

EDSON BORGES JÚNIOR

**A influência da ativação oocitária artificial com ionóforo de cálcio
A23187 em pacientes submetidos a ciclos de injeção
intracitoplasmática utilizando diferentes origens de
espermatozóides**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia

Botucatu

2007

EDSON BORGES JÚNIOR

**A influência da ativação oocitária artificial com ionóforo de cálcio
A23187 em pacientes submetidos a ciclos de injeção
intracitoplasmática utilizando diferentes origens de
espermatozóides**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia

Orientador: Prof. Dr. José Gonçalves Franco Júnior

Botucatu

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Borges Júnior, Edson.

A influência da ativação oocitária artificial com ionóforo de cálcio A23187 em pacientes submetidos a ciclos de injeção intracitoplasmática utilizando diferentes origens de espermatozóides / Edson Borges Júnior. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2007.

Orientador: José Gonçalves Franco Júnior

Assunto CAPES: 40101150

1. Reprodução humana
2. Inseminação artificial humana
3. Espermatozóide

CDD 618.178

Palavras chave: Cálcio; Epidídimo; Espermatozóide; ICSI; Testículo

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Lia e Edson**, que cada vez mais admiro e compreendo.

Aos meus filhos, **Edson Neto e Vitória**, minhas fontes de alegria e beleza.

À **Deborah**, meu amor e minha companheira.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. **José Gonçalves Franco Jr.**, pela oportunidade de realizar este Trabalho e por todo o carinho e apoio como amigo e professor.

À toda equipe do **Fertility** – Centro de Fertilização Assistida e do **Instituto Sapientiae**, serviços que me permitiram elaborar os dados deste Trabalho.

À **Margaret Meira** com meu carinho especial.

À **Daniela Braga** e **Tatiana Bonetti**, meus sinceros agradecimentos pela enorme colaboração e dedicação.

RESUMO

Desde o primeiro relato de sucesso em humanos, a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI) tem sido particularmente indicada para casos de alterações seminais graves, sendo já demonstrada uma relação diretamente proporcional entre os resultados deste procedimento e a qualidade seminal. Tem sido sugerido que a incapacidade de o espermatozóide iniciar a ativação oocitária seja uma das principais causas de falha de fertilização após a ICSI. Estudos prévios identificaram o cálcio como um importante segundo mensageiro durante a ativação oocitária e que o tratamento com ionóforo do cálcio é capaz de favorecer a ativação oocitária, resultando em fertilização, desenvolvimento embrionário e gestações normais. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da Ativação Oocitária Artificial (AOA) com ionóforo do cálcio A23187 em ciclos de ICSI quando utilizados espermatozóides de diferentes origens. Foram avaliados 314 ciclos de ICSI divididos em três Grupos: EJACULADO ($n = 92$), EPIDIDIMÁRIO ($n = 82$) e TESTICULAR ($n = 140$), sendo cada um deles dividido em subgrupos, dependendo da realização (Subgrupo AOA) ou não de AOA (Subgrupo Controle – CT). Foram avaliados também separadamente os ciclos de mulheres com idade inferior a 36 anos, objetivando minimizar o efeito da idade sobre os resultados dos tratamentos. Para a ativação oocitária, os oócitos foram mantidos por 30 minutos após a ICSI em meio de cultivo para AOA, contendo $5\mu\text{M}$ de ionóforo de cálcio A23187 e em aproximadamente 20 horas a fertilização foi confirmada pela presença de 2 Pró-Núcleos. Para cada grupo experimental foram comparados, entre os Subgrupos AOA e CT, os seguintes parâmetros: taxa de fertilização normal, taxa de falha parcial de fertilização, porcentagem de bons embriões no dia da transferência, taxa de gestação clínica, taxa de implantação e taxa de abortamento. Não foi observada diferença significativa entre os subgrupos de estudo, independentemente da origem do espermatozóide, para quaisquer parâmetros avaliados, quando a idade das pacientes não foi levada em consideração. Porém, quando avaliados os ciclos de pacientes com idade inferior a 36 anos, a AOA foi capaz de aumentar a taxa bons embriões (74,5% vs 53,0%, $P = 0,011$, para AOA e CT, respectivamente), a taxa de implantação (19,3% vs 10,5% $P = 0,025$, para AOA e CT, respectivamente), quando utilizados espermatozóides ejaculados, e a taxa de bons embriões (64,4% vs 50,3%, $P = 0,006$, para AOA e CT,

respectivamente) para espermatozóides epididimários, mas não testiculares. Quando avaliados casos de azoospermia obstrutiva, espermatozóides epididimários tiveram melhor capacidade de resposta à AOA quando comparados aos testiculares. Este estudo suporta a hipótese de que a AOA é capaz de melhorar os resultados da ICSI apenas em pacientes jovens quando utilizados espermatozóides provenientes do ejaculado ou epidídimo, sugerindo o envolvimento da maturidade do espermatozóide e qualidade do oócito na ativação oocitária.

Palavras-chave: ICSI, espermatozóide, cálcio, testículo, epidídimo.

ABSTRACT

Since the first report of a birth after ICSI, it has been specially used for severe male factor of infertility and it was demonstrated that the semen quality influences the ICSI outcomes. Previous studies suggested that failure of fertilization after ICSI may be due to a spermatozoa inability in trigger the oocyte activation. Calcium has long been identified as a universally important second messenger during oocyte activation and many studies demonstrated that treatment with calcium ionophore may increase the free intracellular calcium, promoting oocyte activation, resulting in fertilization, embryo development and pregnancies. The aim of this study was to evaluate the effect of artificial oocyte activation (AOA) with calcium ionophore A23187 in ICSI cycles using sperm from different origins. It was evaluated 314 ICSI cycles divided in groups according to the origin of spermatozoa: EJACULATED group (n = 92), EPIDIDYMAL group (n = 82) and TESTICULAR group (n = 140). Each group was split into sub-groups depending on the AOA treatment: sub-group AOA, when it was performed AOA and sub-group Control-CT, when it was not performed AOA. Furthermore, it was evaluated separately only cycles in each woman were younger than 36 years old. After ICSI, oocytes were incubated in culture medium containing calcium ionophore A23187 (5 μ M concentration) for 30 minutes and in approximately 20 hours oocytes were checked for normal fertilization, defined as observation of two distinct pronucleous. For each experimental group the following parameters were compared between the sub-groups AOA and CT: normal fertilization rate; partial fertilization fail rate; percentage of high quality embryos on the transfer day; implantation rate; pregnancy rate and miscarriage rate. For all the evaluated parameters, it was not observed any significant difference between the subgroups for the three spermatozoa origin groups. However, when it was evaluated only cycles in which the female age was lower than 36 years, the AOA was able to increase the high quality embryos rate (74,5% vs 53,0% $P = 0,011$, for AOA and CT respectively) and implantation rate (19,3% vs 10,5% $P = 0,0025$, for AOA and CT respectively) when it was used ejaculated spermatozoa, and the high quality embryos rate (64,4% vs 50,3%, $P = 0,006$, for AOA and CT respectively), when it was used epididymal but not testicular spermatozoa. For the obstructive azoospermia cycles, epididymal spermatozoa had better response to AOA when compared to testicular spermatozoa.

Our results support the hypothesis that the AOA may be a useful tool to improve the ICSI outcomes only in young patients when ejaculated or epididymal spermatozoa are used, suggesting the role of the spermatozoa maturity and oocyte quality in oocyte activation.

Key-words: ICSI, spermatozoa, calcium, testicle, epididymis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	O papel do IP ₃ na liberação do Ca ²⁺ a partir do retículo Endoplasmático	25
FIGURA 2	Procedimento cirúrgico para recuperação de espermatozóides epididimários (PESA)	35
FIGURA 3	Procedimento cirúrgico para obtenção de espermatozóides testiculares (TESA)	36
FIGURA 4	Esquema descritivo da estimulação ovariana e desenvolvimento folicular	38
FIGURA 5	Placas de pré-incubação – 8 gotas de 100µL de meio de cultura HTF (Irvine, EUA), suplementado com 15% de Albumina Sérica Humana (Human Seric Albumin – HSA; Irvine, EUA), cobertas com 15mL de óleo mineral (Ovoil; Vitrolife, Suíça) previamente equilibrado para temperatura e pH	39
FIGURA 6	Placas de ICSI – 4µL de meio Hepes tamponado (Irvine, EUA), onde foi colocado um oócito por gota, e uma gota central de 4µL de PVP (polivinilpirrolidona; Irvine, EUA), na qual foram adicionados 2mL da amostra de espermatozóides a serem injetados. As gotas foram cobertas por 15mL de óleo mineral (Ovoil; Vitrolife, Suíça) previamente equilibrado para temperatura e pH	40
FIGURA 7	Placas de cultura embrionária – 100µL de meio de cultura embrionária, onde foi colocado um oócito injetado por gota, coberta por 5mL de óleo mineral (Ovoil; Vitrolife, Suíça) previamente equilibrado para temperatura e pH	40
FIGURA 8	Fertilização normal, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR	50

FIGURA 9	Falha parcial de fertilização, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR	50
FIGURA 10	Bons embriões, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR	51
FIGURA 11	Implantação, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR	52
FIGURA 12	Gestação total e continuada, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR	53
FIGURA 13	Abortamento, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR	53
FIGURA 14	Fertilização normal, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR em pacientes com idade ≤ 35 anos	58
FIGURA 15	Falha parcial de fertilização, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR em pacientes com idade ≤ 35 anos	58
FIGURA 16	Bons embriões, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR em pacientes com idade ≤ 35 anos	59
FIGURA 17	Implantação, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR em pacientes com idade ≤ 35 anos	60
FIGURA 18	Gestação total e continuada, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR em pacientes com idade ≤ 35 anos	61

FIGURA 19	Abortamento, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR em pacientes com idade ≤ 35 anos	61
FIGURA 20	Fertilização normal, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA–TESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA	65
FIGURA 21	Falha parcial de fertilização, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA–TESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA	65
FIGURA 22	Bons embriões, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA–TESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA	66
FIGURA 23	Implantação, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA–TESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA	67
FIGURA 24	Gestação total e continuada, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA–TESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA	68
FIGURA 25	Aborto, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA–TESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA	68
FIGURA 26	Fertilização normal nos Grupos AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–PESA AOA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA –TESA AOA	70
FIGURA 27	Falha parcial de fertilização nos grupos AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–PESA AOA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA –TESA AOA	71

FIGURA 28	Bons embriões nos Grupos AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA –PESA AOA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA AOA	72
FIGURA 29	Implantação nos Grupos AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA –PESA AOA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA AOA	73
FIGURA 30	Gestação total e continuada, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–PESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA	73
FIGURA 31	Abortamento nos Grupos AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA –PESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Distribuição das pacientes nos grupos e subgrupos de estudo	33
TABELA 2	Características gerais do Grupo EJACULADO	47
TABELA 3	Características gerais do Grupo EPIDIDIMÁRIO	48
TABELA 4	Características gerais do Grupo TESTICULAR	49
TABELA 5	Características gerais do Grupo EJACULADO em pacientes com idade \leq 35 anos	55
TABELA 6	Características gerais do Grupo EPIDIDIMÁRIO em pacientes com idade \leq 35 anos	56
TABELA 7	Características gerais do Grupo TESTICULAR em pacientes com idade \leq 35 anos	57
TABELA 8	Características gerais do Grupo AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA –TESA	63
TABELA 9	Características gerais do Grupo AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA –TESA	64
TABELA 10	Características gerais dos Grupos AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–PESA AOA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA –TESA AOA	69

LISTA DE SIGLAS

AOA	Ativação Oocitária Artificial
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
2 PN	2 Pró-Núcleos
ELS	Espermátides Alongadas
EOC	Estímulo Ovariano Controlado
FCE	Fatores Citosólicos Espermáticos
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSA	Albumina Sérica Humana
HTF	Fluido de tuba uterina humano
IC	Intervalo de Confiança
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide
LH	Hormônio Luteinizante
MAP	Proteína Ativada por Mitógeno
MPF	Fator Promotor da Maturação
MI	Metáfase da Primeira Divisão Meiótica
MII	Metáfase da Segunda Divisão Meiótica
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
PESA	Punção Percutânea de Espermatozóides Epididimários
PI	Prófase da Primeira Divisão Meiótica
PN	Pró-Núcleo
r-FSH	Hormônio Folículo Estimulante recombinante
RHA	Reprodução Humana Assistida
r-hCG	Gonadotrofina Coriônica humana recombinante
ROS	Espermátides Redondas
ROSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermátides Redondas
SNDF	Fator de Descondensação do Núcleo Espermático
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Transferência Embrionária
TESA	Aspiração de Espermatozóides Testicular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1	ESPERMATOGÊNESE	17
1.2	INFERTILIDADE POR CAUSA MASCULINA E ICSI	18
1.2.1	Espermatozóides Epididimários e Testiculares	19
1.2.2	Azoospermia Obstrutiva e Não-Obstrutiva	19
1.3	DESENVOLVIMENTO FOLICULAR OVARIANO	20
1.4	IDADE MATERNA E FERTILIDADE	21
1.5	FERTILIZAÇÃO	22
1.5.1	Ativação Oocitária	22
1.5.2	Origem do Aumento do Cálcio Intracelular	23
1.5.3	PLC ζ (PLC-zeta)	24
1.6	ICSI E ATIVAÇÃO OOCITÁRIA	26
1.7	FALHA DE FERTILIZAÇÃO	26
1.7.1	Falha na Ativação Oocitária	27
1.8	ATIVAÇÃO OOCITÁRIA ARTIFICIAL	27
2	OBJETIVO	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	CASUÍSTICA	30

3.2	GRUPOS DE ESTUDO	32
3.3	OBTENÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES	33
3.4	ANÁLISE E PROCESSAMENTO SEMINAL	36
3.5	ESTÍMULO OVARIANO CONTROLADO	37
3.6	PREPARAÇÃO DOS OÓCITOS E ICSI	38
3.7	ATIVÇÃO OOCITÁRIA ARTIFICIAL	41
3.8	CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO E SELEÇÃO EMBRIONÁRIA	42
3.9	ASPECTOS AVALIADOS	43
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4	RESULTADOS	46
4.1	GRUPOS DE ESTUDO	46
	4.1.1 Características Gerais dos Grupos de Estudo	46
	4.1.2 Taxa de Fertilização	49
	4.1.3 Taxa de Bons Embriões	51
	4.1.4 Taxas de Implantação e Gestação	51
4.2	GRUPOS DE ESTUDO \leq 35 ANOS	54
	4.2.1 Características Gerais dos Grupos de Estudo \leq 35 Anos	54
	4.2.2 Taxa de Fertilização	57
	4.2.3 Taxa de Bons Embriões	59
	4.2.4 Taxas de Implantação e Gestação	59
4.3	GRUPOS DE ESTUDO AZOOSPERMIA	62
	4.3.1 Características Gerais do Grupo de Estudo de Azoospermia com Espermatozóides Testiculares	63

4.3.1.1	<i>Taxa de Fertilização</i>	64
4.3.1.2	<i>Taxa de Bons Embriões</i>	66
4.3.1.3	<i>Taxa de Implantação e Gestação</i>	66
4.3.2	Características Gerais do Grupo de Estudo Azoospermia Obstrutiva, com Espermatozóides Epididimários ou Testiculares quando Utilizada a AOA	69
4.3.2.1	<i>Taxa de Fertilização</i>	70
4.3.2.2	<i>Taxa de Bons Embriões</i>	71
4.3.2.3	<i>Taxa de Implantação e Gestação</i>	72
5	DISCUSSÃO	75
6	CONCLUSÕES	81
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese, complexo processo de proliferação e maturação de células germinativas masculinas, resultando na formação de espermatozóides maduros ¹, propaga-se gradual e continuamente nos túbulos seminíferos durante a vida reprodutiva dos homens; é através desse processo que o número de cromossomos é reduzido ².

Na puberdade, importantes alterações anatômicas, citológicas e funcionais acontecem nos testículos. A proliferação das células de Sertoli é bloqueada e as células de Leydig diferenciam-se e passam a produzir testosterona em resposta ao hormônio luteinizante. Além disso, as células germinativas imaturas, conhecidas como espermatogônias, localizadas próximo à membrana basal dos túbulos seminíferos, onde se proliferam por mitose, geram determinadas células filhas, que têm a proliferação mitótica bloqueada e se diferenciam em espermatócitos primários ^{3,4}. Estas células entram na prófase da primeira divisão meiótica quando o pareamento dos cromossomos homólogos permite o *crossing over*, seguido do término da primeira divisão meiótica e formação de dois espermatócitos secundários, cada um contendo 23 cromossomos duplicados ⁵.

Os dois espermatócitos secundários, descendentes do espermatócito primário, procedem para a segunda divisão meiótica, produzindo quatro espermátides, cada uma contendo o número haplóide de cada cromossomo ⁵.

À medida que forem amadurecendo, as células germinativas migram para a luz do túbulo seminífero para iniciarem a espermiogênese, processo pelo qual espermátides haplóides convertem-se em estruturas móveis. Durante essa fase, ocorre a formação da vesícula acrossomal, condensação do núcleo no espermatozóide e deposição de mitocôndrias na base do flagelo, importantes eventos para preparação do espermatozóide para a fertilização ^{2,6}. Na espécie humana, em aproximadamente 24 dias, o espermatócito completa a meiose,

formando espermatídes, sendo necessário mais cinco semanas para que estas se transformem em espermatozóides ².

A produção de espermatozóides depende de uma regulação altamente específica por expressão gênica em células germinativas, controle endócrino e parácrino da proliferação celular e suporte funcional provido pelas células de Sertoli ^{1,6,7}. Tem sido demonstrado que funções específicas necessárias para a adequada proliferação e diferenciação das células germinativas são fornecidas principalmente pelas células de Sertoli ⁴ e, possivelmente, estas células, associadas à membrana basal adjacente, criam um microambiente particular, o qual controla a renovação e diferenciação das células germinativas ⁸.

1.2 INFERTILIDADE POR CAUSA MASCULINA E ICSI

Infertilidade causada por fator masculino acomete por volta de 50% dos casais que procuram centros de Reprodução Humana Assistida (RHA) ⁹⁻¹². Desde o primeiro relato de sucesso em humanos, a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (Intracytoplasmic Sperm Injection – ICSI) tem sido particularmente indicada nos casos de alterações seminais graves ^{13, 14}.

Através desta técnica, é possível obter boas taxas de fertilização, mesmo com a recuperação de um número muito reduzido de espermatozóides do ejaculado e até mesmo dos epidídimos e testículos ¹⁵. Porém, apesar das taxas de fertilização e gravidez satisfatórias, cada vez mais a associação entre qualidade seminal e capacidade reprodutiva tem sido estabelecida.

As taxas de sucesso da ICSI foram inicialmente relatadas como independentes da qualidade seminal ¹⁶. Entretanto, estudos mais recentes têm revelado que quanto pior a qualidade seminal e mais imaturo for o espermatozóide, piores serão o prognóstico da fertilização, o desenvolvimento embrionário, a implantação e gravidez ¹⁷⁻²⁰.

Diversos estudos apontam que pacientes com alterações seminais têm maiores taxas de aneuploidia quando comparados a pacientes férteis ou àqueles sem alteração seminal ²¹⁻²⁴. Também foi verificada maior incidência de erros

epigenéticos e danos em Ácido Desoxirribonucléico (Deoxyribonucleic Acid – DNA) em espermatozóides, quer seja por apoptose abortiva ²⁵⁻²⁷, quer seja por estresse oxidativo ²⁸ ou ineficiente empacotamento nuclear ^{29, 30} em homens com alterações seminais importantes ³¹⁻³³. Este fato fica mais evidente quando comparado o comportamento de espermatozóides não-ejaculados, isto é, epididimários e testiculares.

1.2.1 Espermatozóides Epididimários e Testiculares

Ainda que tenha sido sugerido que grande parte do dano de DNA observado em espermatozóides recuperados do ejaculado resulte de alterações pós-testiculares ^{31,34,35}, foi comprovado que embriões derivados de espermatozóides testiculares apresentam pior morfologia de pró-núcleos ²⁰ e resultam em taxas de gestação mais baixas quando comparados a embriões derivados de espermatozóides epididimários ³⁶.

Um recente estudo comparou resultados de ICSI com espermatozóides testiculares e epididimários e demonstrou uma taxa maior de aborto quando foram utilizados espermatozóides testiculares, sugerindo que a imaturidade do espermatozóide proveniente do testículo pode afetar o desenvolvimento embrionário ³⁷.

O mesmo acontece na comparação de espermatozóides testiculares provenientes de homens com azoospermia não-obstrutiva, ou seja, alteração na espermatogênese, com espermatozóides de homens com azoospermia obstrutiva (pacientes vasectomizados, com obstrução de epidídimos ou deferentes, agenésia congênita dos ductos deferentes e outras causas), onde a espermatogênese é normal ³⁶.

1.2.2 Azoospermia Obstrutiva e Não-Obstrutiva

Espermatozóides testiculares de homens com azoospermia não-obstrutiva, apesar de propiciarem taxas semelhantes de fecundação e qualidade embrionária,

levam a menores taxas de implantação e gestação, assim como maiores taxas de abortamento ^{36,38}. Esse fato pode ser explicado pelo acometimento da espermatogênese em pacientes com azoospermia não-obstrutiva ^{38,39}. Calogero *et al.* ²² relataram que a taxa de aneuploidia em espermatozoides é inversamente proporcional à fase em que a espermiogênese é afetada.

No caso da azoospermia obstrutiva, ficou provado que quanto maior o tempo de obstrução, menor a viabilidade do espermatozoide recuperado e, conseqüentemente, menores são as taxas de fecundação e gestação ⁴⁰.

De fato, o número de células de Sertoli, responsáveis pela nutrição dos espermatozoides durante a espermatogênese, é definido até a puberdade ⁴¹. Assim, a razão entre o número de células de Sertoli e espermatozoides deve diminuir conforme aumenta o tempo da obstrução, indicando um suporte ineficiente para os espermatozoides nestes pacientes ⁴². Outras explicações seriam: disfunção endócrina após a obstrução ⁴³ ou até fibrose intersticial, causada pela inflamação local no caso da vasectomia ⁴⁴.

Por fim, sabe-se que apoptose é um mecanismo fisiológico extremamente importante para o controle da população de espermatozoides nos testículos ^{45,46}. Tem sido proposto que após a obstrução, a espermatogênese é prejudicada por um aumento do índice de apoptose nas células germinativas masculinas ^{47,48}.

1.3 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR OVARIANO

Durante o período embrionário, as células germinativas primordiais migram para a gônada ainda indiferenciada e, no momento em que os ovários são formados, estas células, agora denominadas oogônias, iniciam a proliferação mitótica ⁴⁹. No córtex dos ovários, as oogônias são rodeadas por células somáticas e, uma vez finalizada a proliferação mitótica, se inicia a meiose, para ser bloqueada durante a Prófase da Primeira Divisão (PI) ⁵⁰.

No nascimento, as células germinativas, já denominadas oócitos, permanecem em repouso e são rodeadas por uma única camada de células da granulosa, formando, assim, o folículo primordial ⁵¹. Uma vez estabelecida a reserva

de folículos primordiais, estes vão gradualmente deixando o grupo de folículos quiescentes, adquirindo características essenciais para o desenvolvimento futuro^{51,52}.

Pouco antes da ovulação, a meiose é retomada em resposta a um drástico aumento sérico na concentração do Hormônio Luteinizante (LH)⁵³ e é então novamente bloqueada, desta vez durante a Metáfase da Segunda Divisão (MII), permanecendo assim até a fertilização⁵⁰.

Além da progressão nuclear – de PI a MII –, a maturação oocitária envolve uma série de modificações citoplasmáticas essenciais para a fertilização e o desenvolvimento embrionário como desenvolvimento da capacidade de descondensação da cromatina do espermatozóide⁵⁴ e habilidade de liberar cálcio a partir das reservas citoplasmáticas⁵⁵.

O desenvolvimento do mecanismo de liberação de Ca^{2+} durante a maturação oocitária representa a mais importante alteração fisiológica do oócito, garantindo uma resposta apropriada ao estímulo do espermatozóide no momento da fertilização⁵⁶.

1.4 IDADE MATERNA E FERTILIDADE

A foliculogênese acontece de maneira contínua durante a vida da mulher a partir do nascimento até a menopausa. Na puberdade, a concentração sérica de gonadotrofina atinge um nível suficiente para suportar as fases finais da foliculogênese, que resulta na ovulação e formação do corpo lúteo. Caso a gestação não ocorra, a atividade cíclica do ovário é mantida mensalmente. Após a puberdade, a duração do ciclo menstrual mantém-se constante até poucos anos antes da menopausa, quando a disponibilidade de folículos torna-se reduzida e as ovulações começam a cessar⁵⁷.

