



Livia Drumond Aki

**Eficácia do *motile sperm organelle morphology examination (MSOME)*
na predição de gravidez após
inseminação intrauterina**

**Orientador: João Batista Alcântara Oliveira
Co-Orientador: Mário Cavagna**

Mestrado

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"
UNESP
2011

Lívia Drumond Akl

**Eficácia do *motile sperm organelle morphology examination*
(MSOME) na predição de gravidez após inseminação
intrauterina**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

Orientador: Prof. João Batista Alcântara Oliveira

Co-orientador: Prof. Mário Cavagna

Botucatu
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Akl, Lívía Drumond.

Eficácia do motile sperm organelle morphology examination (MSOME) na
predição de gravidez após inseminação intrauterina / Lívía Drumond Akl. -
Botucatu : [s.n.], 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina de Botucatu

Orientador: João Batista Alcântara Oliveira

Coorientador: Mário Cavagna

Capes: 40101150

1. Inseminação artificial humana. 2. Gravidez.

Palavras-chave: Inseminação intrauterina; MSOME; Morfologia espermática;
Taxa de gravidez.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao Prof. José Gonçalves Franco Jr. E ao meu orientador, Dr. João Batista Alcântara Oliveira, sem os quais nada disso teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por sempre me apoiarem e me incentivarem a estudar e a me especializar cada vez mais.

Ao Gustavo, por ter me apoiado e ter compreendido minhas ausências.

A toda a minha família, pelo apoio e pelo incentivo que recebi.

Ao Dr. João Batista Alcântara Oliveira e à Dra. Anaglória Pontes, pela paciência e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Ricardo Mello Marinho, pelo incentivo ao ingresso no mestrado.

Ao Dr. Leonardo Augusto Meyer de Moraes, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao corpo clínico e funcionários do Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Jr. pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo apoio e pela grande disponibilidade.

Às secretárias da pós-graduação, em especial à Ana Cláudia, pelo auxílio na área burocrática.

EPÍGRAFE

“Tentar e falhar é, pelo menos, aprender. Não chegar a tentar é sofrer a inestimável perda do que poderia ter sido.”

Albino Teixeira

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CASA	<i>computer-assisted sperm analysis</i> /análise espermática computadorizada
DNA	ácido desoxirribonucléico
FIV	fertilização <i>in vitro</i>
hCG	<i>human chorionic gonadotropin</i> /gonadotrofina coriônica humana
ICSI	<i>intracytoplasmic sperm injection</i> /injeção intracitoplasmática de espermatozóides
IUI	inseminação intrauterina
IMSI	<i>intracytoplasmic morphologically selected sperm injection</i> /injeção de espermatozóides morfológicamente selecionados
ISCA	infertilidade sem causa aparente
LH	<i>luteinizing hormone</i> /hormônio luteinizante
M/mL	milhão por mililitro
MSOME	<i>motile sperm organelle morphology examination</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
TGC	taxa de gravidez clínica
TRA	técnicas de reprodução assistida
µL	microlitro(s)
µm	micrômetro(s)

SUMÁRIO

PARTE I: INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS SEMINAIS NA INSEMINAÇÃO INTRAUTERINA.....	07
Introdução.....	07
O Fator Masculino.....	09
Inseminação Intrauterina e o Fator Masculino.....	11
Parâmetros Seminais.....	12
Morfologia dos Espermatozóides.....	14
Fragmentação do DNA.....	17
Conclusão.....	18
Perspectivas.....	19
Referências Bibliográficas.....	20
PARTE II: EFFICACY OF THE MOTILE SPERM ORGANELLE MORPHOLOGY EXAMINATION (MSOME) IN PREDICTING PREGNANCY AFTER INTRAUTERINE INSEMINATION.....	27
Abstract.....	28
Background.....	29
Methods.....	31
Study participants.....	31
IUI procedures.....	31
Determination of morphology by MSOME.....	32
Statistical analysis.....	33
Results.....	35
Discussion.....	36
Competing interests.....	38
Authors' contributions.....	38
References.....	39
ANEXO A.....	49
ANEXO B.....	53
ANEXO C.....	54

INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS SEMINAIS NA INSEMINAÇÃO INTRAUTERINA

1 Introdução

A inseminação intrauterina (IIU) é um procedimento simples, com baixa incidência de complicações e boa relação custo-benefício sendo atualmente em todo o mundo um dos procedimentos mais empregados no tratamento da infertilidade conjugal. Desde a primeira aplicação documentada da inseminação artificial na Inglaterra em 1770 por John Hunter [1] e o primeiro trabalho publicado em 1962 [2], a complexidade da IIU aumentou e atualmente inclui diferentes etapas como:

- a) A preparação do sêmen,
- b) A estimulação ovariana com citrato de clomifeno ou gonadotrofinas,
- c) O acompanhamento do pico de LH (*Luteinizing hormone/Hormônio luteinizante*) para o sincronismo da ovulação ou o desencadeamento da ovulação utilizando gonadotrofina coriônica humana (hCG),
- d) A manutenção da fase lútea com progesterona e/ou hCG.

