

Análise da Morfologia Espermática Correlacionada com a Morfologia Pré-embrionária

Correlation Between Sperm Morphologie and Embryo Quality After ICSI

Jonathas Borges Soares
Janaina Jardelha Mendes dos Santos
Sidney Glina
Nelson Antunes Jr.

Andrea Giannotti Galuppo
Françoise Elia Mizrahi
Roberta Wonchockier
Vera Beatriz Feher Brand

Abstract

Objective: *Intracytoplasmatic sperm injection (ICSI) described by Palermo et al. in 1992 has dramatically changed the treatment of severe male factor infertility. Many doubts about the spermatozoa quality have appeared, because of that the spermatozoa morphology became extremely important in the semen evaluation. Generally the sperm morphology analysis is done before the procedure and let us to think if the sample obtained in the ICSI day would be value different. The objective of this work is to determine the correlation between spermatozoa morphology and embryo quality when the sperm samples analysis was realized in the same day of ICSI procedure.* **Material and Methods:** *This study included 71 patients who underwent our ICSI cycles from May to August 2000. In all cases were realized the sperm morphology analysis on the ICSI day according to Krüger Strict Criteria. Slides with 10µl of fresh and liquefied semen were done to analyze the sperm morphology.* **Results:** *The semen samples of 71 patients were analyzed and compared with embryonic classification by Veeck (1991). Our results showed that seminal samples with poor sperms parameters produced, in the most of times, bad quality embryos.* **Conclusion:** *The analysis of these results allow us to conclude that spermatoc morphology using Krüger Strict Criteria in the day of the therapeutic procedure has influence in embryo quality.*

Key words: *Sperm, Morphology, Krüger Criteria, Embryo Quality.*

Introdução

Com a introdução da injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) por Palermo *et al.* 1992, o fator masculino pode ser quase sempre contornado com sucesso. Entretanto, surgiram dúvidas em relação à qualidade dos espermatozoides usados, tornando o estudo das características morfológicas dos espermatozoides extremamente importante para a avaliação de uma amostra de sêmen.

Para a análise da morfologia, em geral, são utilizadas as recomendações técnicas da Organização Mundial de Saúde (OMS) ou os critérios estritos de Krüger. No primeiro caso uma amostra normal é aquela que apresenta mais de 30% de espermatozoides ovais. No segundo caso a amostra é considerada normal quando pelo menos 14% dos espermatozoides são ovais (Krüger *et al.*, 1998; Oehninger *et al.*, 1998). Entretanto, a comparação de resultados se torna difícil (Parinaud *et al.*, 1993) devido à existência de diferentes critérios de avalia-

Correspondência para:
Hospital Israelita Albert Einstein
Unidade de Reprodução Humana – 7º Andar
Av. Albert Einstein, 627 – Morumbi
CEP: 05651-901 – São Paulo-SP
Fone: (11) 3747-2755 – Fax: (11) 3747-2705
E-mail: jbsouares@sti.com.br

ção; cada centro avalia a morfologia de acordo com os critérios de sua escolha.

Ménézo *et al.* (2000) dizem que pelo fato da seleção dos espermatozoides usados na ICSI ser realizada somente em relação a aspectos morfológicos e de motilidade no momento da injeção, a avaliação da qualidade destes é muito variável e, portanto, provavelmente estas características não tenham relação com a qualidade de desenvolvimento do embrião. Segundo Oehninger *et al.* (1998), parâmetros espermáticos pobres não contribuem para um desenvolvimento embrionário de baixa qualidade. Já Parinaud *et al.* (1993) propuseram que a qualidade pré-embriônica está relacionada com a qualidade dos espermatozoides. Ron-El *et al.* (1991) relataram atraso de fertilização e baixo desenvolvimento pré-embriônico associado com a qualidade seminal após fertilização *in vitro*. Em geral a análise da morfologia espermática é realizada em amostras colhidas antes do dia do procedimento e deixam dúvida se esta análise no dia do procedimento, seria diferente. Este trabalho tem como objetivo determinar se a morfologia dos espermatozoides utilizados no procedimento de ICSI se correlaciona com a qualidade dos pré-embriões gerados, quando analisamos as amostras seminais colhidas no dia do procedimento terapêutico.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no período de maio a agosto de 2000, em 71 pacientes que se submeteram ao procedimento de ICSI na Unidade de Reprodução Humana do Hospital Israelita Albert Einstein. Em todos os casos foi realizada a análise da morfologia dos espermatozoides da amostra de sêmen colhida no dia do procedimento de ICSI segundo os critérios estritos de Krüger (Krüger *et al.*, 1998). As amostras de sêmen foram obtidas por masturbação e o processamento foi realizado pelo método de centrifugação em gradiente descontínuo de Isolate (Irvine Scientific cód.: 99.257, 99.258).