Conforme o ovário envelhece, ocorre uma queda na quantidade e qualidade dos oócitos. Recentemente, foi demonstrada uma importante relação entre o diâmetro de folículos primordiais, transitórios e primários e a idade da mulher. De fato, as mais velhas (acima de 35 anos) apresentam uma redução no diâmetro folicular quando comparadas às mais jovens, sugerindo que sejam

selecionados para o recrutamento folículos maiores e, talvez, mais saudáveis durante o início da vida reprodutiva e que, com o tempo, a população de folículos restantes apresente uma redução não só no diâmetro, mas também na qualidade ⁵⁸.

Diversas teorias têm sido propostas para explicar como a idade afeta a função dos oócitos, incluindo anomalias na estrutura e função dos fusos de divisão meiótica ⁵⁹ e encurtamento de telômeros ⁶⁰. Hassold *et al.* ⁶¹ descreveram que a frequência de anormalidades cromossômicas está diretamente relacionada à idade materna e se estima que por volta da quinta década de vida, mais de 50% dos oócitos ovulados podem estar cromossomicamente comprometidos.

Tem sido descrito ainda que a queda na qualidade oocitária, com o decorrer da vida reprodutiva, está relacionada à exposição crônica a espécies reativas de oxigênio ⁶²; ao comprometimento mitocondrial ⁶³; à maior incidência de apoptose embrionária ⁶⁴ e à queda no número de quiasmas, levando à não-disjunção das cromátides ⁶⁵.

1.5 FERTILIZAÇÃO

A interação espermatozóide e óvulo envolve uma série de eventos bioquímicos e fisiológicos, tais como: reconhecimento específico, adesão e fusão entre os gametas ⁶⁶. O último estágio desse processo é a ativação oocitária, que culmina com alterações da zona pelúcida, reinício da meiose, descondensação do núcleo do espermatozóide, recrutamento de DNA materno, formação dos pró-núcleos masculino e feminino, início da síntese do DNA e clivagem ⁶⁷.

1.5.1 Ativação Oocitária

O evento-chave, essencial para a ativação oocitária, é a sinalização por íons de cálcio (Ca^{2+}). Logo após a fusão do espermatozóide e óvulo ocorre um dramático aumento na concentração de Ca^{2+} no meio intracelular, que se prolifera como uma onda através do oócito ^{68,69}. O primeiro aumento na concentração de Ca^{2+}

intracelular é seguido de uma série de picos transitórios, que caracterizam um dos processos responsáveis pelo adequado desenvolvimento embrionário ⁷⁰.

As oscilações de Ca^{2+} envolvem a ação de fatores espermáticos, capazes de induzir eventos moleculares tanto *in vivo* como *in vitro* e até mesmo depois da ICSI ⁷¹⁻⁷³. Após a fertilização, vários mecanismos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos são ativados no oócito, até então, metabolicamente quiescente. Antes da fertilização, a Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (Mitogen-Activated Protein Kinase – MAP quinase) e o Fator Promotor da Maturação (Maturation Promoting Factor – MPF) têm suas atividades elevadas e mantêm o oócito em estado de repouso, com o desenvolvimento nuclear bloqueado em MII ⁷⁴.

A atividade do MPF varia durante o desenvolvimento oocitário. Em oócitos imaturos, apresenta-se inativo, caracterizando o primeiro bloqueio durante o desenvolvimento oocitário. Durante a Metáfase I, a atividade do MPF atinge seu pico e decresce novamente durante a transição da anáfase à telófase e, finalmente, se eleva novamente na MII. Neste momento, ocorre o segundo bloqueio do desenvolvimento oocitário e a atividade do MPF mantém-se estável até a fertilização, quando começa a diminuir ⁵⁷.

Têm sido propostas interações entre a ativação por Ca^{2+} e MPF. Dupon ⁷⁵ advertiu que oscilações de Ca^{2+} seriam responsáveis pela inativação do MPF, permitindo, assim, o reinício da meiose. Além disso, a ativação por Ca^{2+} após a fertilização é aparentemente responsável pela diminuição na atividade da MAP quinase ⁷⁶.

1.5.2 Origem do Aumento do Cálcio Intracelular

O mecanismo pelo qual o espermatozóide é capaz de gerar aumento de cálcio livre no ooplasma e iniciar a cascata de ativação do oócito ainda não foi totalmente elucidado, porém algumas hipóteses têm sido discutidas.

A mais recente e aceita hipótese assinala que a fusão entre as membranas do espermatozóide e oócito permite a deposição de Fatores Citosólicos Espermáticos (FCE) no ooplasma ^{77,78}. Em mamíferos, a fusão entre as membranas

ocorre de 1 a 3 minutos antes do aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular ⁷⁹.

Assim sendo, fatores presentes no espermatozóide seriam liberados no ooplasma antes do início da ativação oocitária ⁸⁰. Além disso, extrato de espermatozóides injetados em oócitos mamíferos é capaz de induzir a ativação oocitária e desenvolvimento até o estágio de blastocisto ^{81,82}. Igualmente, diversos estudos demonstraram a geração de oscilações de Ca^{2+} após a ICSI quando o espermatozóide é totalmente liberado no interior do oócito ^{83,84}.

1.5.3 PLC- ζ (PLC-zeta)

Recentemente, foi constatado que a habilidade dos FCE em causar oscilações de Ca^{2+} pode ser explicada por uma atividade fosfolipase (phospholipase – PLC) específica do espermatozóide ⁸⁵ e tal atividade deve-se a uma PLC há pouco tempo isolada de DNA de espermátides, a PLC-zeta ^{80, 86-89}.

Diversos estudos têm indicado o inositol 1,4-5 trifosfato (inositol 1,4-5 triphosphate – IP_3) como a origem para o aumento intracelular de Ca^{2+} livre em oócitos mamíferos ^{90,92} e têm se hipotizado que o IP_3 liga-se a receptores localizados no retículo endoplasmático, causando abertura dos canais e liberação de Ca^{2+} no oolema ⁹¹⁻⁹³.

O IP_3 é produzido pela hidrólise do fosfolipídio de membrana fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) em uma reação catalisada pela PLC-zeta ⁹⁰. Desta maneira, o PIP_2 é quebrado em IP_3 e diacilglicerol (DAG); enquanto o IP_3 é capaz de liberar Ca^{2+} no citoplasma, o DAG ativa proteínas quinases, responsáveis pelo transporte de íons de sódio (Na^+) e hidrogênio (H^+), aumentando o pH oocitário (Figura 1) ^{94, 95}.

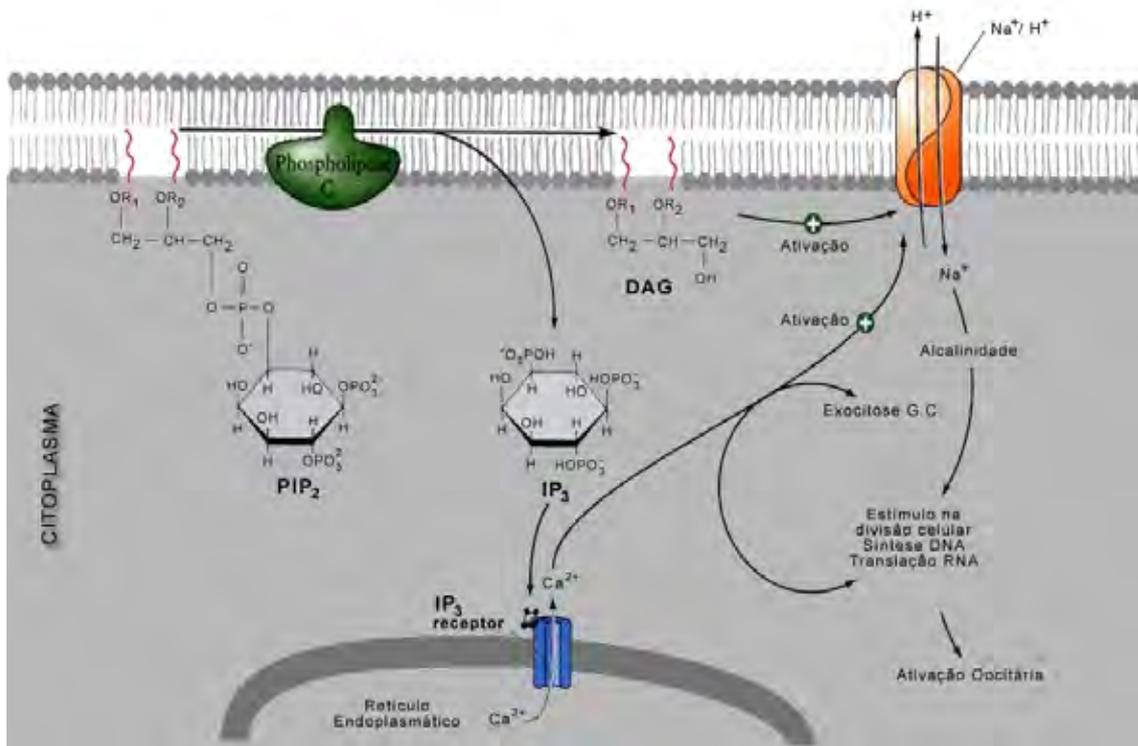


FIGURA 1 O papel do IP₃ na liberação do Ca²⁺ a partir do retículo endoplasmático

Depois deste gatilho bioquímico, ocorre uma modulação enzimática e liberação de íons, mobilizando os reservatórios de cálcio intracelular. Foi descrito que as ondas oscilatórias de propagação de Ca²⁺ são geradas por um mecanismo de *feedback* positivo, onde a ligação do IP₃ a seu receptor depende do próprio Ca²⁺ 91.

Após a fertilização, o cálcio funciona como segundo mensageiro químico e atua diretamente na inativação do MPF, desencadeando a extrusão do corpúsculo polar, reação cortical, bloqueio à polispermia, singamia e clivagem 96. Posteriormente, o cálcio induz a diminuição na atividade MAP quinase 76.

A inativação do MPF permite que o núcleo oocitário termine a segunda divisão da meiose e evita que o núcleo masculino entre em metáfase precocemente, possibilitando uma perfeita sincronia entre os mecanismos 69, 86. A diminuição na atividade da MAP quinase permite que o envelope pró-nuclear seja formado 76.

1.6 ICSI E ATIVAÇÃO OOCITÁRIA

O ICSI parece resultar respostas similares no metabolismo do cálcio no ambiente oocitário, reforçando a hipótese de que receptores de membrana são dispensáveis para a indução da ativação oocitária pelo espermatozóide ⁷¹. Quando o espermatozóide é injetado diretamente no ooplasma, o gatilho para a ativação oocitária é produzido pela própria manipulação do ooplasma ⁹⁷ e tem sido proposto que a PLC-zeta não seja liberada no ooplasma sem que a membrana espermática tenha sido, ao menos parcialmente, danificada ⁹⁸.

Uma diferença entre o ICSI e a fertilização normal é o tempo das oscilações de cálcio. Embora a primeira oscilação transitória normalmente inicie dentro de poucos minutos após a fusão espermatozóide-oócito, estas oscilações são atrasadas em aproximadamente 30 minutos na ICSI ^{83, 99}. De fato, diferentes processamentos seminiais para ICSI resultando em diferentes graus de dano na membrana do espermatozóide podem afetar o intervalo de tempo entre a injeção e o início das oscilações de Ca^{2+} ⁸³.

Da mesma forma, estudos em primatas e humanos indicam que também ocorre um atraso da descondensação da cromatina do espermatozóide após a ICSI, particularmente na porção anterior da cabeça do espermatozóide ¹⁰⁰. Este atraso pode ser explicado pelas diferenças no tempo necessário para que o oócito remova o acrossoma e os componentes da membrana espermática, permitindo a exposição da PLC-zeta no ooplasma ¹⁰¹.

1.7 FALHA DE FERTILIZAÇÃO

Apesar do contínuo desenvolvimento das técnicas de RHA nos últimos anos, o sucesso do processo de fertilização não é garantido para todos os pacientes e falha de fertilização é um problema comum ¹⁰². Tem sido sugerido que a qualidade do espermatozóide influencie drasticamente a fertilização ^{38,103,104}.

Diferentes etiologias para a falha na fertilização foram relatadas como falha na descondensação da cromatina do espermatozóide ^{102,105} e parcial ou completa incapacidade do espermatozóide iniciar a ativação do oócito ^{71, 106}.

1.7.1 Falha na Ativação Oocitária

O motivo pela falha da ativação oocitária tem sido amplamente discutido. Estudos realizados com Injeção Intracitoplasmática de Espermátides Redondas (Round Spermatid Injection – ROSI) destacam que fatores responsáveis pela ativação oocitária podem estar em quantidades insuficientes em populações específicas espermátides redondas; aparentemente, este seja um dos principais motivos que justificam o fracasso deste processo ^{107, 108}.

Foi constatado que uma porcentagem significativa de homens portadores de azoospermia não-obstrutiva apresenta focos de espermatogênese ¹⁰⁹. No entanto, Vanderzwalmen *et al.* ¹¹⁰ relatam que Espermátides Redondas (ROS), Espermátides Alongadas (ELS) ou espermatozóides provenientes de homens portadores de patologias testiculares graves não exibem núcleos suficientemente maduros e podem apresentar deficiência ou ausência da produção de fatores espermáticos e, conseqüentemente, distúrbios nas oscilações do cálcio.

É importante salientar que, na ausência da ativação do cálcio, o núcleo destas células é exposto ao MPF e a fatores citostáticos, que destroem as pontes protéicas (protaminas) dos cromossomos prematuramente, impedindo o correto desenvolvimento embrionário ¹⁰⁶.

1.8 ATIVAÇÃO OOCITÁRIA ARTIFICIAL

Diferentes técnicas para Ativação Oocitária Artificial (AOA) têm sido propostas, favorecendo o desenvolvimento de embriões até o estágio de blastocisto ^{83, 97, 111-113}.

Estudos prévios confirmam a eficácia da combinação da ICSI com a ativação oocitária artificial química ^{114, 115}, e desde então esta tem sido a técnica mais comumente utilizada no auxílio da ativação oocitária.

Durante a ativação oocitária artificial química, o aumento do cálcio intracelular pode ser induzido por reações químicas, como no caso do estrôncio ^{116, 117}, ou pelo transporte de cálcio através da membrana do retículo endoplasmático, como no caso do ionóforo de cálcio A23187 ¹¹⁸.

Diversos estudos advertem que oócitos não-fertilizados previamente por espermatozóides após a ICSI podem ser devidamente ativados com ionóforo de cálcio A23187, resultando em fertilizações, gestações e bebês saudáveis, trazendo, assim, respaldo para a sua utilização nos casos de alteração seminal ou evidência de falha de fertilização e implantação ^{105, 119-127}.

São muito poucas e recentes as evidências relatadas pela literatura sobre o comportamento de espermatozóides com anormalidades morfológicas diante da AOA com ionóforo de cálcio ¹²⁸, ou quando são utilizados espermatozóides não-ejaculados ^{129, 130}.

2 OBJETIVO

Com base no protocolo de ativação artificial em oócitos humanos através ionóforo de cálcio A23187 ¹¹⁰, este estudo teve como objetivo analisar a influência deste procedimento em casais submetidos à técnica de ICSI, com diferentes origens de espermatozoides.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no período de janeiro de 2006 a julho de 2007 nos Centros de Reprodução Humana Assistida, **Prof. Franco Júnior** – Ribeirão Preto (SP), e **Fertility – Centro de Fertilização Assistida** – São Paulo (SP).

3.1 CASUÍSTICA

Participaram do estudo 314 casais que procuraram os centros de RHA, a fim de realizarem tratamento para infertilidade conjugal, com indicação para técnicas de alta complexidade, ICSI.

Foram incluídos casais que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), concordando com os procedimentos de RHA de alta complexidade, assim como com a metodologia realizada neste estudo.

Os casais deveriam apresentar, pelo menos, uma das indicações para a utilização de AOA, que são relatadas a seguir:

- ***Oligoastenozoospermia***: Definida como concentração de espermatozóides móveis no ejaculado inferior a 5×10^6 / mL.
- ***Azoospermia***: Definida pela ausência de espermatozóides no ejaculado, cujos ciclos foram realizados utilizando-se espermatozóides obtidos a partir do epidídimo ou testículo.

Além disso, as mulheres incluídas no estudo necessariamente satisfizeram os seguintes critérios de inclusão:

- Ciclos menstruais regulares a cada 25–35 dias.
- Índice de massa corporal menor que $35 \text{ kg} / \text{m}^2$, calculado de acordo com a seguinte fórmula: peso do corpo (kg) / altura x altura (m^2).
- Presença de ambos os ovários.
- Não possuíam anomalia pélvica e/ou uterina clinicamente significativa.
- Citologia cervical normal.
- Caso tivessem tido ciclos de estimulação anterior, aguardaram, no mínimo, 60 dias para desintoxicação, antes do início do ciclo de tratamento atual.
- FSH sérico dentro dos limites da normalidade ($\leq 10 \text{mU} / \text{mL}$).
- Forneceram, voluntariamente, por escrito o TCLE, antes de qualquer procedimento relacionado ao estudo.

Foram excluídos do estudo casais que apresentaram quaisquer das seguintes características:

- Doença sistêmica clinicamente significativa.
- Estarem reconhecidamente infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).
- Estarem reconhecidamente infectados pelo vírus da hepatite C.

- Teste positivo para antígenos de superfície da hepatite B.
- Condição médica que possa interferir no bem-estar físico ou emocional do casal ou de cada cônjuge.
- Endometriose grau III – IV (classificação da American Society for Reproductive Medicine).
- Hidrossalpinge, unilateral ou bilateral.
- Sangramento ginecológico anormal, não-diagnosticado.
- Alergia ou hipersensibilidade a preparados de gonadotrofinas humanas ou quaisquer outros medicamentos relacionados ao estudo.

3.2 GRUPOS DE ESTUDO

Foram analisados 314 ciclos de ICSI, divididos em grupos, de acordo com a origem do espermatozóide utilizado para a ICSI. Ciclos em que faltavam dados essenciais a este estudo foram excluídos, e os grupos de estudo foram estabelecidos conforme descrito a seguir.

- **Grupo EJACULADO:** 92 casais submetidos a ciclos de ICSI com espermatozoides ejaculados.
- **Grupo EPIDIDIMÁRIO:** 82 casais submetidos a ciclos de ICSI com espermatozoides epididimários, coletados por Punção Percutânea de Espermatozoides Epididimários (Percutaneous Epididymum Sperm Aspiration – PESA).

- **Grupo TESTICULAR:** 140 casais submetidos a ciclos de ICSI com espermatozoides testiculares coletados por Aspiração de Espermatozoides Testicular (Testicular Sperm Aspiration – TESA).

Cada grupo de estudo foi ainda organizado em subgrupos, dependendo da realização (Subgrupo **AOA**) ou não de AOA (Subgrupo **Controle – CT**). Os ciclos foram pareados em cada subgrupo para idade das mulheres e número de oócitos obtidos. A Tabela 1 demonstra a composição dos grupos e subgrupos incluídos neste trabalho.

TABELA 1 Distribuição das pacientes nos grupos e subgrupos de estudo

Grupos	EJACULADO	EPIDIDIMÁRIO	TESTICULAR	Total
AOA	46	41	70	157
CT	46	41	70	157
Total	92	82	140	314

3.3 OBTENÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES

De acordo com a indicação de cada casal, os espermatozoides foram obtidos a partir de amostras de sêmen ejaculado ou pelas técnicas cirúrgicas de recuperação de espermatozoides epididimários (PESA) ou testiculares (TESA).

– **Grupo EJACULADO**

As amostras de sêmen ejaculado foram obtidas por masturbação, após três a cinco dias de abstinência ejaculatória, coletadas em frasco plástico e estéril e enviadas para análise e processamento seminal.

– **Grupo EPIDIDIMÁRIO**

O procedimento de PESA foi realizado no mesmo dia da punção folicular, sob anestesia local (2mL de lidocaína 1% sem adrenalina no plexo pampiniforme). Resumidamente, a técnica foi realizada da seguinte forma: após a localização do epidídimo, uma agulha de 27 *gauge*, conectada à seringa de 1mL preenchida com meio de cultura (Hepes – Irvine, EUA), foi introduzida na região proximal do epidídimo e leves sucções foram efetuadas (Figura 2). A amostra recuperada foi colocada em placa de Petri para a busca de espermatozóides através de microscópio óptico em aumento de 400x.

Após a verificação da presença de espermatozóides, a amostra foi lavada, através da adição de meio de cultura (Hepes – Irvine, EUA), e feita a centrifugação a 800g por 20 minutos. O precipitado foi então ressuscitado em 0,5mL de meio de cultura (Hepes – Irvine, EUA) e enviado ao laboratório de fertilização *in vitro* para realização da técnica de ICSI.



FIGURA 2 Procedimento cirúrgico para recuperação de espermatozóides epididimários (PESA)

– **Grupo TESTICULAR**

O procedimento de TESA foi realizado no mesmo dia da punção folicular, sob anestesia local (2mL de lidocaína 1% sem adrenalina no plexo pampiniforme). Resumidamente, para a recuperação de espermatozóides testiculares, o testículo foi imobilizado e a bolsa testicular mantida sob tensão, para que a profundidade da incisão pudesse ser controlada e o epidídimo protegido de lesões.

Com o auxílio de uma agulha de 21 *gauge* do tipo borboleta, conectada a uma seringa de 5mL, foram realizadas repetidas inserções perpendiculares no pólo superior do testículo, sob pressão negativa, até que um fluido amarelo opaco e/ou tecido fosse visualizado na cânula do sistema. Em seguida, a cânula foi clampeada, a fim de manter a pressão negativa e, com o auxílio de pinças, parte do túbulo seminífero foi retirada (Figura 3).

A amostra recuperada foi colocada em placa de Petri e com auxílio de agulhas, o tecido foi dissecado, seguido da pesquisa de espermatozóides através de microscópio óptico, em aumento de 400x. Após a verificação da presença de espermatozóides, os mesmos foram coletados com pipeta Pasteur e a amostra, lavada, com adição de 2,0mL meio de cultura (Hepes – Irvine, EUA), seguida de centrifugação a 800g por 20 minutos. O precipitado foi então ressuspenso em

0,5mL de meio de cultura (Hepes – Irvine, EUA) e enviado ao laboratório de fertilização *in vitro* para realização da técnica de ICSI.



FIGURA 3 Procedimento cirúrgico para obtenção de espermatozóides testiculares (TESA)

3.4 ANÁLISE E PROCESSAMENTO SEMINAL

As amostras de sêmen ejaculado foram submetidas à análise seminal, de acordo com protocolos estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde, 1999 ¹³¹. Foram obtidas, então, a concentração de espermatozóides por 1mL e a porcentagem de espermatozóides móveis presentes na amostra.

Após análise seminal completa, foi realizado protocolo de processamento seminal pelas técnicas de gradiente descontínuo de densidade ou migração ascendente de espermatozóides, conforme indicações estabelecidas no I Consenso de Infertilidade Masculina ¹³², para recuperação de espermatozóides móveis a serem utilizados na técnica de ICSI.

Para a realização do gradiente descontínuo de densidade, foram utilizadas três camadas de *Isolate* (Irvine Scientific, EUA), em volume de 0,5mL cada, nas densidades de 95%, 70% e 50%. Foi adicionado 1,0mL da amostra seminal sobre as camadas de *Isolate* (Irvine Scientific, EUA) e centrifugado por 20 minutos a 800g. O precipitado contendo os espermatozóides foi ressuspensionado em 2,0mL de meio de cultura (Hepes – Irvine, EUA), lavado através de centrifugação por 8 minutos a 800g

e novamente ressuspendido em 0,5mL de meio de cultura (Hepes – Irvine, EUA). A amostra recuperada foi enviada ao laboratório de fertilização *in vitro* para utilização da técnica de ICSI.

Para a técnica de migração ascendente de espermatozoides, a amostra de sêmen foi lavada, adicionando-se o mesmo volume de meio de cultura (Hepes – Irvine, EUA) e centrifugada por 8 minutos a 800g. O precipitado foi coletado e adicionado a 1mL de meio de cultura (Hepes – Irvine, EUA) e incubado por uma hora a 37°C, com o tubo inclinado a 45°. Após este período, foi retirado 0,5mL do sobrenadante e enviado ao laboratório de fertilização *in vitro* para utilização dos espermatozoides recuperados na técnica de ICSI.

3.5 ESTÍMULO OVARIANO CONTROLADO

Para o Estímulo Ovariano Controlado (EOC), as pacientes foram submetidas ao protocolo longo convencional descrito no I Consenso de Indução de Ovulação em Reprodução Assistida¹³³, indicado para pacientes em procedimentos de alta complexidade em RHA.

