHES, H.; HERMABESSIEREN, J. Fécondation Intrapéritonéal. Première grossesse obtenue sur indication masculine. Oral Presentation. In: 3^o INTERNATIONAL FORUM OF ANDROLOGY. june 1985, Paris, France.

MARTIN, K.L.; BARLOW, D.H.; SARGENT, I.L. Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. **Hum Reprod**, 13:1645-52, 1998.

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.

MESCHEDE, D.; LEMCKE, B.; EXELER, J.R.; GEYTER, C.; BEHRE, H.M.; NIESCHLAG, E. et al. Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection – prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. **Hum Reprod**, 13:576-82, 1998.

MUNNÉ, S.; ALIKANI, M.; TOMKIN, G.; GRIFO, J.; COHEN, J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. **Fertil Steril**, 64:382-91, 1995

NAYSMITH, T.E.; BLAKE, D.A.; HARVEY, V.J.; JOHNSON, N.P. Do men undergoing sterilizing cancer treatments have a fertile future? **Hum Reprod**, 13:3250-5, 1998

NAVOT, D.; BERGH, P.A.; WILLIAMS, M.A.; GARRISI, G.J.; GUZMAN, I. SANDLER, B. et al. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. **Lancet**, 337:1375-7, 1991.

OEHNINGER, S.; VEECK, L.; LANZENDORF, S.; MALONEY, M.; TONER, J.; MUASHER, S. Intracytoplasmic sperm injection: achievement of high pregnancy rates in couples with severe male factor infertility is dependent primarily upon female and not male factors. **Fertil Steril**, 64:977-81, 1995.

OEHNINGER, S.; KRUGER, T.F.; SIMON, T.; JONES, D.; MAYER, J.; LANZENDORF, S. et al. A comparative analysis of embryo implantation potential in patients with severe teratozoospermia undergoing in-vitro fertilization with a high insemination concentration or intracytoplasmic sperm injection. **Hum Reprod**, 11:1086-9, 1996.

OEHNINGER, S.; ACOSTA, A. A.; MORSHEDI, M.; VEECK, L.; SWANSON, R.J.; SIMMONS, K. et al. Corrective measures and pregnancy outcome in *in vitro* fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. **Fertil Steril**, 50:283-7, 1998.

OEHNINGER, S. Strategies for the infertile man. **Sem Reprod Med**, 19:231-7, 2001.

OLA, B.; AFNAN, M.; SHARIF, K.; PAPAIOANNOU, S.; HAMMADIEH, N.; BARRATT, C.L.R. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? Considerations of fertilization and embryo development, cost effectiveness and safety. *Hum Reprod*, 16:2485-90, 2001.

PALERMO, G.; DEVROEY, P.; CAMUS, M.; GRAUWE, E.D.; KHAN, I.; STAESSEN, C.; WISANTO, A. et al. 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.

PALERMO, G.D.; COLOMBERO, L.T.; SCHATTMAN, G.L.; DAVIS, O.K.; ROSENWAKS, Z. Evolution of pregnancies and initial follow-up of newborns delivered after intracytoplasmic sperm injection. *J Am Med Assoc*, 276:1893-7, 1996.

PALERMO, G.D.; SCHLEGEL, P.N.; HARIPRASHAD, J.J.; ERGUN, B.; MIELNIK, A.; ZANINOVIC, N. et al. Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum Reprod*, 14:741-8, 1999.

PALERMO, G.D.; NERI, Q.V.; HARIPRASHAD, J.J.; DAVIS, O.K.; VEECK, L.L.; ROSENWAKS, Z. ICSI and its outcome. *Sem Reprod Med*, 18:161-9, 2000.

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*, 20:121-2, 1934.

PLACHOT, M.; BELAISCH-ALLART, J.; MAYENGA, J.M.; CHOURAQUI, A.; TESQUIER, L.; SERKINE, A.M. Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. *Hum Reprod*, 17:362-9, 2002.

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.

ROVIO, A.T.; MARCHINGTON, D.R.; DONAT, S.; SCHUPPE, H.C.; ABEL, J.; FRITSCHÉ, E. et al. Mutations at the mitochondrial DNA polymerase (POLG) locus associated with male infertility. *Nature Genet*, 29:261-2, 2001.

SAKKAS, D.; UMER, F.; BIZARRO, D.; MANICARDI, G.; BIANCHI, P.G.; SHOUKIR, Y. et al. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod*, 13:11-9, 1998.