A IIU possui um grande número de variáveis relacionadas ao sucesso do tratamento como a etiologia da infertilidade, a idade do casal, o protocolo de estimulação ovariana utilizado, a resposta ovariana e o número de inseminações realizadas. As indicações mais comuns para IIU são hostilidade cervical, endometriose leve, disfunção ovariana e infertilidade sem causa aparente (ISCA). O fator masculino está incluído entre as principais indicações.

A infertilidade masculina é uma condição comum, contribuindo para os problemas de concepção (diretamente ou em associação) em 50% dos casos [3, 4]. Alguns autores têm proposto que a IIU deve ser considerada como terapia de primeira linha para a infertilidade masculina antes do emprego de tratamentos mais invasivos e dispendiosos, como a fertilização *in vitro* (FIV) [5-10]. Contudo, a eficácia da IIU na infertilidade masculina tem sido questionada [11]. Um ponto importante é que, a exceção dos casos muito claros (por exemplo, severa oligoastenoteratozoospermia), não há consenso sobre os valores específicos dos parâmetros seminais que indicariam a necessidade de IIU ou outros tratamentos mais

invasivos.

O objetivo desta revisão da literatura foi avaliar as evidências sobre a relação entre o fator masculino/parâmetros seminais e o resultado da IIU.

2 O Fator Masculino

O valor do espermograma tradicional tem sido objeto de discussão. Através da análise do sêmen, os médicos esperam obter uma indicação clara do potencial de fertilidade, o que, exceto em situações específicas (azoospermia, teratozoospermia, globozoospermia), a avaliação convencional não fornece [12-14]. As diferentes edições do manual da Organização Mundial da Saúde (OMS) para o exame do sêmen humano [15-18] vêm sendo amplamente utilizadas como padrão de referência para os laboratórios envolvidos na análise do sêmen, no entanto, a interpretação e aplicação dos valores “normais” ou “de referência” da OMS para os parâmetros do sêmen (até o manual mais recente de 2010[15]) utilizados até agora têm limitações, pois os dados foram obtidos a partir de populações mal definidas e gerados por laboratórios com técnicas e sistemas de garantia de qualidade variáveis [19].

Como a probabilidade de gravidez mostra uma correlação linear com as concentrações de esperma até 40-50 milhões de espermatozoides/mL [20, 21], a OMS recomendou a concentração de $15\text{-}20 \times 10^6/\text{mL}$ como limite da normalidade [15, 17], valor este frequentemente questionado [19]. Por outro lado, a concentração de esperma acima deste valor tem sido repetidamente observada em pacientes inférteis [22].

Guzick et al. [23] avaliaram 765 casais inférteis (em tratamento) e 696 casais férteis (história de gravidez) usando os valores dos parâmetros seminais para definir os homens como subférteis (concentração de espermatozoides $<13,5 \times 10^6/\text{mL}$, motilidade $<32\%$, e morfologia normal $<9\%$ /critério de estrito de Kruger), férteis (concentração $>48,0 \times 10^6/\text{mL}$, motilidade $>63\%$ e morfologia normal $>12\%$) e com fertilidade indeterminada (entre estes valores). A análise dos dados observou sobreposição extensa entre os resultados de homens dos casais férteis e inférteis. Além disso, nenhum dos três parâmetros apresentou grande poder na predição da fertilidade masculina. Dentre os parâmetros seminais, a porcentagem de espermatozoides normais teve o maior poder discriminatório da fertilidade.

Em estudo recente financiado pela OMS, Cooper et al. [22] analisaram amostras de sêmen de mais de 4500 indivíduos em 14 países diferentes. Homens cujas parceiras engravidaram em 12 meses ou menos serviram de grupo controle e os resultados foram comparados com os da população de homens que já eram pais (mas o tempo para obtenção da gravidez era desconhecido), homens normozoospermicos e a população geral. Os resultados mostraram que o grupo controle apresentou significativamente maior volume, concentração e

porcentagem de formas normais do que os outros três grupos, embora as porcentagens de espermatozoides móveis totais e de formas móveis com progressão fossem significativamente inferiores. Usando os dados obtidos no grupo controle os autores delimitaram valores de referência para o sêmen: volume=1,5 ml (1,4-1,7), número total de espermatozoides=39 milhões por ejaculado (33-46), concentração de esperma= 15×10^6 /mL (12-16); vitalidade=58% vivos (55-63); motilidade progressiva=32% (31-34), motilidade total (progressiva + não progressiva)=40% (38-42), formas morfolologicamente normais=4,0% (3,0-4,0). Esses são os limites de referência recomendados pela edição mais recente do Manual da OMS (2010[15]) para análise seminal, bem inferiores aos indicados anteriormente.