O bloqueio hipofisário foi atingido com análogo agonista do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (Gonadotrophin Releasing Hormone – GnRH, Lupron Kit™, Abbott S.A Société Française des Laboratoires, Paris, França) seguido por EOC, com administração de Hormônio Folículo Estimulante recombinante (recombinant Follicular Stimulationg Hormone – r-FSH, Gonal-F®, Serono, Genebra, Suíça) em dose inicial de 225 – 300UI e ajustes de dose de acordo com a resposta de cada paciente.

A indução da ovulação foi acompanhada por dosagens séricas de estradiol e ultra-sonografias seriadas; quando o folículo dominante atingiu diâmetro de 18mm ou, pelo menos, dois folículos alcançaram de 16 a 18mm em diâmetro, foram administrados 250µg de Gonadotrofina Coriônica humana recombinante (recombinant human Corionic Gonadotrophin – r-hCG, Ovidrel™, Serono, Genebra, Suíça) para maturação folicular final. A punção folicular foi realizada 34 a 36 horas após a administração do r-hCG (Figura 4).

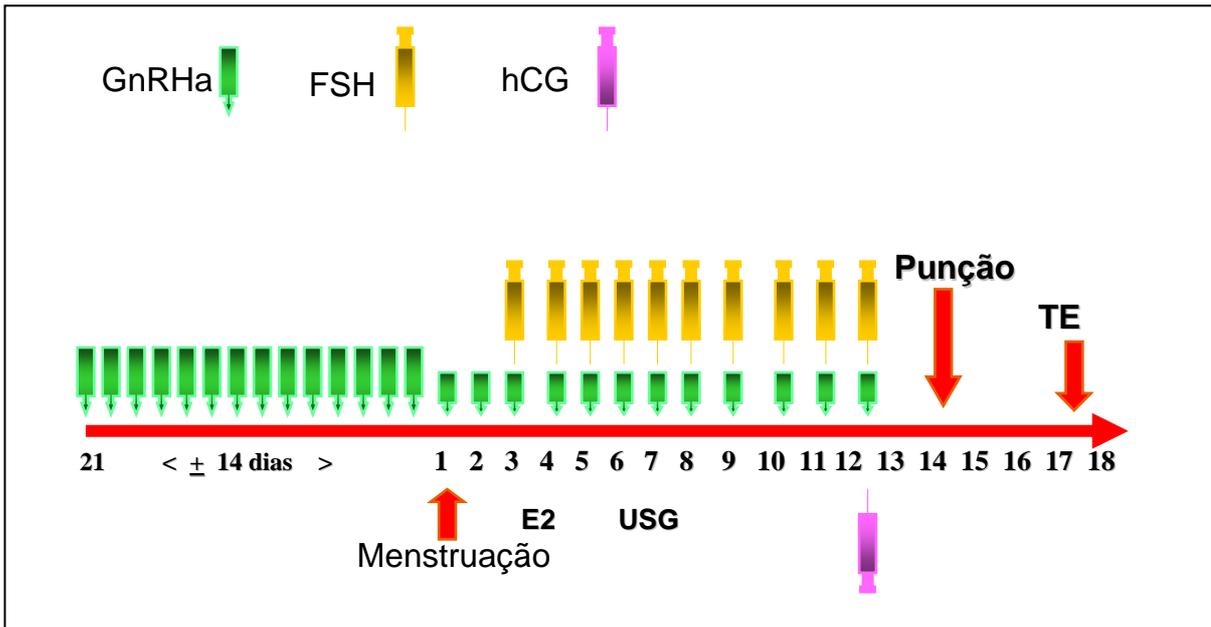


FIGURA 4 Esquema descritivo da estimulação ovariana e desenvolvimento folicular

3.6 PREPARAÇÃO DOS OÓCITOS E ICSI

Placas de pré-incubação (placas de Petri, 60 x 15mm) foram preparadas com 8 gotas de 100 μ L de meio de cultura embrionária constituído por Fluido de Tuba Uterina Humano (Human Tubal Fluid –HTF, Irvine, EUA), suplementado com 15% de Albumina Sérica Humana (Human Seric Albumin – HSA; Irvine, EUA) não-tamponado, cobertas com 15mL de óleo mineral (Ovoil; Vitrolife, Suíça) previamente equilibrado para temperatura e pH (Figura 5).

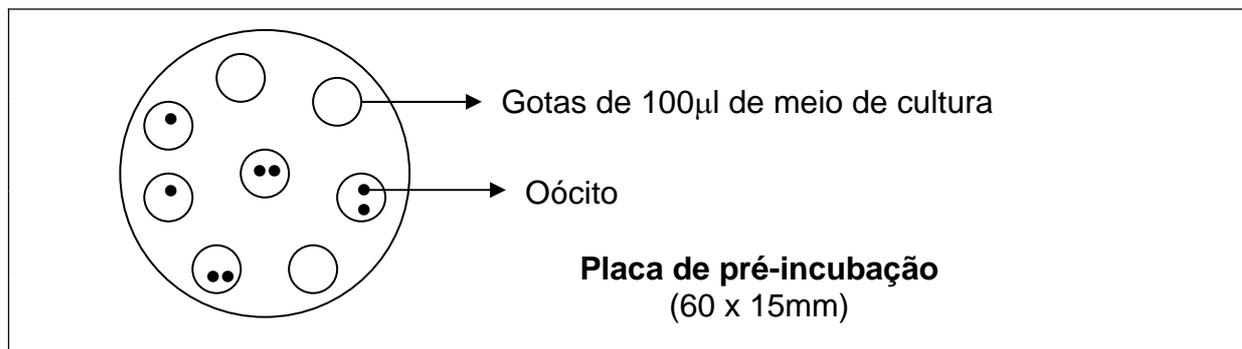


FIGURA 5 Placas de pré-incubação – 8 gotas de 100µL de meio de cultura HTF (Irvine, EUA), suplementado com 15% de Albumina Sérica Humana (Human Seric Albumin – HSA; Irvine, EUA), cobertas com 15mL de óleo mineral (Ovoil; Vitrolife, Suíça) previamente equilibrado para temperatura e pH

Após a punção, recuperação e classificação, os oócitos permaneceram a 37°C, com 5% CO₂, por um período de duas a quatro horas nas placas de pré-incubação, colocando-se até três oócitos por gota. Em seguida, realizou-se a desnudação dos oócitos. Para tanto, os mesmos foram expostos a hialuronidase (gotas de 100µL de meio de cultura Hepes tamponado, contendo 80UI/mL de hialuronidase – Irvine, EUA) por 30 segundos e imediatamente lavados em meio de cultura embrionária. Em seguida, a retirada total das células do complexo cumulus-corona foi realizada mecanicamente através de repetidas pipetagens, utilizando-se pipetas Pasteur de diâmetros decrescentes.

Os oócitos foram então classificados quanto à maturação, baseado na presença do corpúsculo polar e vesícula germinativa. Aqueles que liberaram o primeiro corpúsculo polar foram considerados maduros (MII – Metáfase II). Os oócitos imaturos foram classificados em Prófase I (PI) ou Metáfase I (MI), dependendo da visualização ou não da vesícula germinativa, respectivamente. Somente oócitos MII foram utilizados para a técnica de ICSI.

Placas para ICSI (placas de Petri – 60 x 15mm) foram preparadas com seis gotas de 4µL de meio Hepes tamponado (Irvine, EUA), onde foi colocado um oócito por gota, uma gota central de 4µL de PVP (polivinilpirrolidona; Irvine, EUA), na qual foram adicionados 2µL da amostra de espermatozóides a serem injetados e uma gota reserva de PVP (polivinilpirrolidona; Irvine, EUA), sem adição de

espermatozoides. As gotas foram cobertas por 15mL de óleo mineral (Ovoil; Vitrolife, Suíça) equilibrado previamente para temperatura e pH (Figura 6).

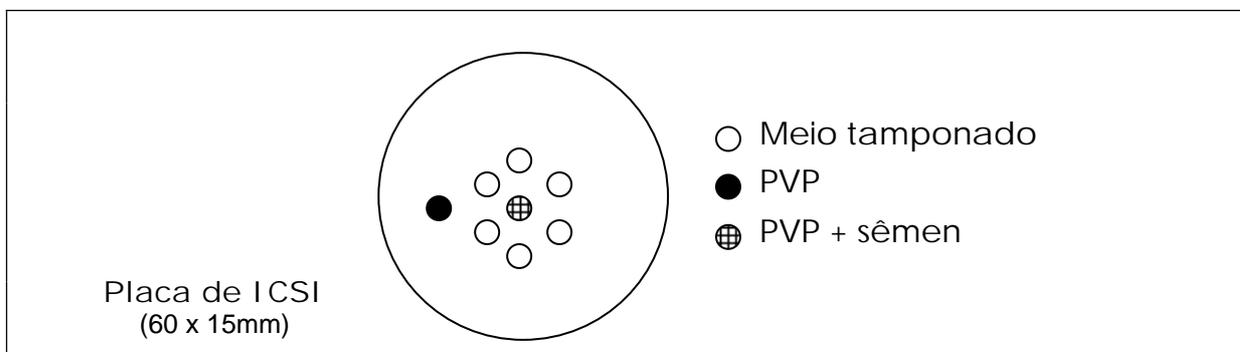


FIGURA 6 Placas de ICSI – 4 μ L de meio Hepes tamponado (Irvine, EUA), onde foi colocado um oócito por gota, e uma gota central de 4 μ L de PVP (polivinilpirrolidona; Irvine, EUA), na qual foram adicionados 2mL da amostra de espermatozoides a serem injetados. As gotas foram cobertas por 15mL de óleo mineral (Ovoil; Vitrolife, Suíça) previamente equilibrado para temperatura e pH

A ICSI foi realizada de acordo com a técnica-padrão descrita por Palermo *et al.*¹³. Após a injeção, cada oócito foi colocado em uma gota de 100 μ L de meio de cultura embrionária, contendo quatro gotas de HTF cobertas com 5mL de óleo mineral previamente equilibrado para temperatura e pH (Figura 7).

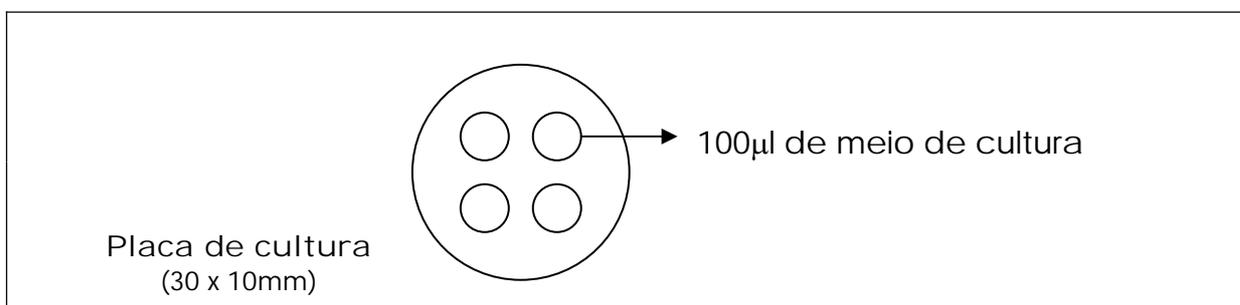


FIGURA 7 Placas de cultura embrionária – 100 μ L de meio de cultura embrionária, onde foi colocado um oócito injetado por gota, coberta por 5mL de óleo mineral (Ovoil; Vitrolife, Suíça) previamente equilibrado para temperatura e pH

3.7 ATIVAÇÃO OOCITÁRIA ARTIFICIAL

Para ativação oocitária artificial foi utilizado ionóforo de cálcio (4-bromo calcium ionophore A23187 – Sigma B7272, EUA).

– **Solução estoque ionóforo de cálcio**

Um miligrama de ionóforo de cálcio (4-bromo calcium ionophore A23187 – Sigma B7272, EUA) foi diluído em 50 μ L de DMSO (Dimethyl Sulfoxide; Sigma, EUA) e alíquotas de 5 μ L foram armazenadas entre -10 e -20°C .

– **Meio de cultivo para ativação oocitária artificial**

Imediatamente antes do uso, o meio de cultivo para AOA foi preparado pela adição de 5 μ L de solução estoque de ionóforo de cálcio em 0,5mL de HTF (Human tubal fluid, Irvine, EUA) não-tamponado, suplementado com 15% de HSA (Human Seric Albumin; Irvine, EUA), resultando em uma concentração de 5 μ M de ionóforo de cálcio.

– **Metodologia da AOA**

Após a ICSI, oócitos pertencentes ao grupo em que se aplicou a AOA foram mantidos em meio de cultivo para AOA por 30 minutos a 37°C e 5% CO_2 . Em seguida, os mesmos foram transferidos para gotas individuais na placa de cultura embrionária e cultivados como de rotina.

3.8 CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO E SELEÇÃO EMBRIONÁRIA

No primeiro dia de desenvolvimento (D + 1), realizou-se a checagem da fertilização aproximadamente 20 horas após a ICSI. A presença de dois Pró-Núcleos (PN) caracterizou a ocorrência de fertilização normal. Em relação à qualidade dos embriões neste momento, aqueles que apresentaram PN polarizados com número e tamanho de nucléolos não-discrepantes foram considerados normais. Embriões que manifestaram qualquer característica discrepante foram então classificados como anormais.

Ainda no primeiro dia de desenvolvimento, de 26 a 30 horas após a ICSI, os embriões foram novamente analisados para checagem da primeira clivagem (avaliação da clivagem precoce). A presença de duas células determinou a ocorrência da primeira clivagem.

Classificações morfológicas em relação ao número de células, multinucleação, simetria dos blastômeros e porcentagem de fragmentação foram os principais parâmetros avaliados no segundo e terceiro dias de desenvolvimento embrionário. Foram considerados bons embriões no segundo dia de desenvolvimento aqueles que apresentaram de dois a quatro blastômeros regulares e fragmentação até 20% e no terceiro dia de desenvolvimento, seis a dez blastômeros regulares e fragmentação até 20%.

A classificação embrionária foi realizada utilizando-se o mesmo padrão para todos os ciclos, incluindo documentação fotográfica de todos os oócitos e embriões, minimizando, assim, a ocorrência de qualquer falha na interpretação da qualidade dos mesmos.

A Transferência Embrionária (TE) foi realizada no terceiro dia de desenvolvimento, guiada por ultra-sonografia, sendo transferido de um a quatro embriões. A gestação foi confirmada, bioquimicamente, pela dosagem de hCG sérico 12 dias após a TE e, clinicamente, pela observação de batimento cardíaco embrionário através de ultra-sonografia quatro semanas após a TE.

3.9 ASPECTOS AVALIADOS

Para cada grupo experimental, os aspectos descritos a seguir foram comparados entre os Subgrupos AOA e CT. Em seguida, as mesmas análises foram realizadas levando-se em conta a idade da mulher, ou seja, foram avaliados apenas ciclos nos quais as mulheres tinham até 35 anos.

A análise dos grupos, considerando a idade da mulher, foi realizada a fim de excluir o fator de infertilidade feminino acarretado pela idade reprodutiva avançada (maior que 35 anos), o qual poderia interferir nos resultados obtidos.

Para tanto, foram avaliados os seguintes critérios:

- **Taxa de fertilização normal:** Relação entre o número de zigotos normais formados no momento da checagem da fertilização (2 PN) e o número de oócitos injetados.
- **Taxa de falha parcial de fertilização:** Relação entre o número de oócitos não-fertilizados no momento da checagem da fertilização e o número de oócitos injetados e intactos.
- **Porcentagem de bons embriões no dia da transferência (D + 3):** Relação entre o número de bons embriões, baseado nas características morfológicas, e o número total de embriões formados.
- **Taxa de implantação:** Número de sacos gestacionais observados por ultrasonografia em relação ao número de embriões transferidos para cada paciente.
- **Taxa de gestação total:** Número de gestações obtidas em relação ao número de ciclos em que houve transferência embrionária.

- **Taxa de gestação continuada:** Número de gestações obtidas, excluindo os casos de abortamento, em relação ao número de ciclos em que houve transferência embrionária.
- **Taxa de Abortamento:** Número de casos de abortamento, até vinte semanas de gestação, em relação ao número de gestações.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação dos resultados deste estudo foi composta por análises descritiva e estatística. A descritiva trouxe o perfil demográfico das pacientes incluídas no estudo, assim como as características gerais dos ciclos de RHA realizados, apresentando médias e desvios-padrão em cada grupo de estudo e, quando aplicável, comparado-os através da análise de médias.

Para a comparação dos resultados de interesse foram realizadas análises entre os Subgrupos AOA e CT, para cada grupo de estudo: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR.

Os dados numéricos foram submetidos ao teste de *Kurtosis* para verificação de normalidade em relação à distribuição. Quando os valores obtidos estavam entre -2 e $+2$, os teste paramétricos foram aplicados nos dados brutos; por outro lado, quando os valores do teste de *Kurtosis* extrapolavam -2 ou $+2$, indicando que os dados não apresentavam distribuição normal, foi aplicado o logaritmo na base 10 e, subseqüentemente, realizada análise estatística, utilizando-se testes paramétricos.

Os grupos foram pareados para a idade das mulheres e número de oócitos recuperados. Para isso, cada paciente no grupo AOA foi pareada com outra no grupo-controle, apresentando a mesma idade ± 2 anos e o mesmo número de oócitos recuperados, ou seja, ± 2 .

Para a análise de médias, comparando subgrupos dois a dois (AOA *versus* CT), utilizou-se o teste *t de Student pareado*. As variáveis categóricas foram dispostas em tabelas de contingência 2 por 2 e avaliadas pelos testes *Chi-quadrado*

ou *Exato de Fisher*. As variáveis taxas de gestação total, gestação continuada e aborto foram ainda analisadas por regressão logística binária e calculados a razão de chance (*Odds Ratio = OR*) e o Intervalo de Confiança (IC – 95%). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 GRUPOS DE ESTUDO

A seguir estão descritas as características gerais dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR e a comparação entre os Subgrupos AOA e CT para avaliação da similaridade entre os mesmos.

4.1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GRUPOS DE ESTUDO

O Grupo EJACULADO foi composto por 92 ciclos, subdivididos nos Subgrupos AOA (n = 46) e CT (n = 46), que apresentavam uma das indicações para AOA, ou seja, concentração de espermatozóides móveis inferior a 5×10^6 / mL.

As características gerais dos Subgrupos estão dispostas na Tabela 2 e se pôde perceber que os mesmos são similares em relação às idades das mulheres e dos homens, ao número de folículos e oócitos recuperados, à taxa de recuperação de oócitos (relação entre o número de oócitos recuperados e o de folículos puncionados) e às características seminais, tais como: concentração e porcentagem de espermatozóides móveis.

TABELA 2 Características gerais do Grupo EJACULADO

Grupos	AOA	CT	P
Número de ciclos	46	46	
Idade mulher – anos (média ± DP)	34,43 (05,51)	34,26 (05,54)	0,118
Idade homem – anos (média ± DP)	39,79 (08,71)	38,87 (07,85)	0,615
Nº de folículos (média ± DP)	11,24 (09,97)	11,33 (10,94)	0,892
Nº de oócitos (média ± DP)	6,91 (06,98)	7,41 (07,21)	0,196
Taxa de recuperação de oócitos	58,33%	63,12%	0,185
Concentração de espermatozóides (milhões / mL)	2,40 (02,01)	2,07 (01,76)	0,647
Porcentagem de espermatozóides móveis	67,81%	62,29%	0,440

AOA: Ativação Oocitária Artificial; CT: Controle; DP: Desvio-Padrão

O Grupo EPIDIDIMÁRIO foi composto por 82 ciclos, subdivididos em AOA (n = 41) e CT (n = 41), nos quais os homens apresentavam azoospermia obstrutiva pelas seguintes etiologias: vasectomia (84,15%), agenesia congênita dos deferentes (10,98%), causas neurológicas (2,44%), genéticas (1,22%) e inflamatórias (1,22%).

Pôde-se observar que os Subgrupos foram comparáveis em relação às idades das mulheres e dos homens, ao número de folículos e oócitos recuperados e à taxa de recuperação de oócitos (Tabela 3).

TABELA 3 Características gerais do Grupo EPIDIDIMÁRIO

Grupos	AOA	CT	P
Número de ciclos	41	41	
Idade mulher – anos (média ± DP)	31,59 (04,82)	31,76 (05,00)	0,255
Idade homem – anos (média ± DP)	43,82 (06,97)	46,09 (07,09)	0,206
Nº de folículos (média ± DP)	19,83 (12,14)	20,39 (12,01)	0,665
Nº de oócitos (média ± DP)	12,66 (08,33)	14,61 (08,71)	0,303
Taxa de recuperação de oócitos	65,29%	72,55%	0,093

AOA: Ativação Oocitária Artificial; CT: Controle; DP: Desvio-Padrão

Em relação ao Grupo TESTICULAR, o mesmo foi constituído por 140 ciclos, sendo 70 no Subgrupo AOA e 70 no CT, cujos homens apresentavam azoospermia obstrutiva (46,43%) ou não-obstrutiva (53,57%). As azoospermias obstrutivas tiveram como etiologia: vasectomia (56,92%), causas neurológicas (21,53%), genéticas (10,77%), agenesia congênita dos deferentes (6,16%) e disfunção sexual (4,62%). Entre as azoospermias não-obstrutivas, as etiologias foram: disfunção testicular primária (65,33%), distopia testicular (10,66%), orquite (9,34%), causas genéticas (5,34%), medicamentosas (2,66%), trauma (5,34%) e neoplasia (1,33%).

Pôde-se perceber que no Grupo TESTICULAR houve diferença significativa em relação às idades dos homens. Entretanto, ambas as médias estão abaixo de 45 anos e, portanto, a diferença torna-se clinicamente irrelevante. Os outros parâmetros avaliados foram semelhantes (Tabela 4).

TABELA 4 Características gerais do Grupo TESTICULAR

Grupos	AOA	CT	P
Número de ciclos	70	70	
Idade mulher – anos (média ± DP)	34,36 (4,19)	34,16 (4,86)	0,172
Idade homem – anos (média ± DP)	38,49 (6,33)	42,28 (8,01)	0,006
Nº de folículos (média ± DP)	17,61 (9,72)	18,30 (9,90)	0,604
Nº de oócitos (média ± DP)	13,37 (7,49)	13,60 (7,80)	0,597
Taxa de recuperação de oócitos	76,29%	75,70%	0,826

AOA: Ativação Oocitária Artificial; CT: Controle; DP: Desvio-Padrão

4.1.2 TAXA DE FERTILIZAÇÃO

Foram comparadas entre os Subgrupos AOA e CT as taxas de fertilização normal, calculadas pela relação entre o número de oócitos fertilizados apresentando 2 PNs e o número de oócitos submetidos à ICSI. A taxa de falha parcial de fertilização foi calculada pela razão entre o número de oócitos não-fertilizados e o número de oócitos submetidos à ICSI.

Em cada grupo de estudo (EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR), tais taxas mostraram-se semelhantes entre os Subgrupos AOA e CT, independentemente da origem do espermatozóide (Figuras 8 e 9).