SCHLEGEL, P.N.; SHIN, D.; GOLDSTEIN, M. Urogenital anomalies in men with congenital absence of the vas deferens. *J Urol*, 155:1644-8, 1996.

SCHLEGEL, P.N.; GIRARDI, S.K. *In Vitro* Fertilization for Male Factor Infertility *J Clin Endocrinol Metabol*, 82:709-16, 1997.

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.

SCHOYSMAN, R.; VANDERZWALMEN, P.; NIJS, M.; SEGAL, L.; SEGAL-BERTIN, G.; GEERTS, L. et al. Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet*, 342:1237, 1993.

SCOTT, R.T.; OPSAHL, M.S.; LEONARDI, M.R.; NEALL, G.S.; ILLIONS, E.H.; NAVOT, D. Life table analysis of pregnancy rates in a general infertility population relative to ovarian reserve and patient age. *Hum Reprod*, 10:1706-10, 1995.

STAESSEN, C.; CAMUS, M; CLASEN, K.; DE VOS, A.; VAM STEIRTEGHEM, A. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen. *Hum Reprod*, 14:2474-9, 1999.

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

ST. JOHN, J.C. Incorporating molecular screening into the modern andrology laboratory. *J Androl*, 20:692-701, 1999.

SUTCLIFFE, A.G.; TAYLOR, B.; GRUDZINSKAS, G.; THORNTON, S.; LIEBERMAN, B. Children conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Lancet*, 352:578-9, 1998.

SUTCLIFFE, A.G.; TAYLOR, B.; SAUNDERS, K.; THORNTON, S.; LIEBERMAN, B.A.; GRUDZINSKAS, J.G. Outcome in the second year of life after in-vitro fertilization by intracytoplasmic sperm injection: a UK case-control study. *Lancet*, 357:2080-4, 2001.

TARLATZIS, B.C.; BILI, H. Survey on intracytoplasmic sperm injection: report from the ESHRE ICSI Task Force. *Hum Reprod*, 13(Suppl.1):165-77, 1998.

TERADA, Y.; LUETJENS, C.M.; SUTOVSKY, P.; SCHATTEN, G. Atypical decondensation of the sperm nucleus delayed replication of the male genome, and sex chromosome positioning following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) into golden hamster eggs: does ICSI itself introduce chromosomal anomalies? *Fertil Steril*, 74:454, 2000.

TESARIK, J.;TESTART, J. La Fecondation . *Recherche*, 213:1008 -19, 1989.

TOURNAYE, H.; DEVROEY, P.; LIU, J.; NAGY, Z.; LISSENS, W.; VAN STEIRTEGHEM, A. 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*, 61:1045-51, 1994.

TROUNSON, A.O.; MOHR, L.R., WOOD, C.; LEETON, J.F. Effect of delayed insemination on in-vitro fertilization, culture and transfer of human embryos. *J Reprod Fertil*, 64:285-94, 1982

VAN DE VELDE, E.; VAN BAAR, A.; VAN KOOIJE, R. Concerns about assisted reproduction. *Lancet*, 351:1524-5, 1998.

VAN RUMSTE, M.M.E.; EVERS, J.L.H.; FARQUHAR, C.M. Intra-cytoplasmic sperm injection versus conventional techniques for oocyte insemination during in vitro fertilization in patients with non-male subfertility. *Cochane Rev*, 2003

VAN STEIRTEGHEM, A.C.; NAGY, P.; JORIS, H. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 8:1061-6, 1993.

VAN STEIRTEGHEM, A.; BONDUELLE, M.; DEVROEY, P.; LIEBAERS, I. Follow-up of children born after ICSI. *Hum Reprod*, 8:111-6, 2002

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.

WENNERHOLM UB, BERGH C, HAMBERGER L, WESTLANDER G, WIKLAND M, WOOD M. Obstetric outcome of pregnancies following ICSI, classified according to sperm origin and quality. *Hum Reprod*, 15:1189-94, 2000.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO - **Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction**, Cambridge University Press, Cambridge, 1999. 107p.

YANAGIMACHI, R. Is an animal model needed for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and other assisted reproduction technologies? *Hum Reprod*, 10:2525-6, 1995.

8. Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.
– **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^a ed.,
Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses.
Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp. Ed. SAD – Deliberação CCPG-
001/98 (alterada 2002).