Foi realizado um bloqueio ovariano com análogo de GnRH seguido de uma hiperestimulação ovariana controlada, induzida pela administração de: gonadotrofina menopausal humana, urofollitrofina (FSH) ou FSH recombinante. Quando um folículo alcançava de 20-22mm de diâmetro máximo, o hCG era administrado via intramuscular. Após 34-36 horas do hCG os folículos eram aspirados com o auxílio de ultra-som transvaginal. A micromanipulação era realizada em placas de petri de plástico (Falcon, USA) em microgotas de 5ml de meio HTF modificado (Irvine Scientific, USA), suplementado com 5% de albumina sérica humana (Irvine Scientific, USA) (RON-EL, 1991). A fertilização foi verificada de 17-21 horas após a injeção e a qualidade morfológica dos pré-embriões foi determinada segundo os critérios morfológicos estabelecidos por Veeck (1991).

As lâminas para a morfologia foram montadas com 10µl de sêmen fresco e liquefeito e foi feito um esfregaço fino. A coloração foi feita pelo método de Papanicolau modificado como descrito pela OMS (1999). As lâminas foram analisadas sob aumento de 1.000 vezes usando-se óleo de imersão e foram analisados 100 espermatozoides em 10 campos no mínimo.

Resultados

Foram analisadas as amostras seminais de 71 pacientes quanto à morfologia espermática e os resultados foram correlacionados com a classificação embrionária (**Tabela I**). Os embriões foram divididos em dois grupos de acordo com sua morfologia: embriões de melhor qualidade (classe I e II) e embriões de qualidade inferior (classe III, IV e V). Verificamos que amostras de sêmen que apresentavam 8% ou mais de forma ovais são as que estão correlacionadas com a formação de pré-embriões de melhor qualidade (classe I e II). Como pode ser visto na **Tabela I** e no **Gráfico I**.

Tabela I
Qualidade Embrionária nos Diferentes Grupos de Morfologia Espermática

Nº de Casais	% de sptz ovais	% de Embriões Classe I e/ou II	% de Embriões Classe III e/ou IV e/ou V
11	0-7%	47,1%	52,9%
10	8-14%	68,3%	31,7%
48	15-23%	66%	34%

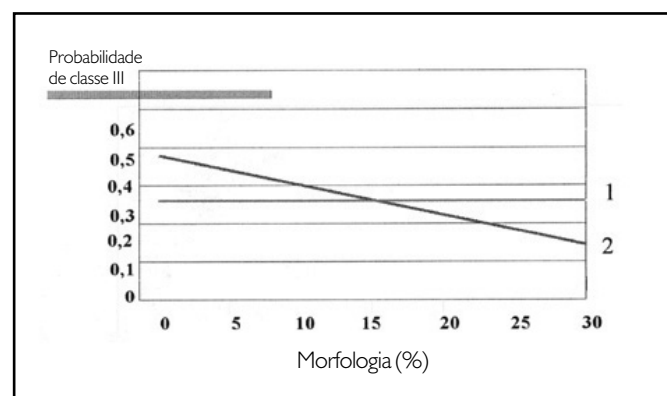


Gráfico 1 – Correlação entre morfologia espermática e a probabilidade de PE classe III (1. morfologia espermática, 2. probabilidade de PE classe III).

A análise estatística foi realizada através de regressão logística dos dados, e foi verificada a chance de um embrião apresentar classificação morfológica igual ou maior que III em relação ao resultado da morfologia espermática das amostras seminais. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. A estimativa de Odds Ratio foi de 0,009, com limites de confiança de (0,001), (0,226); o que significa que a cada aumento de uma unidade no resultado da morfologia espermática, a probabilidade de um embrião ser classe igual ou maior que III diminui em 0,009.

Discussão

Segundo Oehninger *et al.* (1998) e Host *et al.* (1999) parâmetros seminais de baixa qualidade não contribuem para um mau desenvolvimento pré-embriônico. Esses mesmos autores acreditam também que o critério estrito de Krüger não tem valor preditivo nos resultados da FIV. Nos trabalhos de Oehninger *et al.* (1998) e Host *et al.* (1999) foram correlacionados qualidade seminal com taxas de fertilização, clivagem, implantação e gestação e em ambos os trabalhos não foi encontrada diferença estatística significativa na análise dos resultados. Portanto, eles sugerem que a qualidade do sêmen não interfere na qualidade dos pré-embriões formados.

Entretanto, a opinião de que a morfologia espermática não tem importância para o desenvolvimento pré-embriônico não é unânime. De acordo com nossos resultados as amostras seminais com parâmetros morfológicos pobres na maioria dos casos geravam pré-embriões de baixa qualidade. Quando se utilizava sêmen de doador cujos parâmetros seminais eram de melhor qualidade, os pré-embriões gerados eram de qualidade superior. Observando esses fatos, desenvolveu-se o presente trabalho relacionando a qualidade morfológica seminal com a pré-embriônica. Os resultados demonstram uma relação direta entre a morfologia espermática e a qualidade dos pré-embriões gerados. Foi observado que quanto maior o percentual de espermatozóides normais, ou seja, quanto maior a porcentagem de espermatozóides ovais, maior é a chance de um embrião ser classe I ou II (Tabela I e Gráfico I) e de acordo com Mizrahi *et al.* (1999) provavelmente maior a chance de gestação.