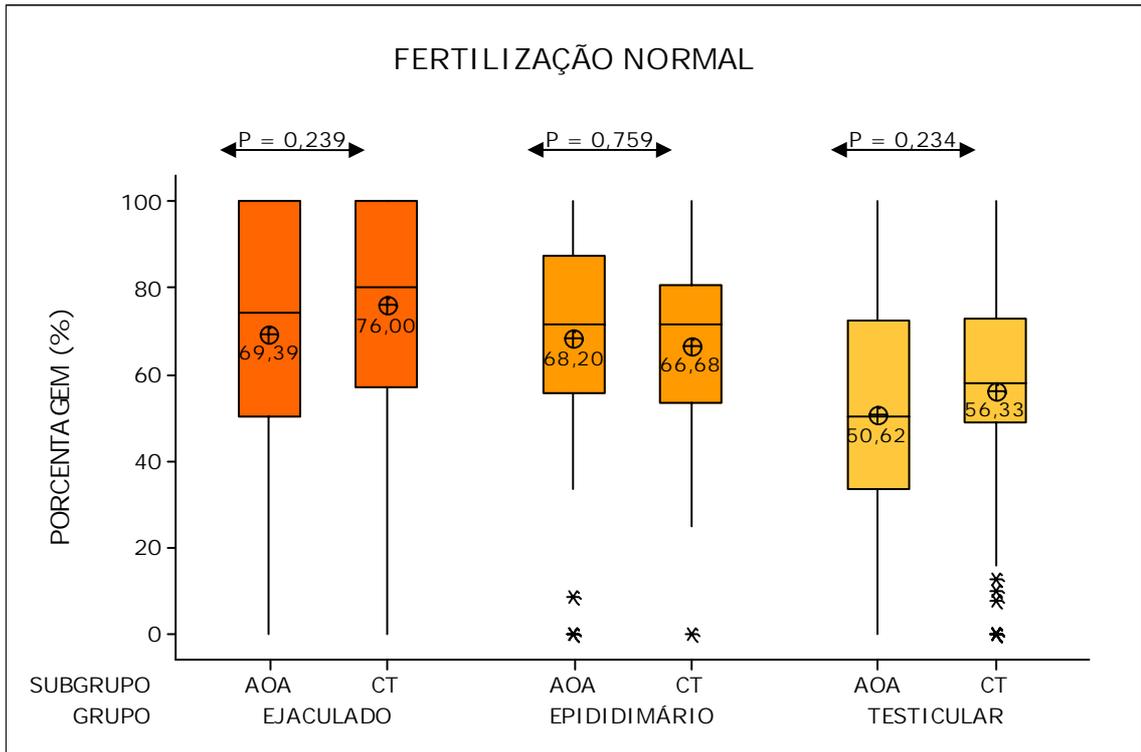


FIGURA 8 Fertilização normal, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR

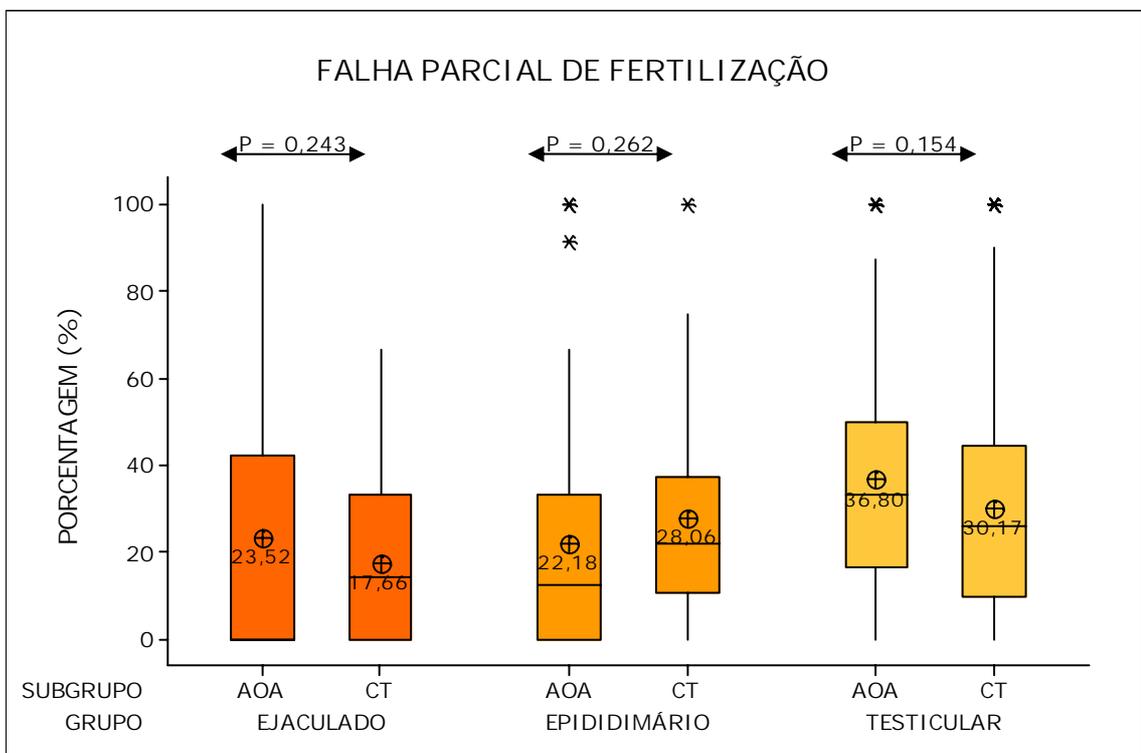


FIGURA 9 Falha parcial de fertilização, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR

4.1.3 TAXA DE BONS EMBRIÕES

Esta taxa foi calculada a partir da razão entre o número de embriões de boa qualidade e o número total de embriões obtidos, baseando-se nas características morfológicas dos mesmos (Figura 10).

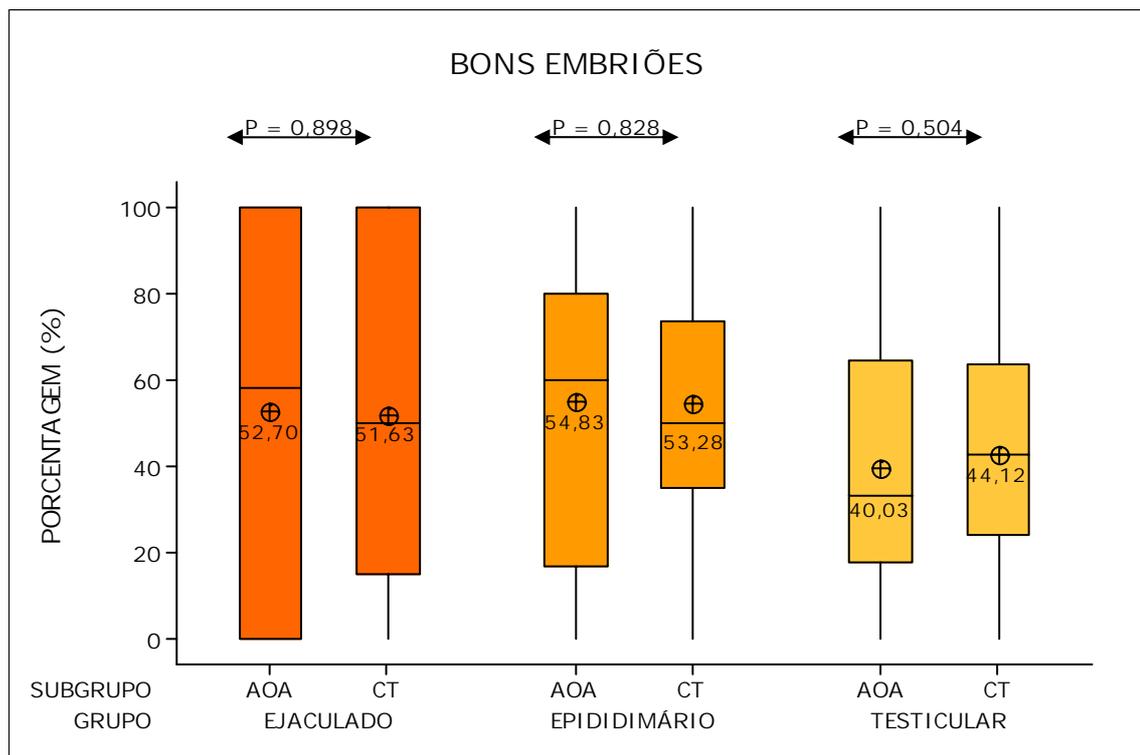


FIGURA 10 Bons embriões, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR

4.1.4 TAXAS DE IMPLANTAÇÃO E GESTAÇÃO

Foram transferidos de um a quatro embriões por paciente. Não houve diferenças entre os subgrupos em relação ao número de embriões transferidos: EJACULADO (AOA: $1,71 \pm 0,96$; CT: $2,03 \pm 1,17$; $P = 0,142$), EPIDIDIMÁRIO (AOA: $2,51 \pm 1,31$; CT: $2,51 \pm 1,20$; $P = 1,000$) e TESTICULAR (AOA: $2,23 \pm 1,10$; CT: $2,51 \pm 1,30$; $P = 0,226$).

Foram então analisados os resultados clínicos dos ciclos de ICSI através das taxas de implantação (Figura 11), da gestação total e continuada (Figura 12) e do aborto (Figura 13), tendo sido comparáveis nos Subgrupos AOA e CT nos três grupos de estudo.

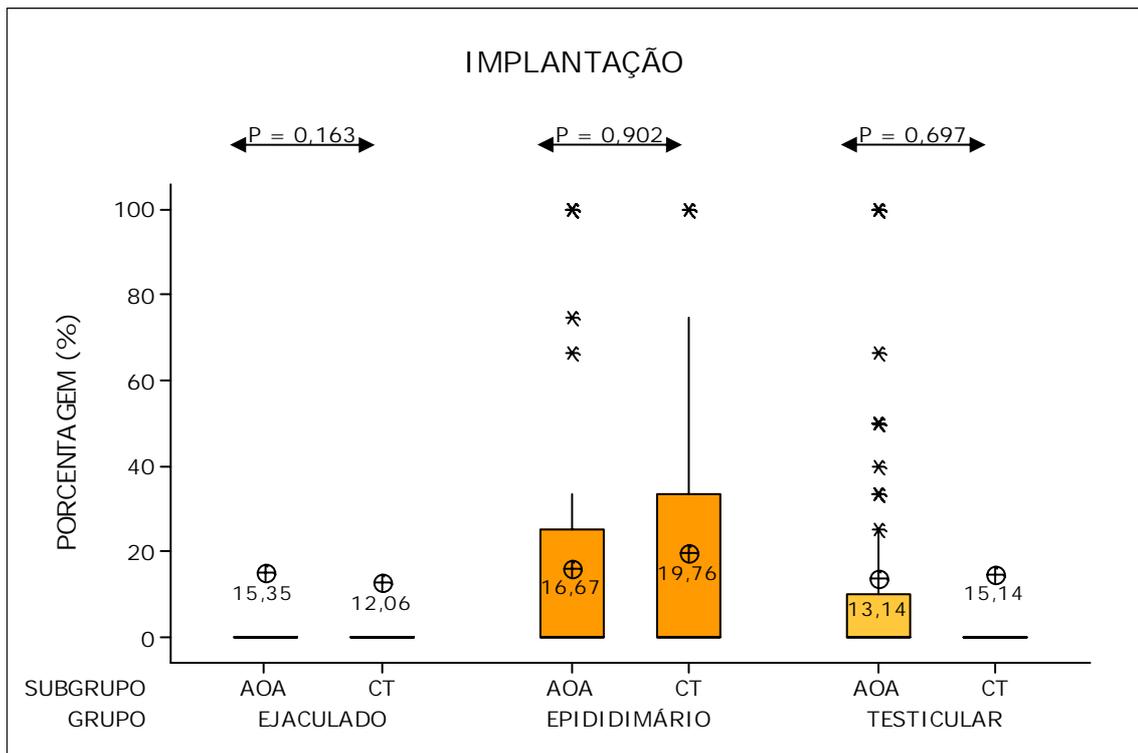


FIGURA 11 Implantação, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR

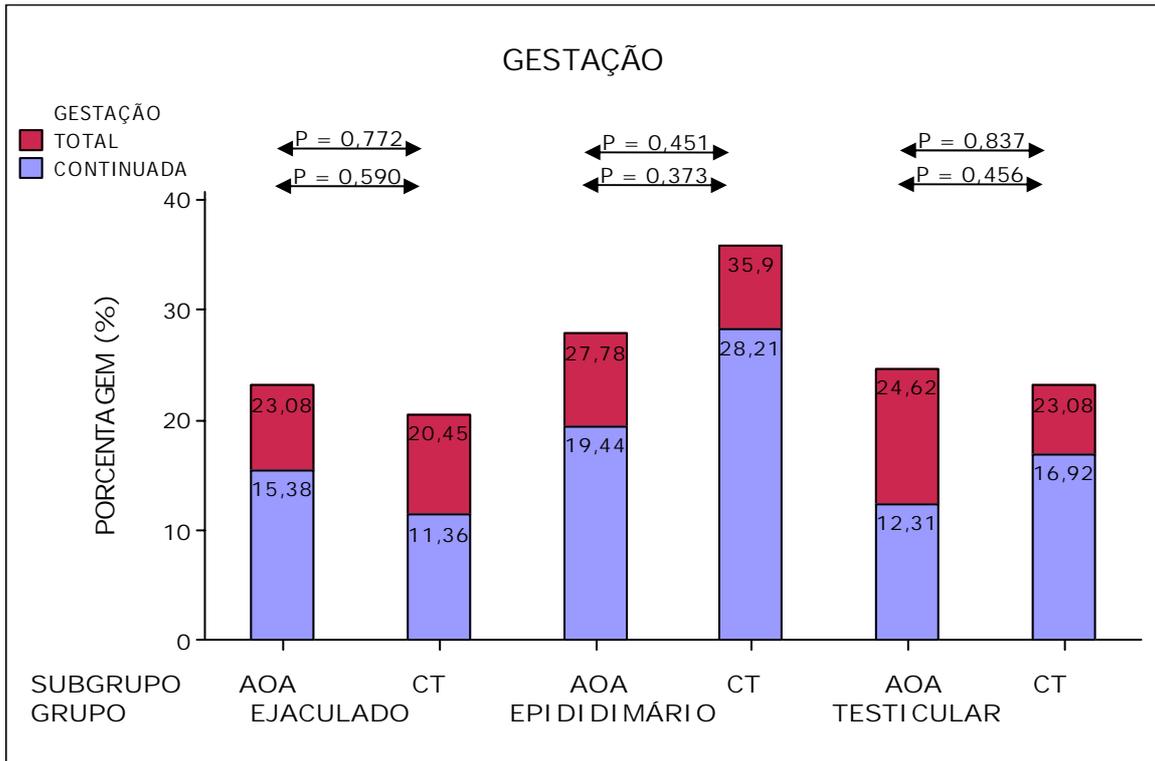


FIGURA 12 Gestação total e continuada, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR

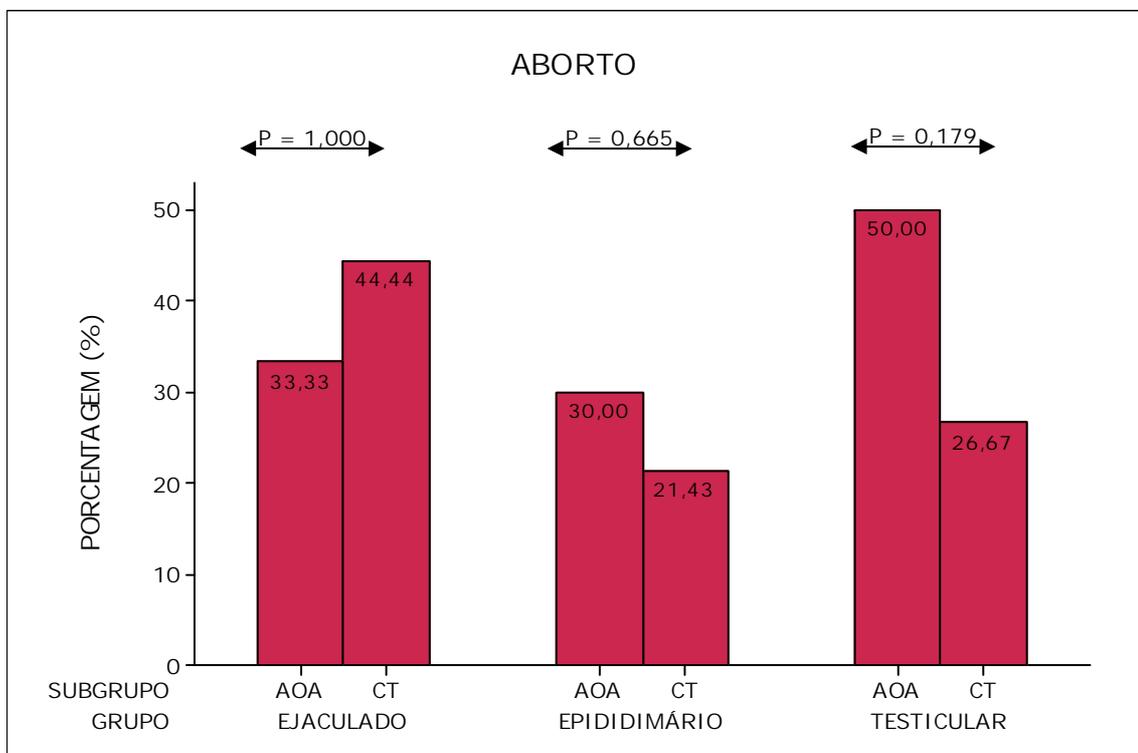


FIGURA 13 Abortamento, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR

Ainda em relação aos resultados clínicos, foi calculada o *OR* para os grupos estudados. Os resultados obtidos em cada um deles foram:

- **EJACULADO:** Gestação total (*OR* = 0,86; IC 95% = 0,30 – 2,44; *P* = 0,772), gestação continuada (*OR* = 0,71; IC 95% = 0,20 – 2,52; *P* = 0,591) e aborto (*OR* = 1,6; IC 95% = 0,24 – 10,81; *P* = 0,630).
- **EPIDIDIMÁRIO:** Gestação total (*OR* = 1,46; IC 95% = 0,55 – 3,88; *P* = 0,452), gestação continuada (*OR* = 1,63; IC 95% = 0,55 – 4,80; *P* = 0,377) e aborto (*OR* = 0,64; IC 95% = 0,10 – 4,09; *P* = 0,634).
- **TESTICULAR:** Gestação total (*OR* = 0,92; IC 95% = 0,41 – 2,06; *P* = 0,837), gestação continuada (*OR* = 1,45; IC 95% = 0,54 – 3,88; *P* = 0,458) e aborto (*OR* = 0,36; IC 95% = 0,08 – 1,64; *P* = 0,188).

Estes resultados mostraram que a AOA não interferiu nos resultados clínicos do tratamento, independentemente da origem do espermatozóide, quando avaliados os ciclos sem levar em consideração a idade das pacientes.

4.2 GRUPOS DE ESTUDO \leq 35 ANOS

Neste item, foram avaliados os ciclos de ICSI em pacientes com idade igual ou inferior a 35 anos. Dessa forma, pretendeu-se excluir o fator oocitário de infertilidade decorrente da idade avançada.

4.2.1 Características Gerais dos Grupos de Estudo \leq 35 Anos

O Grupo EJACULADO foi composto por 46 ciclos, subdivididos nos Subgrupos AOA (*n* = 23) e CT (*n* = 23), que apresentavam idade igual ou inferior a 35 anos. As características gerais dos subgrupos estão dispostas na Tabela 5. Verificou-se que são comparáveis em relação às idades das mulheres e homens, ao

número de folículos e oócitos, às taxas de recuperação de oócitos e às características seminais.

TABELA 5 Características gerais do Grupo EJACULADO em pacientes com idade ≤ 35 anos

Grupos	AOA	CT	P
Número de ciclos	23	23	
Idade mulher – anos (média \pm DP)	29,91 (03,54)	30,34 (03,70)	0,690
Idade homem – anos (média \pm DP)	38,80 (06,83)	36,75 (08,93)	0,223
Nº de folículos (média \pm DP)	14,86 (12,08)	14,91 (13,20)	0,608
Nº de oócitos (média \pm DP)	10,08 (08,42)	10,34 (08,49)	0,260
Taxa de recuperação de oócitos	63,88%	67,52%	0,390
Concentração de espermatozóides (milhões / mL)	2,04 (02,02)	2,08 (01,65)	0,952
Porcentagem de espermatozóides móveis	47,53%	48,06%	0,958

AOA: Ativação Oocitária Artificial; CT: Controle; DP: Desvio-Padrão

O Grupo EPIDIDIMÁRIO foi composto por 58 ciclos, subdivididos em AOA (n = 29) e CT (n = 29), nos quais os homens apresentavam azoospermia obstrutiva pelas seguintes etiologias: vasectomia (82,76%), agenesia congênita dos deferentes (13,79%), causas genéticas (1,72%) e inflamatórias (1,72%).

Observou-se que os Subgrupos também foram similares em relação às idades das mulheres e dos homens, ao número de folículos e oócitos recuperados e à taxa de recuperação de oócitos (Tabela 6).

TABELA 6 Características gerais do Grupo EPIDIDIMÁRIO em pacientes com idade ≤ 35 anos

Grupos	AOA	CT	P
Número de ciclos	29	29	
Idade mulher – anos (média \pm DP)	29,24 (03,66)	29,21 (03,49)	0,846
Idade homem – anos (média \pm DP)	44,04 (07,51)	46,45 (08,24)	0,292
Nº de folículos (média \pm DP)	22,80 (12,60)	22,70 (12,40)	0,934
Nº de oócitos (média \pm DP)	14,34 (08,82)	15,97 (08,77)	0,099
Taxa de recuperação de oócitos	64,98%	71,16%	0,145

AOA: Ativação Oocitária Artificial; CT: Controle; DP: Desvio-Padrão

Em relação ao Grupo TESTICULAR, constituído por 72 ciclos, sendo 36 no Subgrupo AOA e 36 no CT, os homens apresentavam azoospermia obstrutiva (40,30%) ou não-obstrutiva (59,70%). As azoospermias obstrutivas tiveram como etiologia: vasectomia (68,97%), causas neurológicas (17,24%), neoplasia (10,34%) e causas genéticas (3,45%). As azoospermias não-obstrutivas tiveram como etiologia: disfunção testicular primária (62,79%), distopia testicular (18,60%), trauma (6,98%), orquite (4,65%), causa medicamentosa (4,65%) e neoplasia (2,33%).

Pôde-se perceber que no grupo TESTICULAR também não houve diferença significativa em relação às idades das mulheres e homens, número médio de oócitos e folículos e taxa de recuperação de oócitos, indicando similaridade entre os Subgrupos AOA e CT (Tabela 7).

TABELA 7 Características gerais do Grupo TESTICULAR em pacientes com idade ≤ 35 anos

Grupos	AOA	CT	P
Número de ciclos	36	36	
Idade mulher – anos (média \pm DP)	31,05 (03,03)	31,33 (3,29)	0,701
Idade homem (média \pm DP)	37,44 (07,42)	41,05 (8,95)	0,069
Nº de folículos (média \pm DP)	20,55 (10,19)	18,83 (9,05)	0,605
Nº de oócitos (média \pm DP)	14,86 (07,69)	14,47 (7,23)	0,656
Taxa de recuperação de oócitos	72,44%	73,13%	0,833

AOA: Ativação Oocitária Artificial; CT: Controle; DP: Desvio-Padrão

4.2.2 Taxa de Fertilização

As taxas de fertilização normal e falha parcial de fertilização para pacientes com idade igual ou inferior a 35 anos mostraram-se semelhantes entre os Subgrupos AOA e CT em cada grupo de estudo (EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR), independentemente da origem do espermatozóide (Figuras 14 e 15).