9. Anexos

9.1. *Anexo 1 – Carta de Autorização para Estudo dos Dados*

Docteur BASTIT Patrick
Clinique St Antoine
Laboratoire de Biologie de la Reproduction
696, rue Pinchon
76230 BOIS GUILLAUME

Tel: 02.35.12.60.18
Fax : 02.35.12.61.99

Le 15 octobre 2002
Mr. le Pr BAHAMONDES
Université de Campinas
Sous couvert du Dr BIAZOTTI

Monsieur le Professeur,

La fécondation in vitro est une technique d'assistance Médicale à la Procréation qui, comme vous le savez, a maintenant largement fait les preuves de son efficacité.

Depuis bientôt 25 ans, elle a permis la naissance de centaines de milliers d'enfants de par le monde.

Cette technique s'adresse essentiellement aux couples inféconds pour lesquels le sperme reste proche des valeurs normales.

Depuis plus de 10 ans maintenant, une nouvelle technique s'est largement répandue : l'injection intra-cytoplasmique d'un spermatozoïde.

Initialement réservé aux troubles majeurs de la production ou de l'excrétion spermatique quand la fécondation in vitro n'était techniquement pas possible, elle a bouleversé le pronostic de ces infertilités masculines sévères.

Cependant et sûrement en raison de son taux élevé de succès dans les équipes expérimentées (> 35 % de grossesses cliniques par tentative) on assiste bien des endroits à une dérive dans ces indications au détriment de la fécondation in vitro.

Cette pratique paraît excessive voire potentiellement dangereuse en raison du manque de recul sur cette technique qui ne permet pas encore de juger si elle génère des effets délétères: transmission de particules étrangères virales ou autres lors de l'injection, perturbations de l'arrangement chromosomique, propagation de maladies géniques ayant des implications sur l'enfant à naître.

De plus, étant donné la répartition naturelle moitié moitié de la responsabilité féminine et masculine dans l'infécondité du couple, il est illogique d'en arriver à une pratique <<tout ICSI >>.

En fait les pratiques ont encore besoin d'être évaluées et je pense que c'est ce que se propose de réaliser le Dr Christina BIAZOTTI dans son travail de thèse.

Je connais bien Christina, puisque l'essentiel de son cursus de formation en Biologie de Reproduction s'est effectué dans mon unité de Biologie tant publique que privée.

J'atteste donc ici de son sérieux et de sa motivation.

Bien entendu, je suis disposé à lui permettre d'exploiter pour son travail les données colligées dans mon laboratoire.

En espérant que ce travail pourra être mené à bien, veuillez croire, Monsieur le Professeur, à l'assurance de mes sentiments les meilleurs.

Patrick Bastit

9.2. Anexo 2– Classification da Morfologia Espermática segundo David et al., 1975

Spermocitogramme

Nom :

prénom :

Date :

3 a 4 μ

4 μ

| | | 3 a 4 μ | 4 μ | |
|----------------------|---------------------------|----------------------|---------|--|
| Normaux | Vrais | | | |
| | Acro-vésiculeux | | | |
| | Acro-hétérogènes | | | |
| Anomalies de la tête | Formes allongées (a) | Simples 1 | | |
| | | Base amincie 2 | | |
| | | Battant de cloche 3 | | |
| | | Effilés 4 | | |
| | f. amincies (b) | | | |
| | Microcéphales (c) | | | |
| | Macrocéphales (d) | | | |
| | Dupliquées (e) | | | |
| | Formes irrégulière (f) | Contour irrégulier 1 | | |
| | | Acrosome mal formé 2 | | |
| Sans acrosome 3 | | | | |
| f. en lyse (g) | | | | |
| Principale | Restes cytoplasmiques (h) | | | |
| | Angulations (i) | | | |
| Pièce Intermédiaire | Flagelles absents (j) | | | |
| | Flagelles courts (K) | | | |
| | Flagelles enroulés (l) | | | |
| | Flagelles doubles (m) | | | |
| Flagelles isolés | | | | |