Parinaud *et al.* (1993) sugeriram que o espermatozóide está envolvido na qualidade pré-embriônica desde os primeiros estágios do desenvolvimento e demonstraram que existe uma relação entre espermatozóides morfolologicamente anormais e a baixa qualidade embrionária. Ron-El *et al.* (1991) relataram atraso de fertilização e baixo desenvolvimento pré-

embrionário associado com a qualidade seminal após a fertilização *in vitro*.

Em estudo descrito por Krüger *et al.* (1988) pacientes com quantidade de espermatozóides ovais abaixo de 4% tiveram taxa de fertilização de 7.6% e pacientes com morfologia espermática entre 4 e 14% tiveram um aumento significativo de fertilização para 63.9%, demonstrando assim a existência de correlação entre taxa de fertilização e porcentagem de espermatozóides normais.

A análise dos resultados nos permite concluir que a morfologia espermática avaliada pelos critérios estritos de Krüger, no dia do procedimento terapêutico, tem influência na qualidade embrionária.

Resumo

Introdução: A injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) descrita por Palermo *et al.* em 1992, mudou consideravelmente o tratamento do fator masculino no casal infértil. Surgiram muitas dúvidas a respeito da qualidade dos espermatozóides e por esse motivo a análise da morfologia espermática tornou-se um parâmetro extremamente importante na avaliação da amostra de sêmen. Geralmente essa análise é realizada antes do procedimento de ICSI e nos deixa dúvidas a respeito de como seria esse resultado no dia do procedimento. O objetivo desse trabalho foi determinar se existe correlação entre a morfologia espermática e a qualidade embrionária, quando foram analisadas as amostras seminais do dia da ICSI. **Material e Métodos:** Este estudo incluiu 71 pacientes que procuraram nosso Centro para tratamento de infertilidade entre maio e agosto de 2000. Em todos os casos foi realizada a análise da morfologia na amostra de sêmen no dia da ICSI de acordo com os critérios estritos de Krüger. Foram feitas as lâminas com 10 μ l da amostra liquefeita de sêmen para a análise da morfologia. **Resultados:** As amostras de sêmen de 71 pacientes foram analisadas e comparadas com a classificação embrionária (Veeck, 1991). Nossos resultados mostraram que amostras seminais com parâmetros pobres produzem, na maioria das vezes, embriões de má qualidade. **Conclusão:** Nossos resultados nos permitem concluir que a análise da morfologia espermática usando os critérios estritos de Krüger, no dia do procedimento terapêutico, teve influência na qualidade dos embriões.

Unitermos: Espermatozóide, Morfologia, Critério de Krüger, Qualidade embrionária.

Referências

1. Host E, Lindenberg S, Ernst E, Christensen F. Sperm morphology and IVF: embryo quality in relation to sperm morphology following the WHO and Krüger's strict criteria. *Act Obst et Gynecol Scan*, 78: 526-529, 1999.
2. Kidd SA; Eskenazi B; Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril*, 75: 237-248, 2001.
3. Krüger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertility Sterility*, 49: .112117, 1988
4. Ménéz Y, Barak Y. Comparison between day-2 embryos obtained either from ICSI or resulting from short insemination IVF: influence of maternal age. *Human Reproduction* 15: 1776-1780, 2000.
5. Mizrahi FE, Soares JB, Wonchokier R, Brand VBF, Czeresnia CE, Antunes Jr N, Glina S. Determinação da qualidade embrionária e correlação com sua taxa de implantação, em um programa de Reprodução Assistida. *J Bras Reprod Assist*, .3: 14-9, 1999.
6. Oehninger S, Chaturvedi S, Toner J, Morshedi M, Mayer J, Lanzendorf S and Muasher S. Semen quality: is there a paternal effect on pregnancy outcome in *in-vitro* fertilization/ intracytoplasmic sperm injection? *Human Reproduction*, 13: .2161-2164, 1998.
7. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoa into a oocyte. *Lancet*, 2: 17- 18, 1992.
8. Parinaud J, Miesusset R, Vieitz G, Labal B, Richoille G. Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertility Sterility*, 60: 888-892, 1993.
9. Ron-el R, Nachum H, Herman A, Golan A, Caspi E, Soffer Y. Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality. *Fertility Sterility*, 55: .338-344, 1991.
10. Veeck, LL. *Preembryo Atlas of the Human Oocyte and Early Conceptus: Preembryo grading*. USA: Williams & Wilkins, 1991.
11. World Health Organization: *WHO Laboratory Manual of the examination of Human Semen and Sperm- Cervical Mucus Interaction*. 14 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.