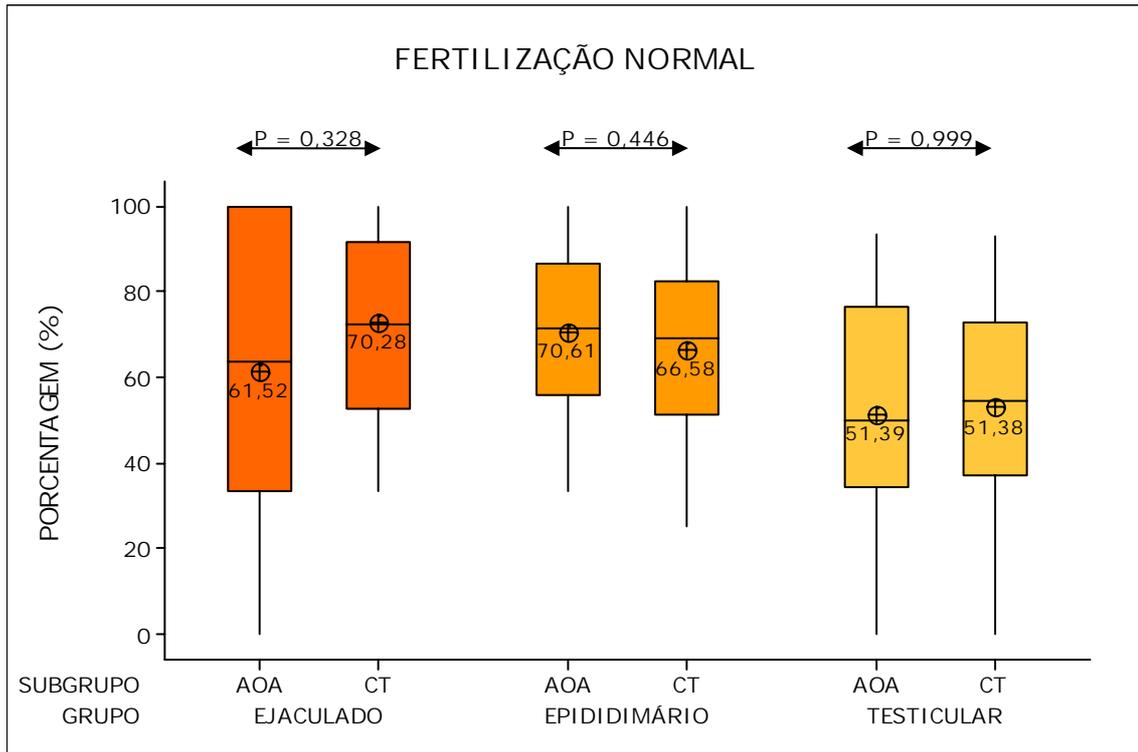


FIGURA 14 Fertilização normal, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR em pacientes com idade ≤ 35 anos

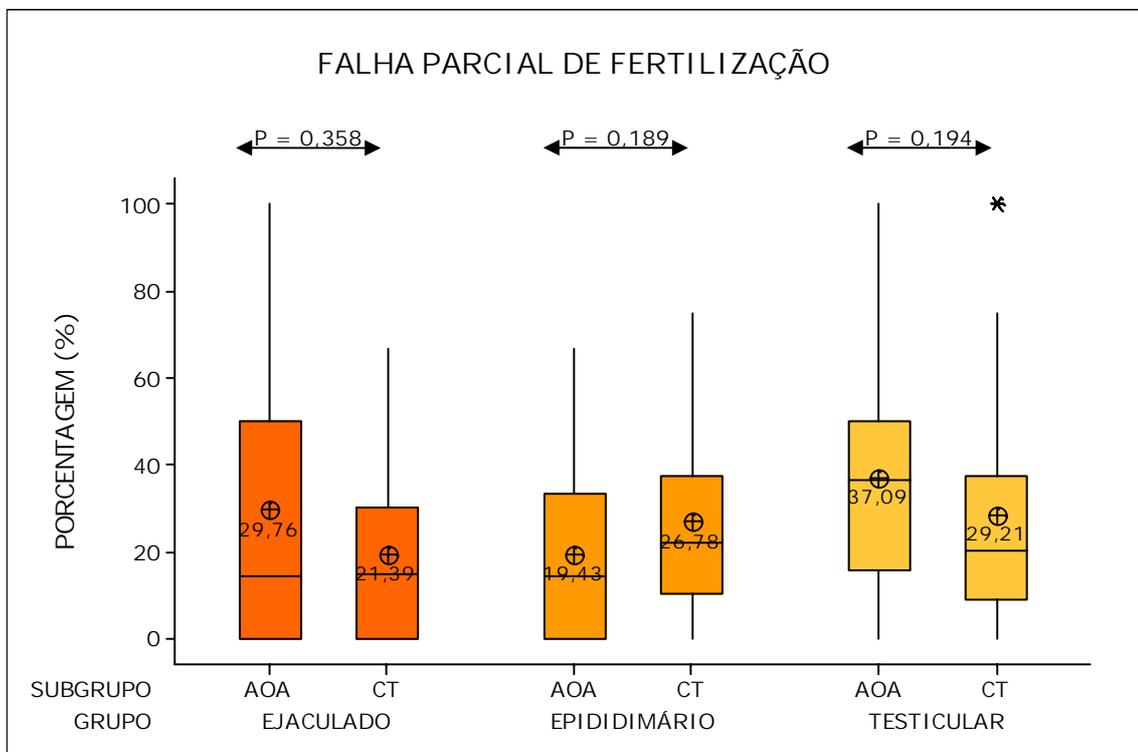


FIGURA 15 Falha parcial de fertilização, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR em pacientes com idade ≤ 35 anos

4.2.3 Taxa de Bons Embriões

Diferente do observado anteriormente (avaliação do grupo total de pacientes, sem levar em consideração a idade da mulher), a taxa de bons embriões foi estatisticamente maior quando aplicada a AOA nos Grupos EJACULADO e EPIDIDIMÁRIO. Contudo, para o Grupo TESTICULAR, esta diferença não foi observada (Figura 16).

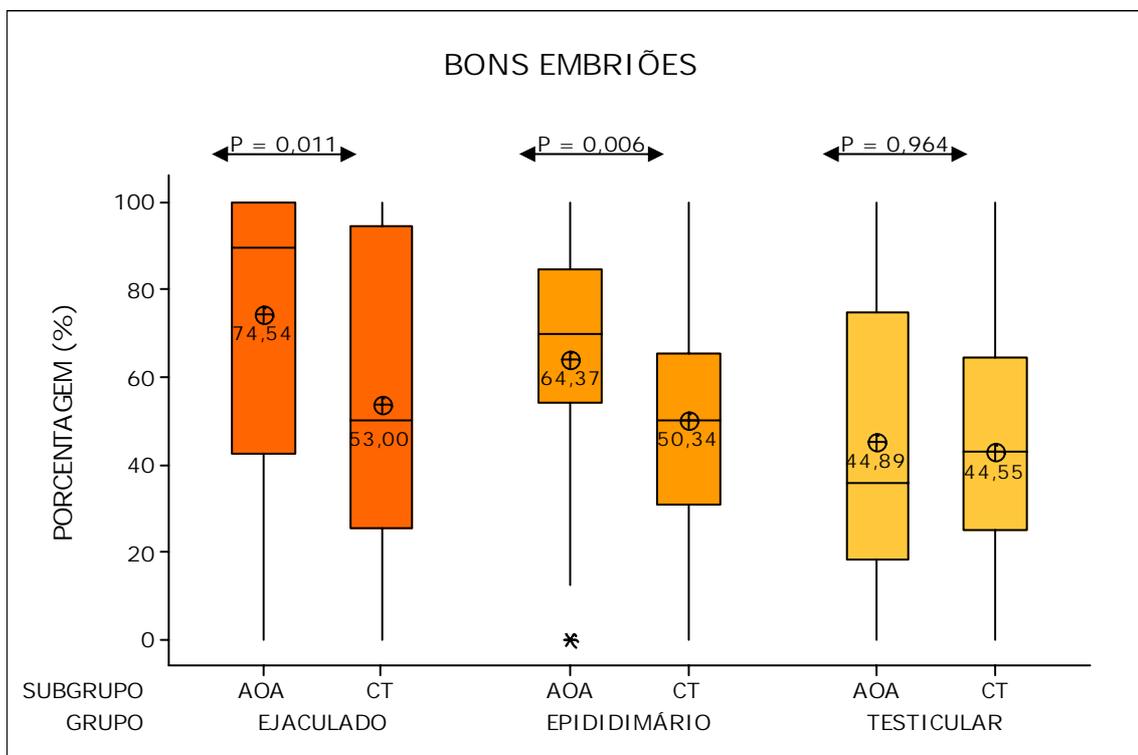


FIGURA 16 Bons embriões, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR em pacientes com idade ≤ 35 anos

4.2.4 Taxas de Implantação e Gestação

O número de embriões transferidos por paciente nos grupos estudados foi: EJACULADO (AOA: $2,05 \pm 1,08$; CT: $2,36 \pm 1,30$; $P = 0,380$), EPIDIDIMÁRIO (AOA: $2,77 \pm 1,30$; CT: $2,54 \pm 1,36$; $P = 0,546$) e TESTICULAR (AOA: $2,51 \pm 1,20$; CT: $2,67 \pm 1,30$; $P = 0,630$).

Em relação aos resultados clínicos dos ciclos de ICSI, a taxa de implantação foi maior quando se utilizou a AOA no Grupo EJACULADO, mas semelhante nos Grupos EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR (Figura 17). No entanto, as taxas de gestação total e continuada (Figura 18) e abortamento (Figura 19) foram semelhantes entre os Subgrupos AOA e CT nos três grupos de estudo.

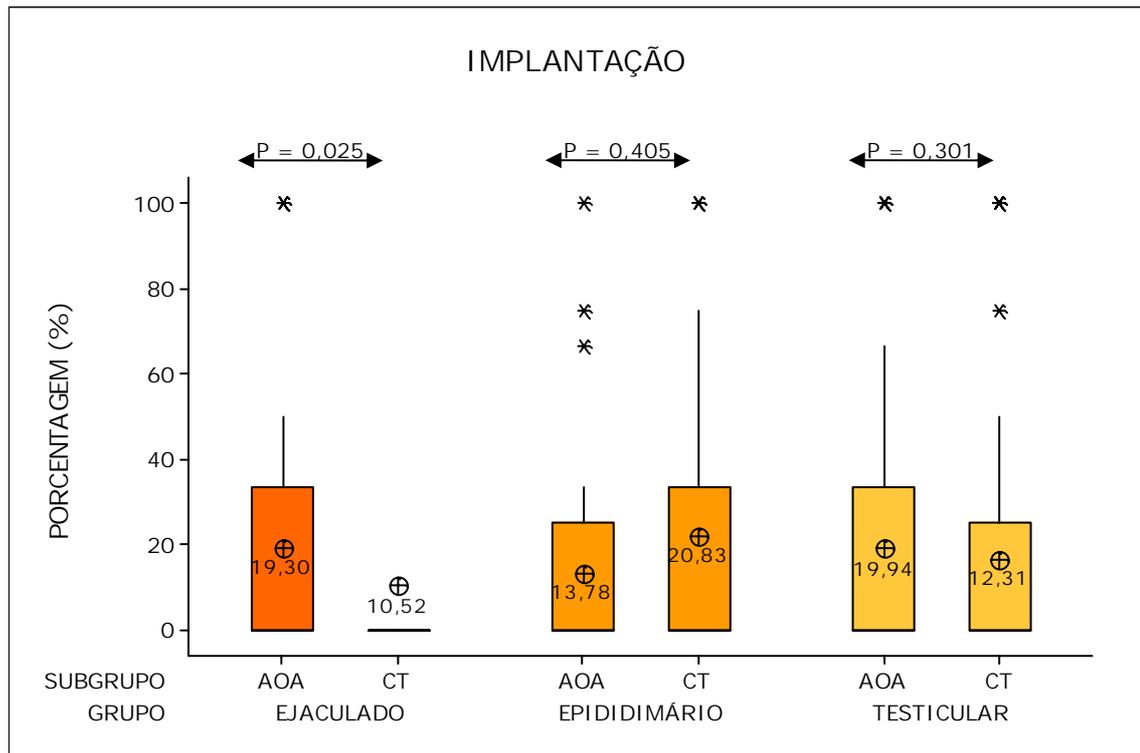


FIGURA 17 Implantação, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR em pacientes com idade ≤ 35 anos

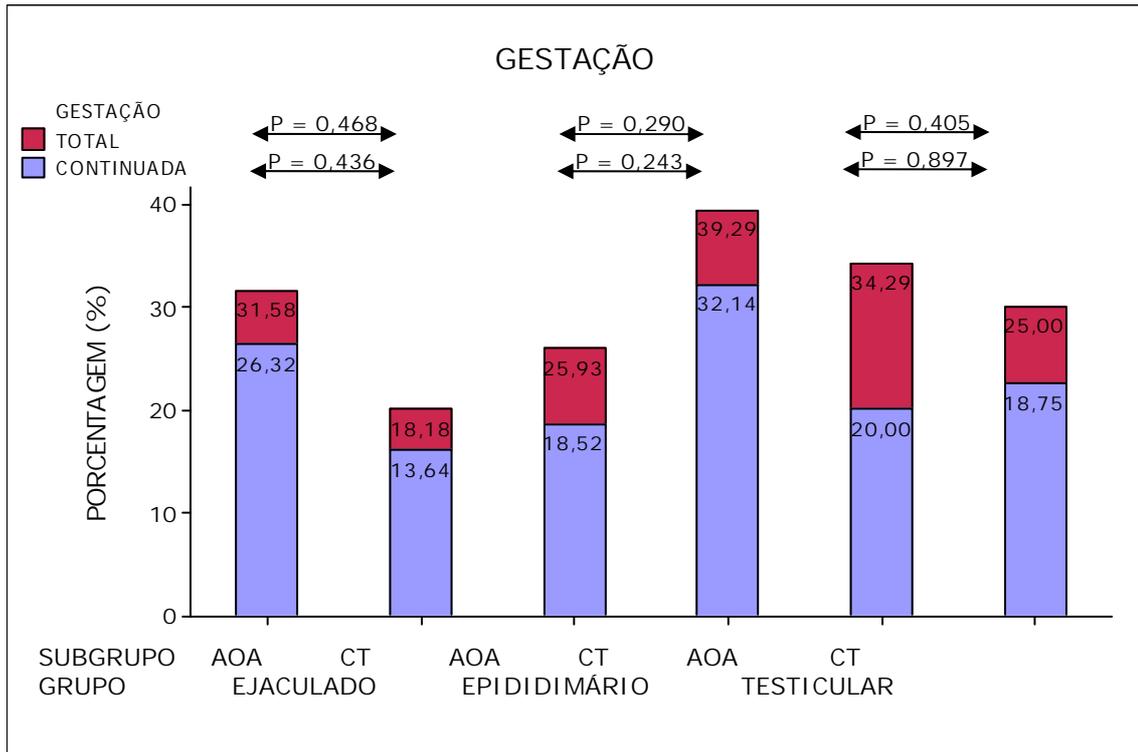


FIGURA 18 Gestação total e continuada, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR em pacientes com idade ≤ 35 anos

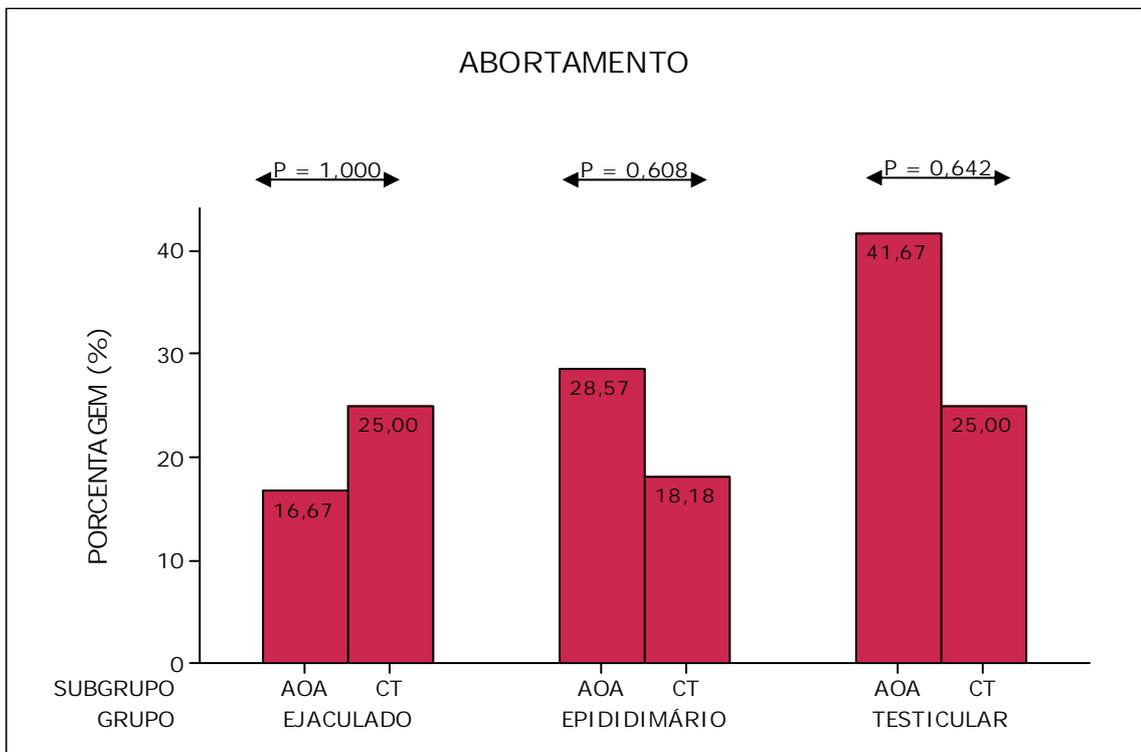


FIGURA 19 Abortamento, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: EJACULADO, EPIDIDIMÁRIO e TESTICULAR em pacientes com idade ≤ 35 anos

Foi calculado também o *OR* para os grupos estudados. Os resultados obtidos em cada um deles foram:

- **EJACULADO:** Gestação total (*OR* = 0,48; IC 95% = 0,11 – 2,06; *P* = 0,324), gestação continuada (*OR* = 0,44; IC 95% = 0,09 – 2,17; *P* = 0,314) e aborto (*OR* = 1,67; IC 95% = 0,07 – 37,73; *P* = 0,748).
- **EPIDIDIMÁRIO:** Gestação total (*OR* = 1,85; IC 95% = 0,59 – 5,82; *P* = 0,294), gestação continuada (*OR* = 2,08; IC 95% = 0,59 – 7,30; *P* = 0,251) e aborto (*OR* = 0,56; IC 95% = 0,06 – 5,24; *P* = 0,608).
- **TESTICULAR:** Gestação total (*OR* = 0,64; IC 95% = 0,22 – 1,85; *P* = 0,408), gestação continuada (*OR* = 0,92; IC 95% = 0,27 – 3,11; *P* = 0,897) e aborto (*OR* = 0,47; IC 95% = 0,07 – 3,34; *P* = 0,448).

4.3 GRUPOS DE ESTUDO AZOOSPERMIA

Com intuito de comparar os tipos de azoospermia (obstrutiva e não-obstrutiva) em relação ao resultado da AOA, foram incluídos neste subitem apenas ciclos em que os pacientes apresentavam azoospermia e foram utilizados para a ICSI espermatozóides testiculares ou epididimários recuperados por TESA ou PESA, respectivamente.

A primeira análise comparou os resultados dos ciclos de azoospermia obstrutiva e não-obstrutiva, quando recuperados espermatozóides testiculares (AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA–TESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA) para os Subgrupos AOA e CT.

Posteriormente, para os casos de azoospermia obstrutiva, os resultados dos ciclos em que foi efetuada a AOA foram comparados dependendo da origem dos espermatozóides (AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA AOA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–PESA AOA).

4.3.1 Características Gerais do Grupo de Estudo de Azoospermia com Espermatozóides Testiculares

A seguir, estão descritas as características gerais dos Grupos AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA–TESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA, comparando os Subgrupos em que se aplicou AOA (AOA) ou não (CT).

O Grupo AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA –TESA foi composto por 58 ciclos, nos quais os espermatozóides foram obtidos pela técnica de TESA, subdivididos em AOA (n = 29) e CT (n = 29). As etiologias das azoospermias não-obstrutivas foram: disfunção testicular primária (67,24%), distopia testicular (12,07%), orquite (8,62%), traumática (6,91%), causas genéticas (1,72%), medicamentosas (1,72%) e neoplasia (1,72%).

Constatou-se que os Subgrupos divergiram apenas em relação à idade dos homens. Todavia, os outros parâmetros avaliados foram comparáveis (Tabela 8).

TABELA 8 Características gerais do Grupo AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA–TESA

Grupos	AOA	CT	P
Número de ciclos	29	29	
Idade mulher – anos (média ± DP)	34,03 (03,76)	34,03 (04,34)	1,000
Idade homem – anos (média ± DP)	37,00 (04,57)	40,39 (07,73)	0,046
Nº de folículos (média ± DP)	17,75 (10,41)	18,10 (10,07)	0,874
Nº de oócitos (média ± DP)	13,24 (07,24)	13,58 (07,45)	0,812
Taxa de recuperação de oócitos	75,91%	77,19%	0,779

AOA: Ativação Oocitária Artificial; CT: Controle; DP: Desvio-Padrão

O Grupo AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA foi composto por 48 ciclos, subdivididos em AOA (n = 24) e CT (n = 24). Os espermatozóides foram obtidos através de TESA e as etiologias eram: vasectomia (52,08%), causas neurológicas

(22,92%), genéticas (14,58%), disfunção sexual (4,17%) e agenesia congênita dos deferentes (6,25%).

Verificou-se que os Subgrupos foram semelhantes em relação às idades das mulheres e dos homens, assim como ao número de folículos e oócitos e à taxa de recuperação de oócitos (Tabela 9).

TABELA 9 Características gerais do Grupo AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA

Grupos	AOA	CT	P
Número de ciclos	24	24	
Idade mulher – anos (média ± DP)	33,87 (4,91)	32,66 (5,10)	0,408
Idade homem – anos (média ± DP)	41,31 (7,98)	44,36 (8,16)	0,238
Nº de folículos (média ± DP)	18,91 (9,59)	19,83 (8,29)	0,483
Nº de oócitos (média ± DP)	14,62 (7,99)	14,29 (6,51)	0,737
Taxa de recuperação de oócitos	76,75	72,96	0,355

AOA: Ativação Oocitária Artificial; CT: Controle; DP: Desvio-Padrão

4.3.1.1 Taxa de Fertilização

As taxas de fertilização normal e falha parcial de fertilização para ciclos realizados com espermatozóide obtidos por TESA nos casos de azoospermia não-obstrutiva ou obstrutiva mostraram-se semelhantes quando comparadas em relação à utilização (AOA) ou não (CT) de AOA (Figuras 20 e 21).

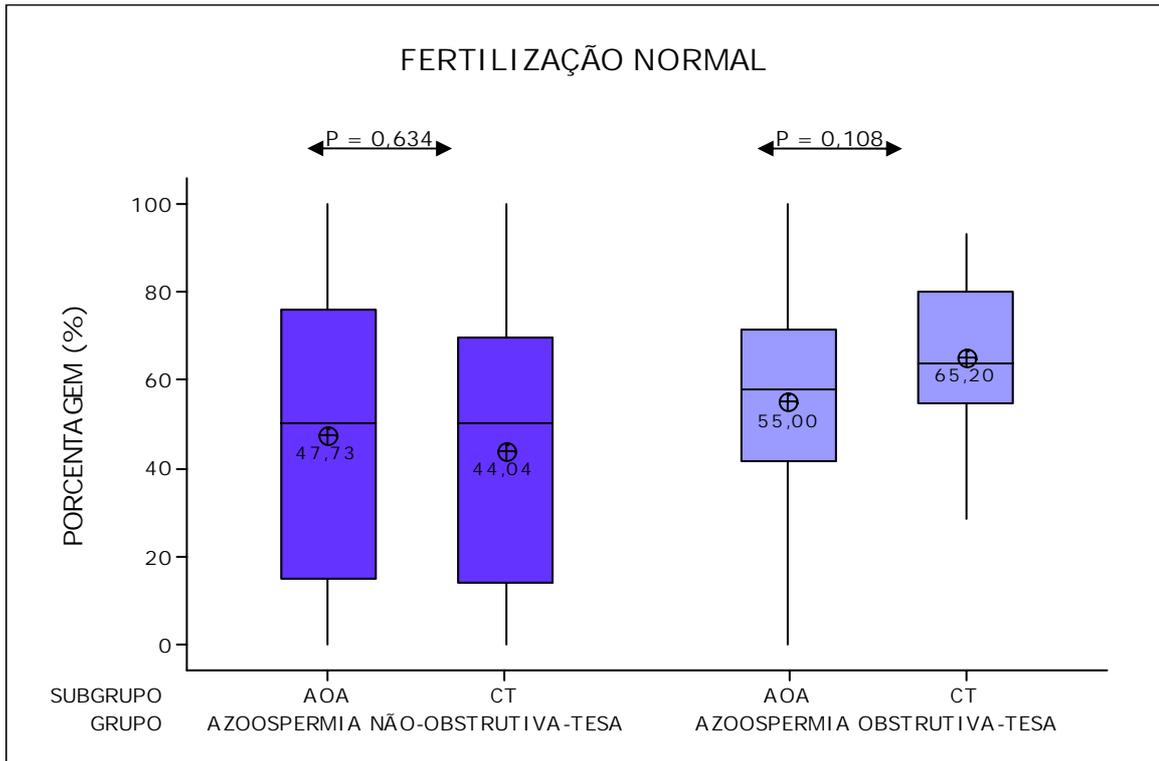


FIGURA 20 Fertilização normal, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA-TESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA

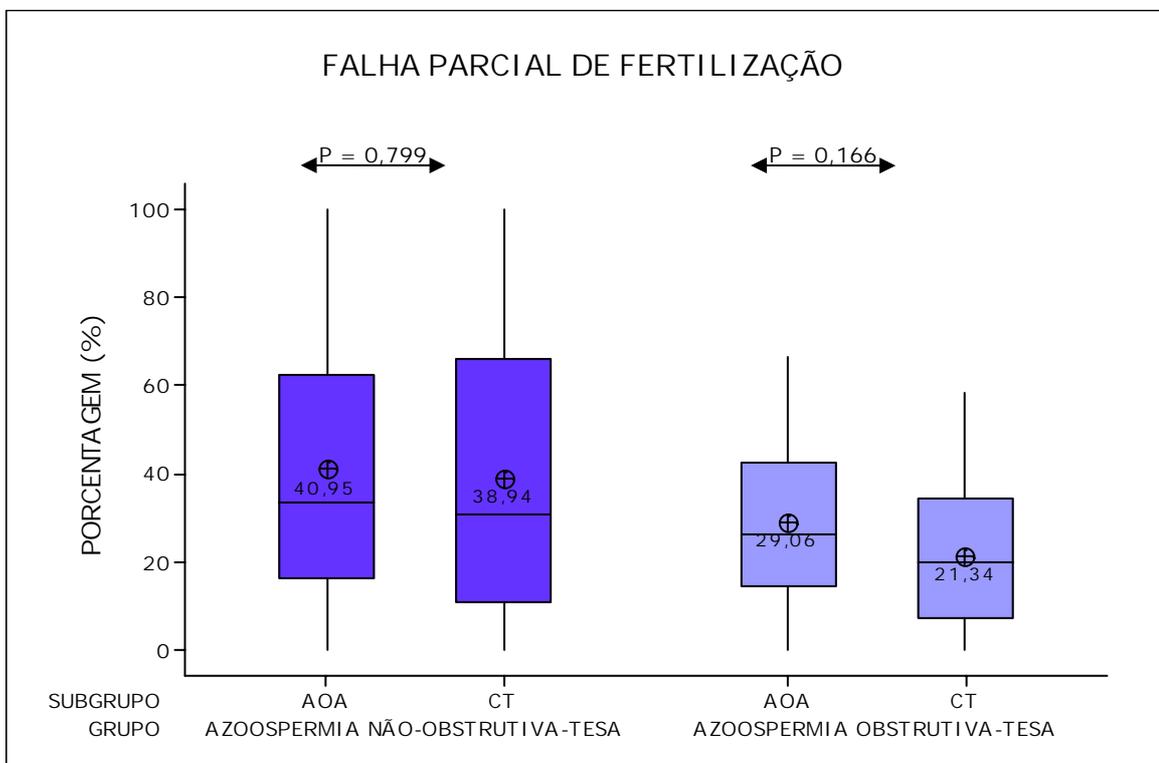


FIGURA 21 Falha parcial de fertilização, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA-TESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA

4.3.1.2 Taxa de Bons Embriões

Não foram encontradas diferenças entre os Subgrupos AOA e CT em relação à taxa de bons embriões obtidos de ciclos de pacientes apresentando AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA-TESA ou AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA (Figura 22).