9.3. Anexo 3 – Ficha de Avaliação Espermática

| UNITÉ DE BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION - Docteur P. BASTIT | | | | |
|---|--|-------------------------|--------------------------|--|
| _Clinique Saint-Antoine - 696, rue Robert Pinchon - 76230 BOIS-GUILLAUME (Rouen) - Tél. 35 12 60 18 | | | | |
| Unité rattachée au LABORATOIRE DE BIOLOGIE MÉDICALE ET DE CYTO-PATHOLOGIE Dr PRENTOUT et Dr GRAY | | | | |
| 46, rue de Bouvreuil, 76007 ROUEN CEDEX | | | | |
| M. Mme | | DATE : | | |
| PRESCRIPTEUR | | Lieu de recueil : | | |
| | | Durée de l'abstinence : | | |
| S P E R M O G R A M M E | VOLUME : | ml | MOBILITE après | |
| | PH : | | 1 h | |
| | VISCOSITE : | | 4 h | |
| | NUMERATION : | | progressive | |
| | Spermatozoïdes : | Millions / ml | % | |
| | Cellules : | Millions / ml | % | |
| | | | non progressive | |
| | | | nulle | |
| | | | VITALITE : | |
| | | | % | |
| | | | AGGLUTINATS | |
| M O R P H O L O G I E | FORMES TYPIQUES : | | % | |
| | DETAIL DES ATYPIES SPERMATIQUES : | | AUTRES ELEMENTS : | |
| | TETE | FLAGELLE | | |
| | Allongée : | Reste cytoplasme : | Flagelles isolés : | |
| | Amincie : | Angulation : | Spz en lyse : | |
| | Microcéphale : | P interm grêle : | Polynucléaires : | |
| | Macrocéphale : | Ecourté : | Cellules sperm : | |
| | Multiple : | Enroulé : | Autres cell : | |
| | Acrosome malf : | Multiple : | Fragments cell : | |
| | Base anormale : | Absent : | | |
| | Calibre irrég. | | | |
| M I G R A T I O N | TECHNIQUE : | | | |
| | NUMERATION SPERMATIQUE : | Millions / ml | RENDEMENT : | |
| | MOBILITE progressive : | % | % | |
| | MOBILITE sur place : | % | FORMES TYPIQUES : | |
| | Volume obtenu : | ml | % | |
| | SPZ MOBILES OBTENUS PAR ML TRAITE : | | | |
| SURVIE à 24 H : | % | | | |
| SPERMOCULTURE : | | | | |
| AUTRES EXAMENS : | | | | |
| CONCLUSION : | | | | |

L.A.M. autorisé N° 76-

9.4. **Anexo 4 – Ficha de Dados Coletados em Fertilização in vitro**

UNITE DE BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION - DOCTEUR P. BASTIT
 Clinique Saint Antoine - 696 rue Robert Pinchon - 76230 BOIS GUILLAUME (Rouen) - Tél. 02.35.12.60.18
 Unité rattachée au LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE ET DE CYTO-PATHOLOGIE
 Dr PRENTOUT et Dr GRAY

COMPTE RENDU DE TECHNIQUE D'A.M.P. du

Madame NOM Prénom :

Monsieur NOM Prénom :

FIV - ICSI - GIFT N° N° Dossier Clinique : N° dossier Labo : N° FIVNAT :

RECHERCHE DES COMPLEXES CUMULO OVOCYTAIRES (CCO)

J0 Nb de CCO trouvés : __ __ Nb CCO gardés : __ __
 Heure : __ __ __ Nb d'ovocytes en VG : __ __ en MI : __ __
 Technicien : __ __ __ Gynéco : __ __ __

PREPARATION DU SPERME Recueil isoloir N° : Heure :

Etat de santé récent de l'homme :

J0 Qualité initiale : Normale - OAT - AC - AUTRES :

Préparation : centrifugation simple Gradient de densité TORENTAL

Résultat : Très bon Moyen Faible Technicien* : __ __ __

PVP : Swim out :

Heures de mise en contact ou de fin de microinjection __ __ __ Technicien* : __ __ __

Nombre d'Ovocytes injectés : __ __ __

DECORONISATION

J1 Nb à 2 PN : __ __ Nb à 3 PN : __ __ Nb à 2 BI : __ __ Heure : __ __

Infection : oui non Technicien* : __ __ __

STADE EMBRYONNAIRE

J2 Nb embryons : __ __ de type :+.....+.....;

J3 à J5 Type milieu : Résultats : Technicien* : __ __ __

REPLACEMENT EMBRYONNAIRE

Placement à J __ Nb d'embryons : __ de qualité + +

Qualité du placement : facile difficile TDT canule AG

Intervenant Labo* : __ __ __ Gynéco : __ __ __ Supplémentation HCG

CONGELATION D'EMBRYONS SURNUMERAIRES : OUI NON

Commentaires :

.....

.....

Date Signature

* mettre ses initiales

LAM 76.5

DUREE DU TRAJET

TELEPHONE :