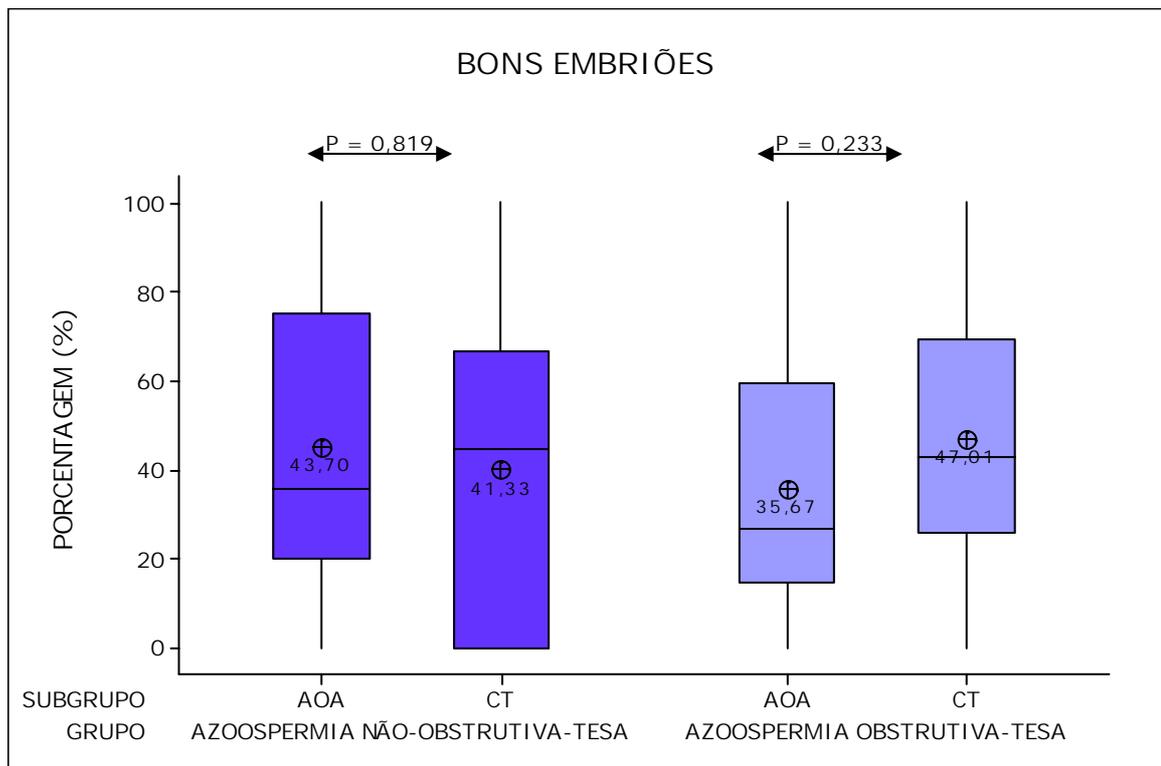


FIGURA 22 Bons embriões, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA-TESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA.

4.3.1.3 Taxa de Implantação e Gestação

O número de embriões transferidos no Grupo AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA-TESA foi: AOA: $2,36 \pm 1,13$; CT: $2,50 \pm 1,33$ ($P = 0,710$) e no Grupo AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA foi: AOA: $2,21 \pm 1,12$; CT: $2,73 \pm 1,38$ ($P = 0,208$).

Os resultados clínicos encontrados, as taxas de implantação (Figura 23), a gestação total e continuada (Figura 24) e o abortamento (Figura 25) foram também semelhantes entre os Subgrupos AOA e CT, independentemente de o paciente apresentar azoospermia não-obstrutiva ou obstrutiva quando utilizados espermatozóides testiculares.

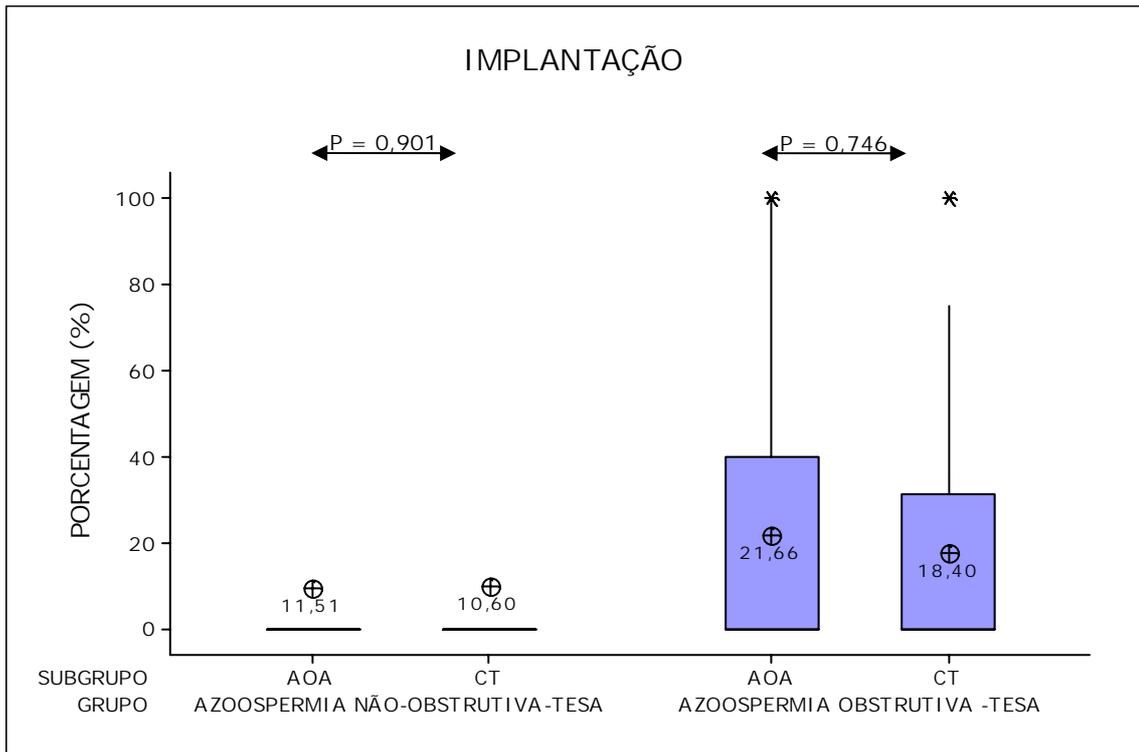


FIGURA 23 Implantação, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA-TESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA

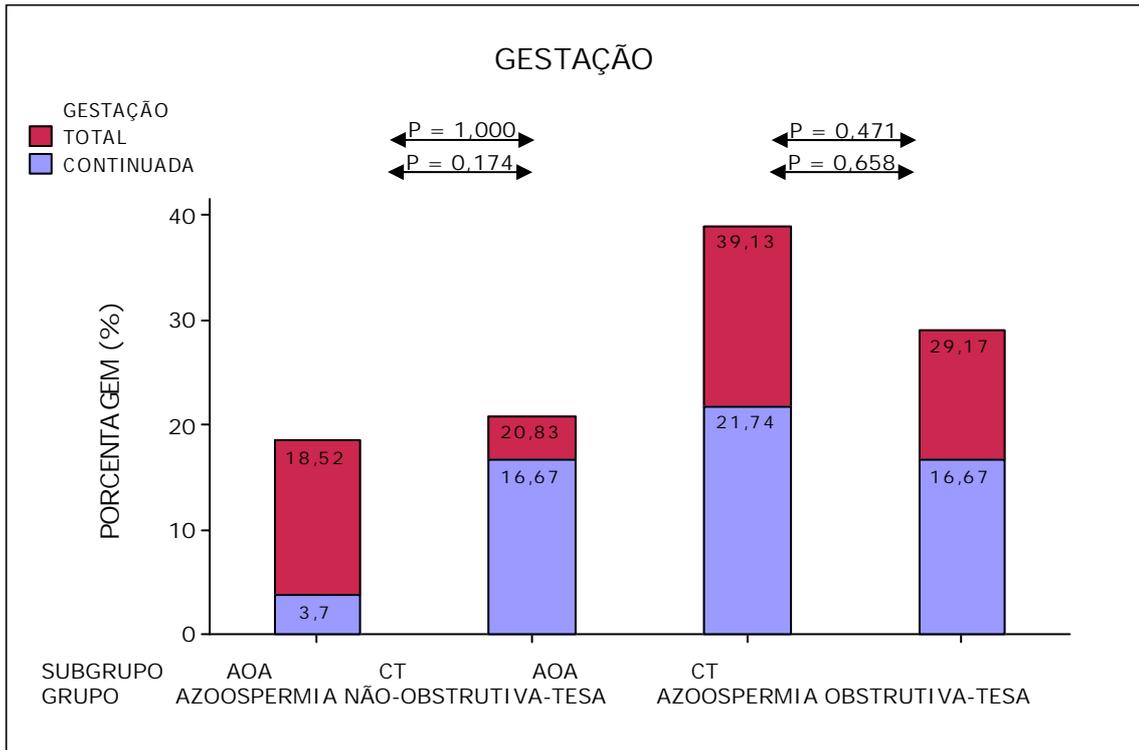


FIGURA 24 Gestação total e continuada, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA-TESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA

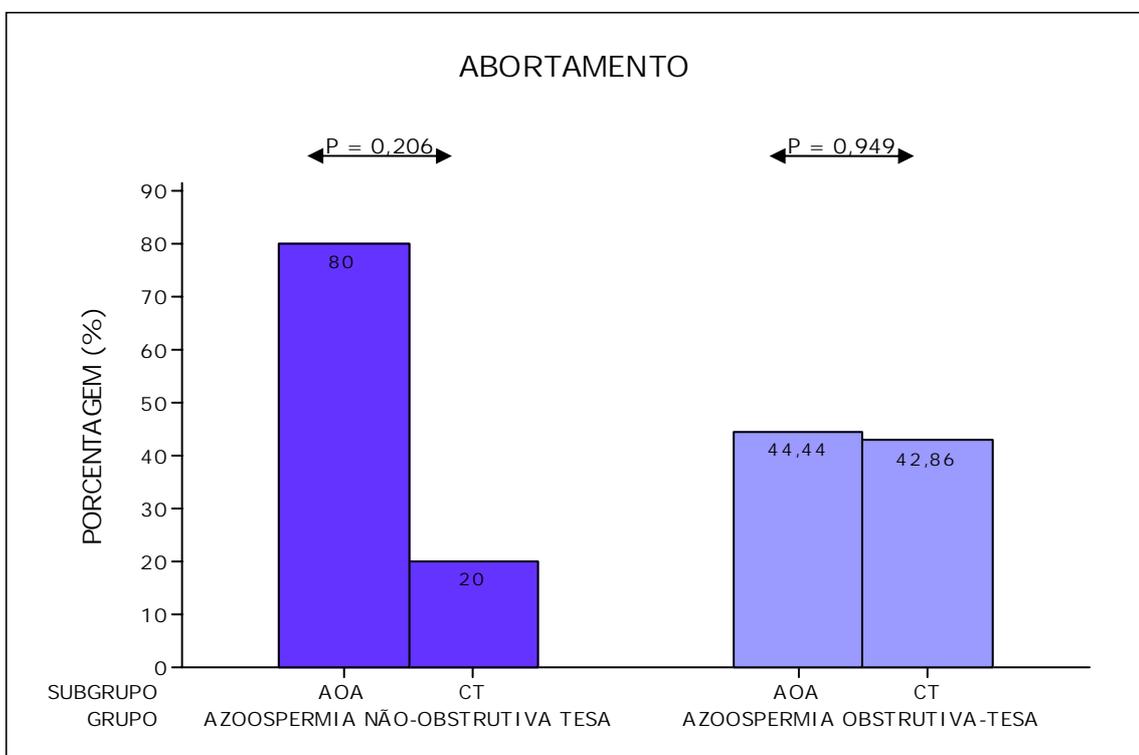


FIGURA 25 Aborto, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos: AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA-TESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA

4.3.2 Características Gerais do Grupo de Estudo Azoospermia Obstrutiva, com Espermatozóides Epididimários ou Testiculares quando Utilizada a AOA

Neste subitem, foram avaliados os casos em que foi utilizada a AOA, comparando os grupos de azoospermias obstrutivas com recuperação de espermatozóides epididimários (AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–PESA AOA, n = 41) e testiculares (AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA AOA, n = 41).

A Tabela 10 mostra os parâmetros avaliados entre os Grupos AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–PESA AOA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA AOA. Depreendeu-se que houve uma diferença entre os grupos em relação à idade dos homens e à taxa de recuperação de oócitos.

TABELA 10 Características gerais dos Grupos AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–PESA AOA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA AOA

Grupos	AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–PESA AOA	AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA–TESA AOA	P
Número de ciclos	41	41	
Idade mulher – anos (média ± DP)	31,58 (04,82)	32,65 (04,04)	0,278
Idade homem – anos (média ± DP)	44,18 (06,97)	37,57 (06,30)	<0,001
Nº de folículos (média ± DP)	19,82 (12,14)	18,19 (10,22)	0,388
Nº de oócitos (média ± DP)	12,65 (08,33)	13,82 (07,43)	0,294
Taxa de recuperação de oócitos	65,29%	77,64%	0,003

AOA: Ativação Oocitária Artificial; CT: Controle; DP: Desvio-Padrão

4.3.2.1 Taxa de Fertilização

A taxa de fertilização normal revelou-se superior no Grupo AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-PESA AOA, enquanto a taxa de falha parcial de fertilização foi inferior quando comparada ao Grupo AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA AOA (Figuras 26 e 27).

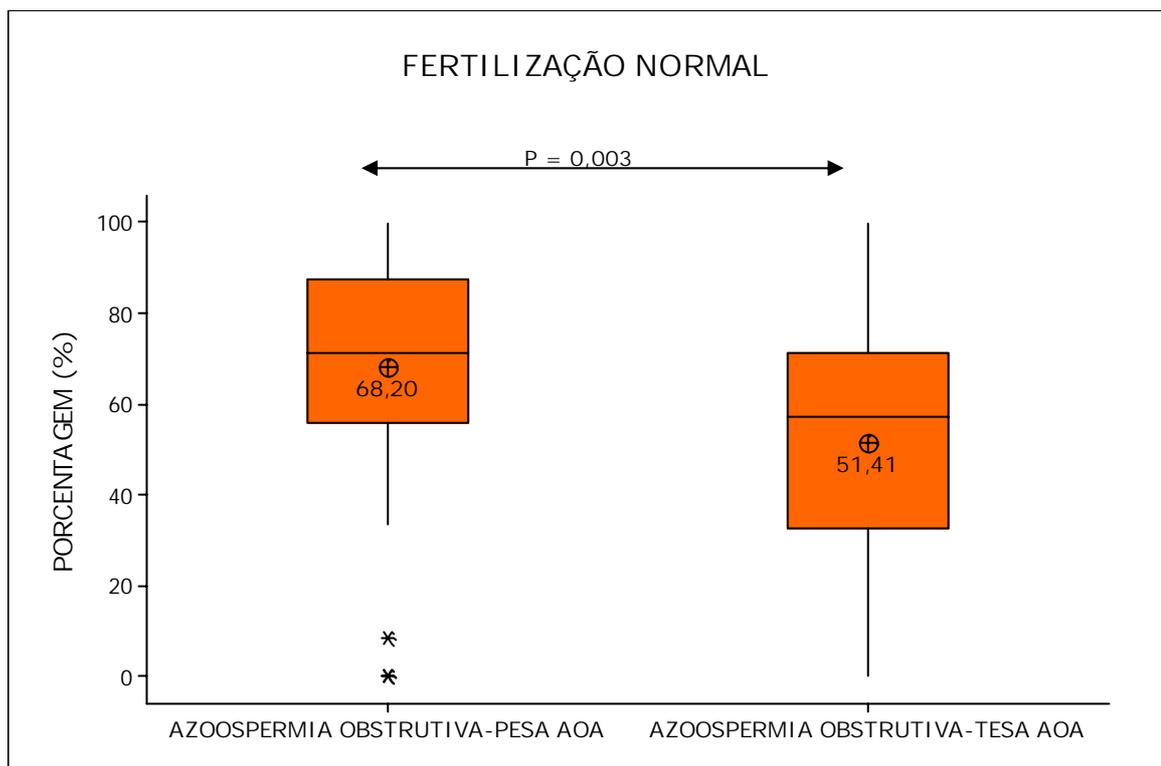


FIGURA 26 Fertilização normal nos Grupos AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-PESA AOA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA AOA

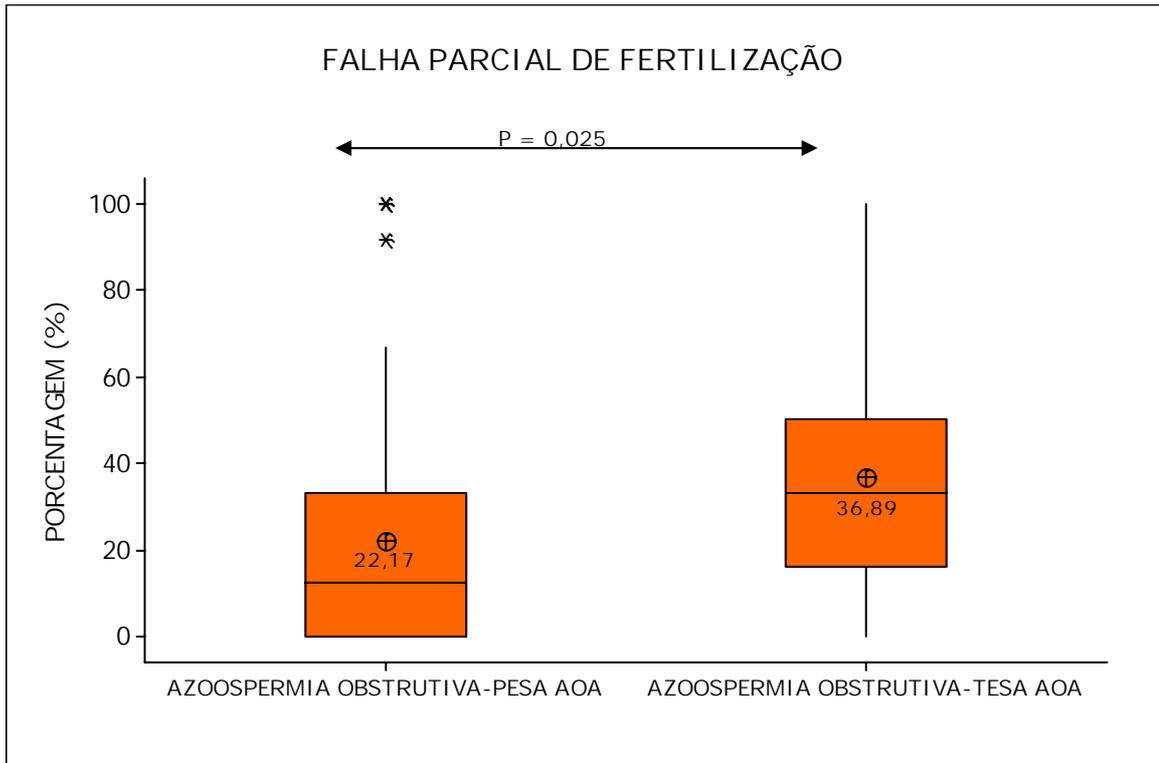


FIGURA 27 Falha parcial de fertilização nos grupos AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-PESA AOA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA AOA

4.3.2.2 Taxa de Bons Embriões

A taxa de bons embriões foi também superior no Grupo AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-PESA AOA quando comparada ao Grupo AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA AOA (Figura 28).

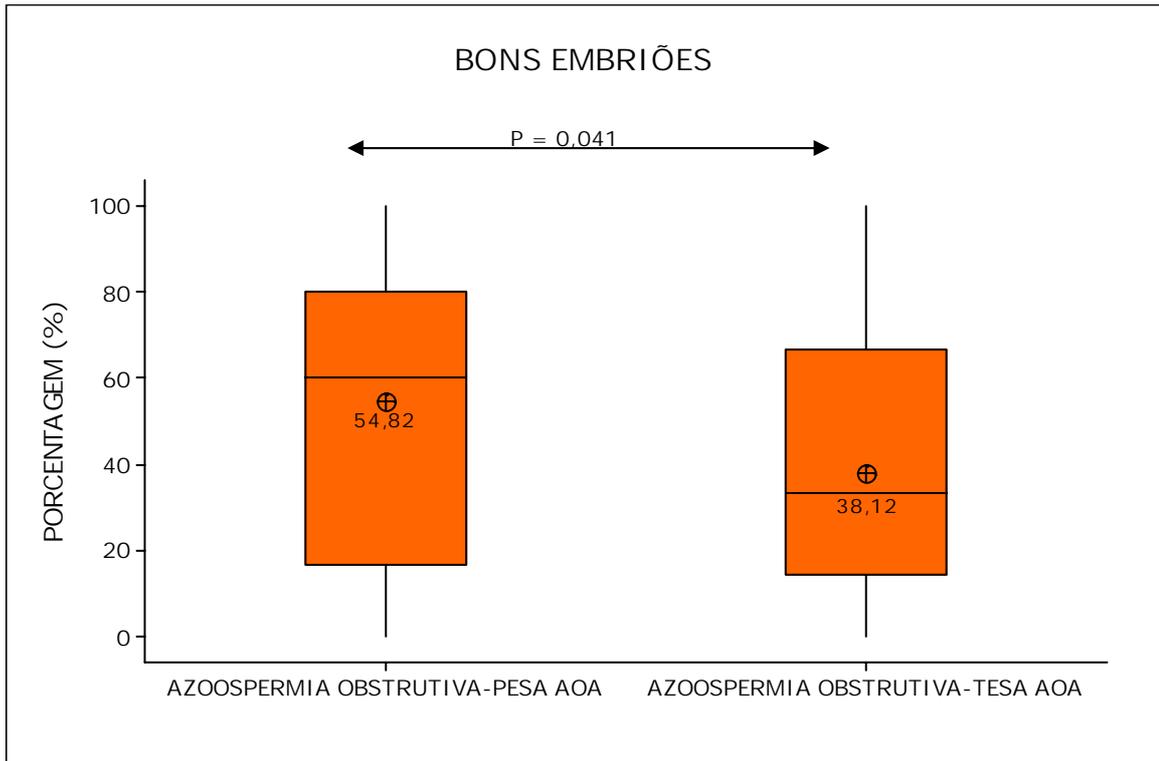


FIGURA 28 Bons embriões nos Grupos AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-PESA AOA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA AOA

4.3.2.3 Taxa de Implantação e Gestação

O número de embriões transferidos no Grupo AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-PESA AOA foi: $2,47 \pm 1,30$ e no Grupo AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA AOA, $2,02 \pm 1,19$; $P = 0,928$).

Os resultados clínicos – taxas de implantação (Figura 29), gestação total e continuada (Figura 30) e abortamento (Figura 31) – foram semelhantes entre os grupos.

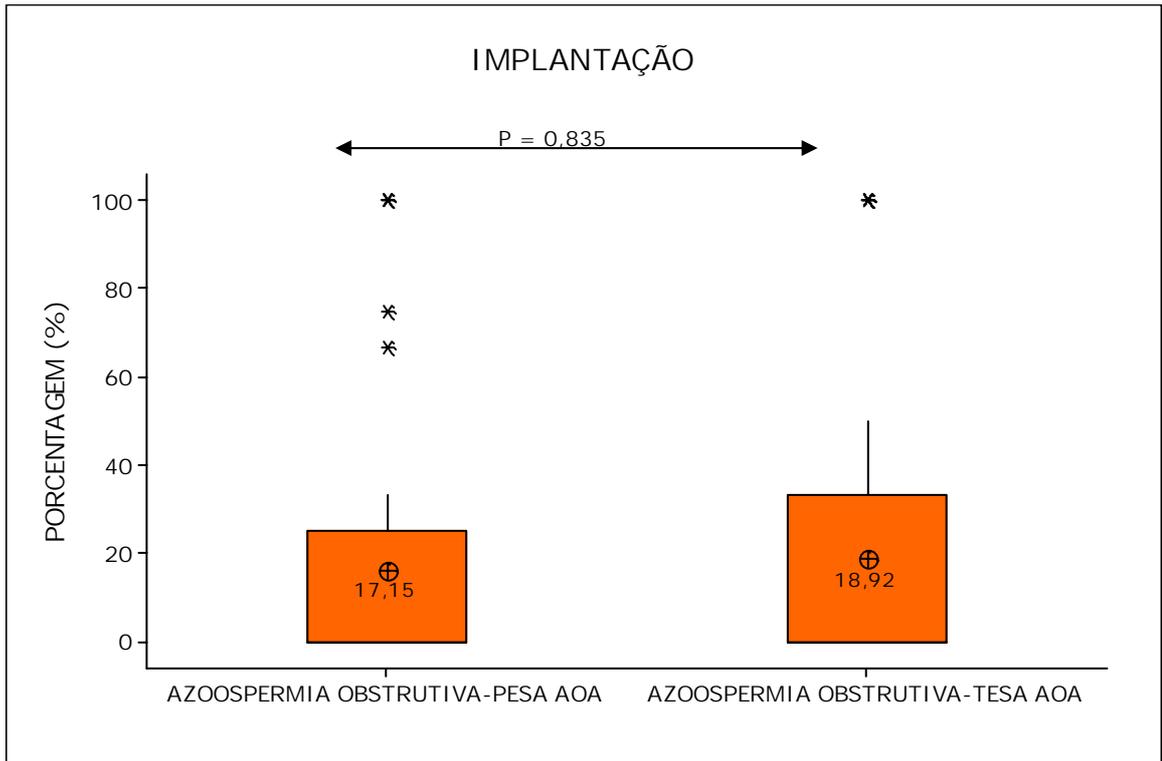


FIGURA 29 Implantação nos Grupos AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-PESA AOA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA AOA

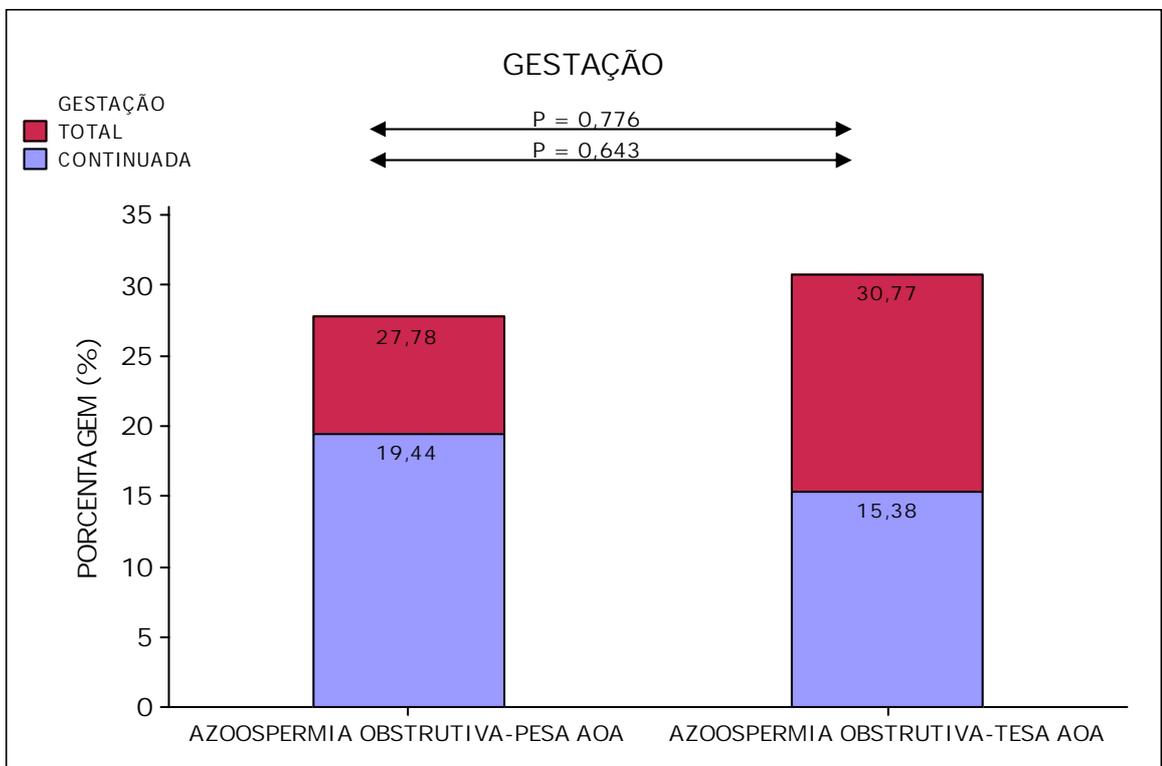


FIGURA 30 Gestação total e continuada, nos Subgrupos AOA e CT, dos Grupos AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-PESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA

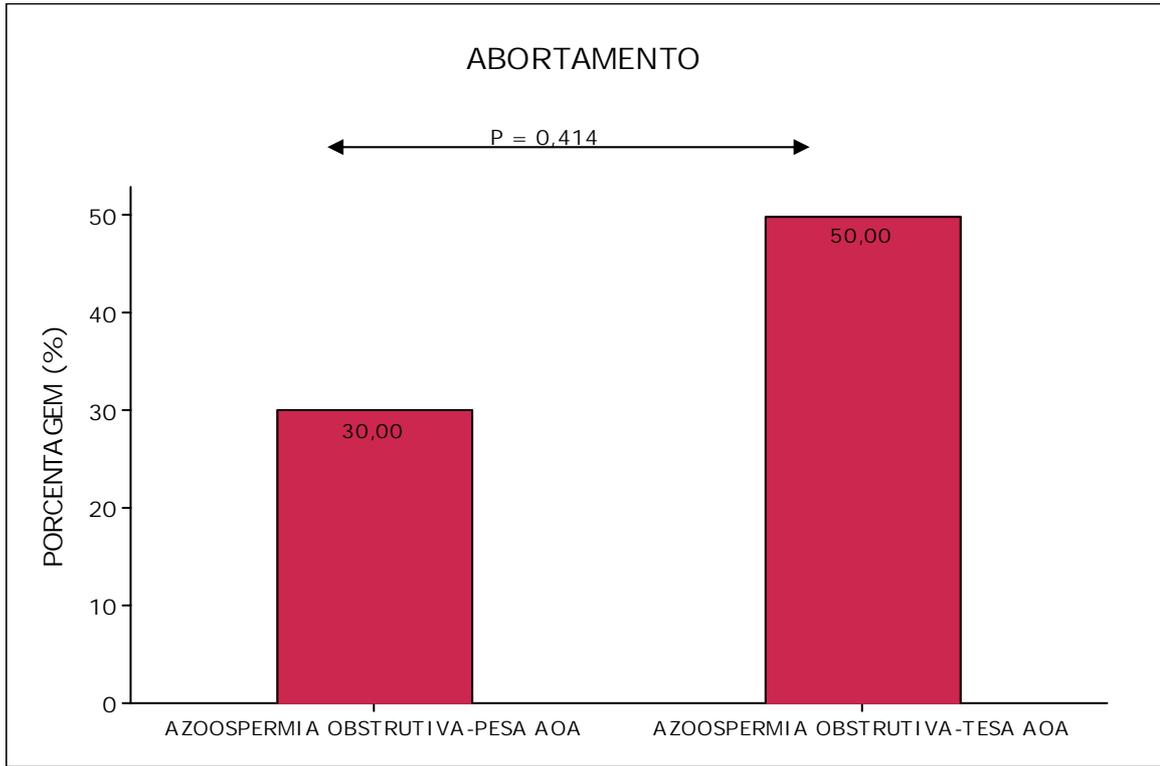


FIGURA 31 Abortamento nos Grupos AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-PESA e AZOOSPERMIA OBSTRUTIVA-TESA

5 DISCUSSÃO

Adequada maturação oocitária e capacitação espermática são fatores essenciais para o sucesso da fertilização. Apenas espermatozoides capacitados ligam-se à zona pelúcida, induzindo a reação acrossômica, que é pré-requisito para a passagem do espermatozoide através da zona pelúcida e acesso ao oolema. A fusão dos gametas masculino e feminino desencadeia uma série de eventos, que resultam na conclusão da maturação oocitária nuclear, síntese de proteína e de DNA¹³⁴.

A ICSI, por sua vez, contorna a necessidade de o espermatozoide penetrar a zona pelúcida e fundir com o oolema¹³⁵. Estudos anteriores relataram fertilização, desenvolvimento embrionário e estabelecimento de gestações após a ICSI^{13,14}, indicando claramente que oócitos podem ser ativados pela inserção do espermatozoide no ooplasma.

Apesar de os oócitos serem ativados paternogeneticamente pela estimulação mecânica provocada pela agulha de injeção durante a ICSI¹¹¹, tem sido sugerido que a ativação oocitária em humanos seja desencadeada principalmente pela ação da PLC-zeta liberada no oolema após a injeção⁹⁹ e que deficiência desse fator ou até inabilidade do espermatozoide em liberá-lo possa ser causa de falha de fertilização após a ICSI¹³⁶.

Tem sido descrito na literatura que a taxa de fertilização após a ICSI é de aproximadamente 70%⁷⁰, contrastando com taxas bem inferiores quando espermatozoides anormais ou imaturos são usados^{106,121}.

Análise por microscopia eletrônica de oócitos não-fertilizados após a ICSI indicou que a principal causa de falha de fertilização deve-se à deficiência na ativação oocitária¹⁰². Foi estabelecido que, em diversas espécies de mamíferos, incluindo humanos, a ativação oocitária, no momento da fertilização, é causada por uma elevação no Ca^{2+} intracitoplasmático⁸⁰. O aumento na concentração do Ca^{2+} intracelular representa uma importante alteração fisiológica no oócito, garantindo a conclusão da maturação oocitária¹³⁷ e início do desenvolvimento embrionário¹³⁸.

Tem sido reportado que o tratamento com ionóforo de cálcio é capaz de favorecer a ativação oocitária pelo aumento no cálcio intracelular, resultando em fertilização, desenvolvimento embrionário e gestações em pacientes com histórico de falha de fertilização ou alterações seminais graves ^{114, 115, 120}.

Os resultados aqui apresentados confirmaram que, no grupo de mulheres com menos de 36 anos, a AOA com ionóforo de cálcio foi capaz de aumentar a taxa de bons embriões quando utilizados espermatozóides ejaculados e epididimários e a taxa de implantação quando utilizados espermatozóides ejaculados.

A capacidade de os oócitos injetados com espermatozóides ejaculados e epididimários responderem à AOA quando comparados àqueles injetados com espermatozóides testiculares pode ser explicada pelo grau de maturação espermiática, associado a uma capacidade melhor de ativação dos mecanismos responsáveis pela liberação do Ca^{2+} .

Ao final da espermiogênese, a estabilidade da cromatina do espermatozóide é garantida pela desfosforilação de protamina e formação, durante o trânsito pelo epidídimo, de pontes de disulfeto entre protaminas ¹³⁹. A diferença no empacotamento do DNA entre os espermatozóides completamente maduros (ejaculados) e aqueles parcialmente maduros (epididimários e testiculares) poderia influenciar o processo de fertilização.

Segundo Esterhuizen *et al.* ¹⁰², a qualidade do empacotamento da cromatina do espermatozóide pode estar associada à falha de fertilização; e previamente foi relatado que defeitos durante a descondensação da cromatina podem ser uma das maiores causas de falha de fertilização ¹⁴⁰.

Por outro lado, Nagy *et al.* ¹⁴¹ demonstraram que espermatozóides testiculares induzem a fertilização no mesmo intervalo de tempo que espermatozóides completamente maduros, pontuando que diferenças na condição nuclear dos espermatozóides ejaculados e testiculares não têm importância durante o processo de fertilização após a ICSI.

Além disso, uma vez que a descondensação da cromatina do espermatozóide ocorre posteriormente à ativação oocitária, a influência da condição nuclear na resposta à AOA é pouco provável. Assim sendo, uma outra hipótese para a diferença na resposta à AOA, quando usados espermatozóides de diferentes

fontes, envolve fatores espermáticos responsáveis pela ativação oocitária, o qual estão relacionados ao aumento intracelular na concentração de íons de cálcio livres.

Em mamíferos, as oscilações de Ca^{2+} são guiadas pela geração de IP_3 . E ainda que o mecanismo pelo qual o espermatozóide estimula o aumento no IP_3 não tenha sido completamente esclarecido, tem sido sugerido que o espermatozóide introduz um fator específico no oócito recentemente identificado como PLC-zeta^{87, 89}.

Além da capacidade de gerar drásticos aumentos na concentração intracitoplasmática de IP_3 , algumas questões em relação à PLC-zeta – como localização e preciso mecanismo de ação – ainda não foram totalmente entendidas. Souza *et al.*¹⁴² acreditam que a atividade do fator espermático, responsável pela ativação oocitária, desenvolva-se entre as fases de espermátócito secundário e ROS e Yanamaka *et al.*¹⁴³ comprovaram que tal fator já se apresenta nos estágios iniciais da espermatogênese.

Porém, Vanderzwalmen *et al.*¹¹⁰ relataram que o fator espermático de ativação oocitária possa estar inativo em ROS e dados apresentados por Kimura & Yanagimashi¹⁴⁴ confirmam que em ratos, o fator espermático esteja presente em ROS, mas incapaz de iniciar oscilações de Ca^{2+} .

Com base em achados anteriores, os resultados do presente estudo levam a inferir que a PLC-zeta possa estar em concentrações diferentes em espermatozóides maduros quando comparados aos espermatozóides imaturos, ou talvez tenha sua atividade alterada, dependendo do grau de maturação espermática.

Este estudo também revelou que a AOA não foi capaz de implementar os resultados dos ciclos de ICSI quando utilizados espermatozóides testiculares tanto nas azoospermias obstrutivas como nas não-obstrutivas. Esses resultados suportam a relação entre o grau de maturação do espermatozóide e a capacidade de responder à AOA, ou seja, independentemente do acometimento da espermatogênese, oócitos injetados com espermatozóides imaturos (testiculares) não foram capazes de responder ao tratamento com ionóforo do cálcio.

Por outro lado, pôde-se concluir que, nos casos de azoospermia obstrutiva, espermatozóides epididimários têm maior capacidade de resposta à AOA quando comparados àqueles testiculares. De fato, quando aplicada a AOA, as taxas de fertilização e de bons embriões revelaram-se superiores, assim como a taxa de falha

parcial de fertilização foi inferior no grupo em que foram injetados espermatozóides epididimários, quando comparados aos casos em que foram injetados espermatozóides testiculares. Tais achados, mais uma vez, confirmam a importância da maturidade do espermatozóide no processo de ativação oocitária e sua necessidade de completar a sua passagem pelo ambiente testicular.

A relação entre idade e fertilidade tem sido amplamente discutida. Diversos autores descreveram que, a partir dos 30 anos, ocorre uma gradual queda na fertilidade feminina e por volta dos 50, o número de folículos disponíveis nos ovários é próximo do zero ^{64, 145}.

Os ovários perdem a máxima capacidade de produção antes mesmo de qualquer sinal clínico de infertilidade ¹⁴⁶. Recentemente, foi comprovado que a secreção de esteróides a partir dos ovários e a capacidade de resposta à estimulação gonadotrófica começam a declinar após os 30 anos ¹⁴⁷; além disso, o comprimento da fase folicular é inversamente proporcional à idade feminina ¹⁴⁸.

A queda na fertilidade, relacionada à idade, deve-se não apenas ao declínio no número de folículos ovarianos, mas também à diminuição na qualidade dos oócitos. Van Kooij *et al.* ¹⁴⁹ asseguraram que a taxa de implantação embrionária declina com a idade, especialmente após os 36 anos.

No presente estudo, foram avaliados separadamente os resultados da AOA em pacientes jovens e foi detectado que oócitos de pacientes com idade inferior ou igual a 35 respondem positivamente ao tratamento com ionóforo de cálcio. Tais achados apontam que a capacidade de ativação oocitária não depende apenas do espermatozóide, o oócito também tem seu papel durante o processo.

Segundo Swan *et al.* ⁸⁶, a PLC-zeta no espermatozóide apresenta-se de maneira inativa para ser ativada no momento em que é introduzida no oócito. Foi descrito que a atividade da PLC-zeta está relacionada ao contato com o ooplasma, uma vez que a injeção de fração citosólica, obtida por lise de espermatozóide, não induziu ativação oocitária quando injetada na região subzonal de oócitos ¹³⁶. Na opinião de Dozortseve *et al.* ¹⁵⁰, a liberação da PLC-zeta não é um evento passivo, mas sim dependente da interação com fatores presentes no ooplasma, como o Fator de Descondensação do Núcleo Espermático (Sperm Nucleus Decondensation Factor – SNDF).

Além disso, quando oócitos murinos foram avaliados, observou-se que a habilidade do oócito em responder ao estímulo para a ativação oocitária depende de fatores presentes no ooplasma e tal habilidade é adquirida nos estágios finais do desenvolvimento folicular⁵⁶.

A relação entre a idade materna e os defeitos genéticos no embrião tem sido amplamente discutida. Taxas de fertilização e clivagem embrionária parecem não alterar drasticamente com a idade, mas têm sido descritas anomalias em estágios mais tardios da embriogênese, como incidência de aneuploidias¹⁵¹.

Por outro lado, Ottolenghi *et al.*¹⁵² relataram que anomalias cromossômicas não explicam falhas repetidas de implantação em pacientes mais velhas e o alto índice de aborto de embriões euplóides nelas indica a existência de outros defeitos relacionados à idade não-detectáveis por análises convencionais.

Até o momento, o quanto a queda da fertilidade, associada a fatores citoplasmáticos, está relacionada a anomalias freqüentemente encontradas em oócitos mais velhos ainda não foi estabelecido. No entanto, nossos achados revelam que a incapacidade de oócitos de pacientes com idade superior a 35 anos em responder à AOA pode estar relacionada a defeitos citoplasmáticos associados ao mecanismo de ação da PLC-zeta.

Os resultados aqui encontrados não mostraram diferenças significativas nas taxas de fertilização quando foi efetuada a ativação artificial com ionóforo de cálcio, mas as taxas de formação de bons embriões e a implantação foram mais altas no subgrupo AOA, dependendo da origem do espermatozóide em mulheres mais jovens.

A idéia de que oscilações de Ca^{2+} influenciem o desenvolvimento embrionário tem sido discutida por diversos autores. Bos-Mikich *et al.*¹⁵³ afirmaram que a proporção entre as células do maciço celular interno e do trofotoderma pode ser alterada por diferentes padrões de oscilações de Ca^{2+} . Também já foi detectado que a imposição de Ca^{2+} no início da embriogênese afeta positivamente o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ e a freqüência das oscilações de Ca^{2+} na ativação influencia a taxa de implantação após a transferência embrionária¹⁵⁷.

Ozil & Huneau ¹⁵⁸ avaliaram o impacto do Ca^{2+} durante a ativação oocitária no desenvolvimento embrionário pós-implantacional em coelhos e concluíram que variações na amplitude e frequência das oscilações de Ca^{2+} afetam o potencial de desenvolvimento e a morfologia fetal.

O mecanismo pelo qual o Ca^{2+} influencia o desenvolvimento embrionário ainda não foi esclarecido. Uma hipótese sugere que o Ca^{2+} regule o desenvolvimento periimplantacional, ao menos em parte, através de regulação gênica. Oscilações de Ca^{2+} alteram diretamente a expressão de genes que regulam o desenvolvimento de células em cultura ¹⁵⁹ e foi demonstrado que aumento de Ca^{2+} leva a diferenças quantitativas e qualitativas no Ácido Ribonucléico Mensageiro (Messenger Ribonucleic Acids – mRNA) durante o desenvolvimento embrionário ¹⁶⁰.

Ozil *et al.* ¹⁶¹ desenvolveram um protocolo que resultou na estimulação ou inibição dos pulsos de Ca^{2+} em oócitos de camundongos fertilizados. Os autores revelaram que o padrão oscilatório do Ca^{2+} , a partir da fertilização até a formação dos Pró-Núcleos, influencia o desenvolvimento embrionário pré e pós-implantação. Enquanto a inibição das ondas de cálcio compromete a implantação de blastocistos, a hiperestimulação aumenta a incidência de falha pós-implantação. Esses achados, mais uma vez, levam a sugerir o envolvimento do padrão da ativação oocitária e a expressão gênica.

Além disso, ficou provado que as oscilações de Ca^{2+} cessam no momento da formação dos Pró-Núcleos ¹⁶² e o fato de o efeito do Ca^{2+} ser duradouro indica que as alterações são resultado de mudanças na síntese do DNA e na divisão celular ¹⁵⁸.

6 CONCLUSÕES

A Ativação Oocitária Artificial (AOA) foi capaz de melhorar os resultados da Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI):

- a. em mulheres com idade inferior a 36 anos, quando utilizados espermatozóides provenientes do ejaculado e epidídimo;
- b. em homens com azoospermia obstrutiva, quando utilizados espermatozóides epididimários em comparação aos testiculares.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N: Spermatogenesis. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 1:1-8.
2. de Rooij DG: Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 2001; 121:347-54.
3. Chemes HE: Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int J Androl* 2001; 24:2-7.
4. Griswold MD: The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9:411-6.
5. Kerr JB: Functional cytology of the human testis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1992; 6:235-50.
6. Sutton KA: Molecular mechanisms involved in the differentiation of spermatogenic stem cells. *Rev Reprod* 2000; 5:93-8.
7. Hecht NB: Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays* 1998; 20:555-61.
8. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T: Stem cells find their niche. *Nature* 2001; 414:98-104.
9. Salgado Jacobo MI, Tovar Rodriguez JM, Hernandez Marin I, Ayala Ruiz AR: [Frequency of altered male factor in an infertility clinic]. *Ginecol Obstet Mex* 2003; 71:233-7.
10. Maduro MR, Lamb DJ: Understanding new genetics of male infertility. *J Urol* 2002; 168:2197-205.
11. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A: Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 1991; 6:811-6.
12. Jarow JP, Sharlip ID, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD, Overstreet JW, Sadovsky R: Best practice policies for male infertility. *J Urol* 2002; 167:2138-44.
13. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340:17-8.
14. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P: High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993; 8:1061-6.
15. Vernaev V, Bonduelle M, Tournaye H, Camus M, Van Steirteghem A, Devroey P: Pregnancy outcome and neonatal data of children born after ICSI using testicular sperm in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2003; 18:2093-7.
16. Kupker W, al-Hasani S, Schulze W, Kuhnel W, Schill T, Felberbaum R, Diedrich K: Morphology in intracytoplasmic sperm injection: preliminary results. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12:620-6.
17. Gomez E, Perez-Cano I, Amorocho B, Landeras J, Ballesteros A, Pellicer A: Effect of injected spermatozoa morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans. *Fertil Steril* 2000; 74:842-3.

18. Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Norman-Taylor J, Grace I, Ramsay JW: Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2004; 82:691-701.
19. Rossi-Ferragut LM, Rocha CC, Iaconelli Jr. A, Tsutomu A, Medeiros ARC, Calabresi F, Busato WCP, Borges Jr E: Influência da qualidade do espermatozóide ejaculado nos resultados de ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoides) *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida* 2001; 5:22-6.
20. Rossi-Ferragut LM, Iaconelli A, Jr., Aoki T, Rocha CC, dos Santos DR, Pasqualotto FF, Borges E, Jr: Pronuclear and morphological features as a cumulative score to select embryos in ICSI (intracytoplasmic sperm injection) cycles according to sperm origin. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20:1-7.
21. Aittomaki K, Wennerholm UB, Bergh C, Selbing A, Hazekamp J, Nygren KG: Safety issues in assisted reproduction technology: should ICSI patients have genetic testing before treatment? A practical proposition to help patient information. *Hum Reprod* 2004; 19:472-6.
22. Calogero AE, Burrello N, De Palma A, Barone N, D'Agata R, Vicari E: Sperm aneuploidy in infertile men. *Reprod Biomed Online* 2003; 6:310-7.
23. Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, Di Benedetto D, De Palma A, Romeo R, D'Agata R, Calogero AE: Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum Reprod* 2004; 19:2298-302.
24. Vicari E, de Palma A, Burrello N, Longo G, Grazioso C, Barone N, Zahi M, D'Agata R, Calogero AE: Absolute polymorphic teratozoospermia in patients with oligo-asthenozoospermia is associated with an elevated sperm aneuploidy rate. *J Androl* 2003; 24:598-603.
25. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC: Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2003; 7:428-32.
26. Tesarik J, Ubaldi F, Rienzi L, Martinez F, Iacobelli M, Mendoza C, Greco E: Caspase-dependent and -independent DNA fragmentation in Sertoli and germ cells from men with primary testicular failure: relationship with histological diagnosis. *Hum Reprod* 2004; 19:254-61.
27. Lachaud C, Tesarik J, Canadas ML, Mendoza C: Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 2004; 19:607-10.
28. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ, Jr, Agarwal A: Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004; 19:129-38.
29. Carrell DT, Emery BR, Liu L: Characterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implications for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999; 71:511-6.
30. Aoki VW, Liu L, Carrell DT: Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod* 2005; 20:1298-306.
31. Tesarik J, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C: Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online* 2006; 12:715-21.
32. Seli E, Sakkas D: Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 2005; 11:337-49.

33. Emery BR, Carrell DT: The effect of epigenetic sperm abnormalities on early embryogenesis. *Asian J Androl* 2006; 8:131-42.
34. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J: Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005; 20:226-30.
35. Tesarik J: Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod Biomed Online* 2005; 10:370-5.
36. Pasqualotto FF, Rossi-Ferragut LM, Rocha CC, Iaconelli A, Jr, Borges E, Jr: Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm obtained from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *J Urol* 2002; 167:1753-6.
37. Buffat C, Patrat C, Merlet F, Guibert J, Epelboin S, Thiounn N, Vieillefond A, Adda-Lievin A, Lebon C, Jouannet P: ICSI outcomes in obstructive azoospermia: influence of the origin of surgically retrieved spermatozoa and the cause of obstruction. *Hum Reprod* 2006; 21:1018-24.
38. Vernaev V, Tournaye H, Osmanagaoglu K, Verheyen G, Van Steirteghem A, Devroey P: Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa is less successful in men with nonobstructive azoospermia than in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2003; 79:529-33.
39. Martin RH, Greene C, Rademaker A, Barclay L, Ko E, Chernos J: Chromosome analysis of spermatozoa extracted from testes of men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000; 15:1121-4.
40. Borges Junior E, Rossi-Ferragut LM, Pasqualotto FF, Rocha CC, Iaconelli Junior A: Different intervals between vasectomy and sperm retrieval interfere in the reproductive capacity from vasectomized men. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20:33-7.
41. Orth JM, Jester WF, Li LH, Laslett AL: Gonocyte-Sertoli cell interactions during development of the neonatal rodent testis. *Curr Top Dev Biol* 2000; 50:103-24.
42. McVicar CM, O'Neill DA, McClure N, Clements B, McCullough S, Lewis SE: Effects of vasectomy on spermatogenesis and fertility outcome after testicular sperm extraction combined with ICSI. *Hum Reprod* 2005; 20:2795-800.
43. Mo ZN, Huang X, Zhang SC, Yang JR: Early and late long-term effects of vasectomy on serum testosterone, dihydrotestosterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels. *J Urol* 1995; 154:2065-9.
44. Shiraishi K, Takihara H, Naito K: Quantitative analysis of testicular interstitial fibrosis after vasectomy in humans. *Aktuelle Urol* 2003; 34:262-4.
45. Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K: The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 1997; 138:2081-8.
46. Yin Y, Stahl BC, DeWolf WC, Morgentaler A: P53 and Fas are sequential mechanisms of testicular germ cell apoptosis. *J Androl* 2002; 23:64-70.
47. Lue Y, Hikim AP, Wang C, Bonavera JJ, Baravarian S, Leung A, Swerdloff RS: Early effects of vasectomy on testicular structure and on germ cell and macrophage apoptosis in the hamster. *J Androl* 1997; 18:166-73.
48. Shiraishi K, Naito K, Yoshida K: Vasectomy impairs spermatogenesis through germ cell apoptosis mediated by the p53-Bax pathway in rats. *J Urol* 2001; 166:1565-71.
49. Hirshfield AN: Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124:43-101.

50. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J, Molecular biology of the cell. Third ed. 1994, New York: Garland Publishing.
51. van Wezel IL, Rodgers RJ: Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biol Reprod* 1996; 55:1003-11.
52. Fortune JE: Selection and maintenance of the dominant follicle: an introduction. *Biol Reprod* 2001; 65:637.
53. Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Kot K: Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biol Reprod* 2001; 64:197-205.
54. Perreault SD, Barbee RR, Slott VL: Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* 1988; 125:181-6.
55. Carroll J, Jones KT, Whittingham DG: Ca²⁺ release and the development of Ca²⁺ release mechanisms during oocyte maturation: a prelude to fertilization. *Rev Reprod* 1996; 1:137-43.
56. Cheung A, Swann K, Carroll J: The ability to generate normal Ca(2+) transients in response to spermatozoa develops during the final stages of oocyte growth and maturation. *Hum Reprod* 2000; 15:1389-95.
57. Baird DT, Collins J, Egozcue J, Evers LH, Gianaroli L, Leridon H, Sunde A, Templeton A, Van Steirteghem A, Cohen J, Crosignani PG, Devroey P, Diedrich K, Fauser BC, Fraser L, Glasier A, Liebaers I, Mautone G, Penney G, Tarlatzis B: Fertility and ageing. *Hum Reprod Update* 2005; 11:261-76.
58. Westergaard CG, Byskov AG, Andersen CY: Morphometric characteristics of the primordial to primary follicle transition in the human ovary in relation to age. *Hum Reprod* 2007; 22:2225-31.
59. Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR: Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1996; 11:2217-22.
60. Keefe DL, Marquard K, Liu L: The telomere theory of reproductive senescence in women. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006; 18:280-5.
61. Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J, Zaragoza M: Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28:167-75.
62. Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A: Oral antioxidants counteract the negative effects of female aging on oocyte quantity and quality in the mouse. *Mol Reprod Dev* 2002; 61:385-97.
63. Keefe DL, Niven-Fairchild T, Powell S, Buradagunta S: Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women. *Fertil Steril* 1995; 64:577-83.
64. Wu J, Zhang L, Wang X: Maturation and apoptosis of human oocytes in vitro are age-related. *Fertil Steril* 2000; 74:1137-41.
65. Hassold T, Hunt P: To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001; 2:280-91.
66. Ciapa B, Chiri S: Egg activation: upstream of the fertilization calcium signal. *Biol Cell* 2000; 92:215-33.
67. Yanagimachi R: Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 1994; 2:371-2.
68. Stricker SA: Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev Biol* 1999; 211:157-76.

69. Hafez ES, Goff L, Hafez B: Mammalian fertilization, IVF, ICSI: physiological/molecular parameters, clinical application. *Arch Androl* 2004; 50:69-88.
70. Ben-Yosef D, Shalgi R: Oocyte activation: lessons from human infertility. *Trends Mol Med* 2001; 7:163-9.
71. Ludwig M, Schroder AK, Diedrich K: Impact of intracytoplasmic sperm injection on the activation and fertilization process of oocytes. *Reprod Biomed Online* 2001; 3:230-240.
72. Jimenez-Gonzalez C, Michelangeli F, Harper CV, Barratt CL, Publicover SJ: Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. *Hum Reprod Update* 2006; 12:253-67
73. Miyazaki S, Ito M: Calcium signals for egg activation in mammals. *J Pharmacol Sci* 2006; 100:545-52.
74. Verlhac MH, de Pennart H, Maro B, Cobb MH, Clarke HJ: MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1993; 158:330-40.
75. Dupont G: Link between fertilization-induced Ca²⁺ oscillations and relief from metaphase II arrest in mammalian eggs: a model based on calmodulin-dependent kinase II activation. *Biophys Chem* 1998; 72:153-67.
76. Moos J, Visconti PE, Moore GD, Schultz RM, Kopf GS: Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs. *Biol Reprod* 1995; 53:692-9.
77. Miyazaki S: Thirty years of calcium signals at fertilization. *Semin Cell Dev Biol* 2006; 17:233-43.
78. Jones KT: Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction* 2005; 130:813-23.
79. Lawrence Y, Whitaker M, Swann K: Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca²⁺ increase at fertilization in the mouse. *Development* 1997; 124:233-41.
80. Swann K, Saunders CM, Rogers NT, Lai FA: PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 2006; 17:264-73.
81. Machaty Z, Bonk AJ, Kuhholzer B, Prather RS: Porcine oocyte activation induced by a cytosolic sperm factor. *Mol Reprod Dev* 2000; 57:290-5.
82. Tang TS, Dong JB, Huang XY, Sun FZ: Ca⁽²⁺⁾ oscillations induced by a cytosolic sperm protein factor are mediated by a maternal machinery that functions only once in mammalian eggs. *Development* 2000; 127:1141-50.
83. Yanagida K, Katayose H, Hirata S, Yazawa H, Hayashi S, Sato A: Influence of sperm immobilization on onset of Ca⁽²⁺⁾ oscillations after ICSI. *Hum Reprod* 2001; 16:148-152.
84. Nakano Y, Shirakawa H, Mitsunashi N, Kuwabara Y, Miyazaki S: Spatiotemporal dynamics of intracellular calcium in the mouse egg injected with a spermatozoon. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:1087-93.
85. Parrington J, Jones ML, Tunwell R, Devader C, Katan M, Swann K: Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: potential components of the sperm factor that causes Ca²⁺ release in eggs. *Reproduction* 2002; 123:31-9.

86. Swann K, Larman MG, Saunders CM, Lai FA: The cytosolic sperm factor that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCzeta. *Reproduction* 2004; 127:431-9.
87. Saunders CM, Swann K, Lai FA: PLCzeta, a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization. *Biochem Soc Symp* 2007; 23-36.
88. Rogers NT, Hobson E, Pickering S, Lai FA, Braude P, Swann K: Phospholipase Ceta causes Ca²⁺ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction* 2004; 128:697-702.
89. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA: PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002; 129:3533-44.
90. Berridge MJ: Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; 361:315-25.
91. Rice A, Parrington J, Jones KT, Swann K: Mammalian sperm contain a Ca(2+)-sensitive phospholipase C activity that can generate InsP(3) from PIP(2) associated with intracellular organelles. *Dev Biol* 2000; 228:125-35.
92. Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y: Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ release channel in Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 1993; 158:62-78.
93. Wu H, Smyth J, Luzzi V, Fukami K, Takenawa T, Black SL, Allbritton NL, Fissore RA: Sperm factor induces intracellular free calcium oscillations by stimulating the phosphoinositide pathway. *Biol Reprod* 2001; 64:1338-49.
94. Swann K, Whitaker M: The part played by inositol trisphosphate and calcium in the propagation of the fertilization wave in sea urchin eggs. *J Cell Biol* 1986; 103:2333-42.
95. Nishizuka Y: Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 1986; 233:305-12.
96. Murray A, Hunt T, *The cell cycle*, ed. O.U. Press. 1993, Oxford, UK. 251.
97. Tesarik J, Rienzi L, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E: Use of a modified intracytoplasmic sperm injection technique to overcome sperm-borne and oocyte-borne oocyte activation failures. *Fertil Steril* 2002; 78:619-24.
98. Swann K, Homa S, Carroll J: An inside job: the results of injecting whole sperm into eggs supports one view of signal transduction at fertilization. *Hum Reprod* 1994; 9:978-80.
99. Tesarik J, Sousa M, Testart J: Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994; 9:511-8.
100. Ramalho-Santos J, Sutovsky P, Simerly C, Oko R, Wessel GM, Hewitson L, Schatten G: ICSI choreography: fate of sperm structures after monospermic rhesus ICSI and first cell cycle implications. *Hum Reprod* 2000; 15:2610-20.
101. Williams CJ: Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Hum Reprod Update* 2002; 8:313-21.
102. Esterhuizen AD, Franken DR, Becker PJ, Lourens JG, Muller, II, van Rooyen LH: Defective sperm decondensation: a cause for fertilization failure. *Andrologia* 2002; 34:1-7.
103. Tesarik J, Mendoza C, Greco E: Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod* 2002; 17:184-9.
104. Repping S, van Weert JM, Mol BW, de Vries JW, van der Veen F: Use of the total motile sperm count to predict total fertilization failure in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002; 78:22-8.

105. Katsuki T, Hara T, Ueda K, Tanaka J, Ohama K: Prediction of outcomes of assisted reproduction treatment using the calcium ionophore-induced acrosome reaction. *Hum Reprod* 2005; 20:469-75.
106. Fishel S, Aslam I, Tesarik J: Spermatid conception: a stage too early, or a time too soon? *Hum Reprod* 1996; 11:1371-5.
107. Yazawa H, Yanagida K, Katayose H, Hayashi S, Sato A: Comparison of oocyte activation and Ca²⁺ oscillation-inducing abilities of round/elongated spermatids of mouse, hamster, rat, rabbit and human assessed by mouse oocyte activation assay. *Hum Reprod* 2000; 15:2582-90.
108. Yazawa H, Yanagida K, Sato A: Oocyte activation and Ca(2+) oscillation-inducing abilities of mouse round/elongated spermatids and the developmental capacities of embryos from spermatid injection. *Hum Reprod* 2001; 16:1221-8.
109. Tesarik J, Mendoza C, Testart J: Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N Engl J Med* 1995; 333:525.
110. Vanderzwalmen P, Zech H, Birkenfeld A, Yemini M, Bertin G, Lejeune B, Nijs M, Segal L, Stecher A, Vandamme B, van Roosendaal E, Schoysman R: Intracytoplasmic injection of spermatids retrieved from testicular tissue: influence of testicular pathology, type of selected spermatids and oocyte activation. *Hum Reprod* 1997; 12:1203-13.
111. Paffoni A, Brevini TA, Somigliana E, Restelli L, Gandolfi F, Ragni G: In vitro development of human oocytes after parthenogenetic activation or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2007; 87:77-82.
112. Zhang J, Wang CW, Blaszczyk A, Grifo JA, Ozil J, Haberman E, Adler A, Krey LC: Electrical activation and in vitro development of human oocytes that fail to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999; 72:509-12.
113. Manipalviratn S, Ahnonkitpanit V, Numchaisrika P, Chompurat D, Pansatha J, Suwajanakorn S: Results of direct current electrical activation of failed-to-fertilize oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *J Reprod Med* 2006; 51:493-9.
114. Hoshi K, Yanagida K, Yazawa H, Katayose H, Sato A: Intracytoplasmic sperm injection using immobilized or motile human spermatozoon. *Fertil Steril* 1995; 63:1241-5.
115. Rybouchkin AV, Van der Straeten F, Quatacker J, De Sutter P, Dhont M: Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection in a case of round-headed sperm associated with deficient oocyte activation capacity. *Fertil Steril* 1997; 68:1144-7.
116. Yanagida K, Morozumi K, Katayose H, Hayashi S, Sato A: Successful pregnancy after ICSI with strontium oocyte activation in low rates of fertilization. *Reprod Biomed Online* 2006; 13:801-6.
117. Tomashov-Matar R, Tchetchik D, Eldar A, Kaplan-Kraicer R, Oron Y, Shalgi R: Strontium-induced rat egg activation. *Reproduction* 2005; 130:467-74.
118. Wang E, Taylor RW, Pfeiffer DR: Mechanism and specificity of lanthanide series cation transport by ionophores A23187, 4-BrA23187, and ionomycin. *Biophys J* 1998; 75:1244-54.
119. Nakagawa K, Yamano S, Moride N, Yamashita M, Yoshizawa M, Aono T: Effect of activation with Ca ionophore A23187 and puromycin on the development of human oocytes that failed to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001; 76:148-52.

120. Chi HJ, Koo JJ, Song SJ, Lee JY, Chang SS: Successful fertilization and pregnancy after intracytoplasmic sperm injection and oocyte activation with calcium ionophore in a normozoospermic patient with extremely low fertilization rates in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004; 82:475-7.
121. Kim ST, Cha YB, Park JM, Gye MC: Successful pregnancy and delivery from frozen-thawed embryos after intracytoplasmic sperm injection using round-headed spermatozoa and assisted oocyte activation in a globozoospermic patient with mosaic Down syndrome. *Fertil Steril* 2001; 75:445-7.
122. Tesarik J, Sousa M: More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. *Fertil Steril* 1995; 63:343-9.
123. Murase Y, Araki Y, Mizuno S, Kawaguchi C, Naito M, Yoshizawa M, Araki Y: Pregnancy following chemical activation of oocytes in a couple with repeated failure of fertilization using ICSI: case report. *Hum Reprod* 2004; 19:1604-7.
124. Tesarik J, Mendoza C, Greco E: The activity (calcium oscillator?) responsible for human oocyte activation after injection with round spermatids is associated with spermatid nuclei. *Fertil Steril* 2000; 74:1245-7.
125. Eldar-Geva T, Brooks B, Margalioth EJ, Zylber-Haran E, Gal M, Silber SJ: Successful pregnancy and delivery after calcium ionophore oocyte activation in a normozoospermic patient with previous repeated failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2003; 79 Suppl 3:1656-8.
126. Dale B, Fiorentino A, De Stefano R, Di Matteo L, De Simone ML, Wilding M, Zullo F: Pregnancies after activated oocyte transfer: a new option for infertility treatment. *Hum Reprod* 1999; 14:1771-2.
127. Heindryckx B, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M: Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. *Hum Reprod* 2005; 20:2237-41.
128. Moaz MN, Khattab S, Foutouh IA, Mohsen EA: Chemical activation of oocytes in different types of sperm abnormalities in cases of low or failed fertilization after ICSI: a prospective pilot study. *Reprod Biomed Online* 2006; 13:791-4.
129. Ahmady A, Michael E: Successful pregnancy and delivery following intracytoplasmic injection of frozen-thawed nonviable testicular sperm and oocyte activation with calcium ionophore. *J Androl* 2007; 28:13-4.
130. Check JH, Levito MC, Summers-Chase D, Marmar J, Barci H: A comparison of the efficacy of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using ejaculated sperm selected by high magnification versus ICSI with testicular sperm both followed by oocyte activation with calcium ionophore. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2007; 34:111-2.
131. World Health Organization W, Laboratory manual for the examination of human semen and sperm - Cervical mucus interaction. 4th ed. 1999, Cambridge, UK: Cambridge University Press.
132. SBU SBdU-, II Consenso Brasileiro de Infertilidade Masculina. 1ª ed. 2003, São Paulo: Sociedade Brasileira de Urologia.
133. Sociedade Brasileira de Reprodução Humana S, I Consenso Brasileiro - Indução de ovulação em reprodução assistida. 1ª ed. ed. 2000, São Paulo: BG Cultural. 68.
134. Yanagimachi R, Mammalian Fertilization. In Knobil, E and Neill, J. *The Physiology of Reproduction*, ed. 2nd. 1988, New York: Raven Press Ltd.

135. Gearon CM, Taylor AS, Forman RG: Factors affecting activation and fertilization of human oocytes following intracytoplasmic injection. *Hum Reprod* 1995; 10:896-902.
136. Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Qian C, Dhont M: Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. *Hum Reprod* 1995; 10:403-7.
137. Ozil JP, Swann K: Stimulation of repetitive calcium transients in mouse eggs. *J Physiol* 1995; 483 (Pt 2):331-46.
138. Lawrence Y, Ozil JP, Swann K: The effects of a Ca²⁺ chelator and heavy-metal-ion chelators upon Ca²⁺ oscillations and activation at fertilization in mouse eggs suggest a role for repetitive Ca²⁺ increases. *Biochem J* 1998; 335 (Pt 2): 335-42.
139. Dadoune JP: The nuclear status of human sperm cells. *Micron* 1995; 26:323-45.
140. Nikolettos N, Kupker W, Demirel C, Schopper B, Blasig C, Sturm R, Felberbaum R, Bauer O, Diedrich K, Al-Hasani S: Fertilization potential of spermatozoa with abnormal morphology. *Hum Reprod* 1999; 14 Suppl 1:47-70.
141. Nagy ZP, Janssenswillen C, Janssens R, De Vos A, Staessen C, Van de Velde H, Van Steirteghem AC: Timing of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in-vitro fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13:1606-12.
142. Sousa M, Mendoza C, Barros A, Tesarik J: Calcium responses of human oocytes after intracytoplasmic injection of leukocytes, spermatocytes and round spermatids. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:853-7.
143. Yamanaka K, Sofikitis NV, Miyagawa I, Yamamoto Y, Toda T, Antypas S, Dimitriadis D, Takenaka M, Taniguchi K, Takahashi K, Tsukamoto S, Kawamura H, Neil M: Ooplasmic round spermatid nuclear injection procedures as an experimental treatment for nonobstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14:55-62.
144. Kimura Y, Yanagimachi R: Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development* 1995; 121:2397-405.
145. van Noord-Zaadstra BM, Looman CW, Alsbach H, Habbema JD, te Velde ER, Karbaat J: Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *Bmj* 1991; 302:1361-5.
146. Piltonen T, Koivunen R, Perheentupa A, Morin-Papunen L, Ruokonen A, Tapanainen JS: Ovarian age-related responsiveness to human chorionic gonadotropin in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:3769-75.
147. Piltonen T, Koivunen R, Ruokonen A, Tapanainen JS: Ovarian age-related responsiveness to human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:3327-32.
148. Fukuda M, Fukuda K, Andersen CY, Byskov AG: Characteristics of human ovulation in natural cycles correlated with age and achievement of pregnancy. *Hum Reprod* 2001; 16:2501-7.
149. van Kooij RJ, Looman CW, Habbema JD, Dorland M, te Velde ER: Age-dependent decrease in embryo implantation rate after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996; 66:769-75.

150. Dozortsev D, Qian C, Ermilov A, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M: Sperm-associated oocyte-activating factor is released from the spermatozoon within 30 minutes after injection as a result of the sperm-oocyte interaction. *Hum Reprod* 1997; 12:2792-6.
151. Dorland M, van Kooij RJ, te Velde ER: General ageing and ovarian ageing. *Maturitas* 1998; 30:113-8.
152. Ottolenghi C, Uda M, Hamatani T, Crisponi L, Garcia JE, Ko M, Pilia G, Sforza C, Schlessinger D, Forabosco A: Aging of oocyte, ovary, and human reproduction. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1034:117-31.
153. Bos-Mikich A, Whittingham DG, Jones KT: Meiotic and mitotic Ca²⁺ oscillations affect cell composition in resulting blastocysts. *Dev Biol* 1997; 182:172-9.
154. Vitullo AD, Ozil JP: Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Dev Biol* 1992; 151:128-36.
155. Stachecki JJ, Yelian FD, Schultz JF, Leach RE, Armant DR: Blastocyst cavitation is accelerated by ethanol- or ionophore-induced elevation of intracellular calcium. *Biol Reprod* 1994; 50:1-9.
156. Stachecki JJ, Yelian FD, Leach RE, Armant DR: Mouse blastocyst outgrowth and implantation rates following exposure to ethanol or A23187 during culture in vitro. *J Reprod Fertil* 1994; 101:611-7.
157. Swann K, Ozil JP: Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int Rev Cytol* 1994; 152:183-222.
158. Ozil JP, Huneau D: Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca²⁺ signal regime on development. *Development* 2001; 128:917-28.
159. Fields RD, Guthrie PB, Russell JT, Kater SB, Malhotra BS, Nelson PG: Accommodation of mouse DRG growth cones to electrically induced collapse: kinetic analysis of calcium transients and set-point theory. *J Neurobiol* 1993; 24:1080-98.
160. Rout UK, Krawetz SA, Armant DR: Ethanol-induced intracellular calcium mobilization rapidly alters gene expression in the mouse blastocyst. *Cell Calcium* 1997; 22:463-74.
161. Ozil JP, Banrezes B, Toth S, Pan H, Schultz RM: Ca²⁺ oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Dev Biol* 2006; 300:534-44.
162. Jones KT, Carroll J, Merriman JA, Whittingham DG, Kono T: Repetitive sperm-induced Ca²⁺ transients in mouse oocytes are cell cycle dependent. *Development* 1995; 121:3259-66.