Esses dados, mais que indicar a necessidade de estudos mais abrangentes com grandes populações, mostram também a dificuldade para o clínico de considerar um valor como absoluto na classificação da fertilidade masculina.

3 Inseminação Intrauterina e o Fator Masculino

A justificativa para a aplicação da IIU, particularmente nos casos de infertilidade masculina, é aumentar a probabilidade de concepção pelo aumento da quantidade de espermatozoides saudáveis no local da fecundação. Há diversas variáveis preditivas de gravidez após ciclos de IIU como a idade da mulher, tipo (primária ou secundária) e duração da infertilidade, o diagnóstico de infertilidade e a estimulação da ovulação. A idade da mulher tem associação negativa direta com a probabilidade de concepção. O diagnóstico de endometriose ou fator tubário unilateral pode ser responsável pela redução das chances de gravidez. Por outro lado, observa-se que o número de folículos recrutados tem associação linear positiva com a chance de gravidez [24].

Entre esses fatores preditivos destaca-se a qualidade do sêmen. Em uma revisão sistemática, Hughes [25] avaliou a eficácia da IIU com ou sem estimulação ovariana com gonadotrofinas no tratamento da infertilidade. Tanto a IIU isolada (*Odds ratio* (OR): 2,82; 95% intervalo de confiança (IC): 2,18-3,66) como associada à estimulação com gonadotrofinas (OR: 2,35; 95% IC: 1,87-2,94), melhoraram significativamente a fecundidade. Contudo a relativa melhora apresentada em qualquer destas situações foi menor nos casos de fator masculino de infertilidade (OR: 0,48; 95% IC: 0,37-0,60). Este resultado, além de indicar que a infertilidade masculina pode reduzir as chances de gravidez, reforça a necessidade de análise mais criteriosa das características seminais antes de decidir qual tratamento deve ser empregado em cada caso.

4 Parâmetros Seminais

Diferentes estudos relatam a influência dos parâmetros seminais no resultado da IIU. Entretanto, apesar da importância da qualidade do sêmen, parece não haver consenso sobre os limites para a indicação de tratamento com IIU.

A concentração mínima de espermatozóides móveis recomendada, após o preparo para IIU, varia nos diferentes estudos, de 0,8-10 milhões [26-32]. A maioria dos autores recomenda a FIV quando o número de espermatozóides móveis é inferior a 1 milhão. Por outro lado, Khalil et al. [30] recomendam referência direta para o tratamento com FIV se a contagem de espermatozóides móveis for inferior a 5 milhões.

Van Voorhis et al. [33] mostraram que, junto com outras variáveis, como a estimulação ovariana, a idade feminina e a ausência de gravidez anterior, o total de espermatozóides móveis da mostra de sêmen era fator preditivo independente de gravidez clínica após o tratamento com IIU (OR: 0,13; 95% IC: 0,02-0,92). Do mesmo modo, Miller et al. [31] demonstraram que o total de espermatozóides móveis após o preparo do sêmen prevê, de forma independente, o sucesso com IIU. Em seu estudo, ciclos com menos de 10 milhões de espermatozóides móveis totais foram significativamente menos propensos a resultar em uma gravidez. Os autores concluem que alternativas à IIU devem ser consideradas para os casais quando a contagem de espermatozóides móveis total for inferior a 10 milhões.

Spiessens et al. [34], controlando variáveis como idade feminina, presença de fator feminino de infertilidade e resposta ovariana, documentaram que a taxa cumulativa de nascidos vivos após quatro ciclos de IIU foi significativamente maior no grupo com homens classificados como normozoospermicos (52,8%) quando comparado ao grupo com fator de infertilidade masculina (31,4%), definidos como pacientes com astenozoospermia ou oligozoospermia com ou sem teratozoospermia. Em outra pesquisa muito similar com 615 casais, Grigoriou et al. [35] também observaram taxas de gravidez clínica e de nascidos vivos por ciclo de IIU significativamente menores ($p < 0,001$) no grupo com fator masculino de infertilidade (quando a concentração foi < 20 milhões de espermatozóides/mL ou a motilidade progressiva foi $< 50\%$, com ou sem teratozoospermia) (11,01% e 9,4%) do que no grupo com homens normozoospermicos (concentração > 20 milhões de espermatozóides/mL, motilidade progressiva $> 50\%$, e formas normais $> 10\%$ pelo critério estrito) (20,86% e 18,86%). A taxa

de natalidade cumulativa após quatro tentativas de IIU foi significativamente menor no grupo com fator de infertilidade masculina.

Shibahara et al. [36] correlacionaram a análise espermática computadorizada (CASA) e o resultado de gravidez após 682 ciclos de IIU de 160 casais com fator masculino de infertilidade. Usando a curva ROC demonstraram que, no sêmen após o preparo, cinco parâmetros são capazes de prever a gravidez após IIU: porcentagem de formas com motilidade rápida (*cut off*: 25.5%), porcentagem de formas com motilidade progressiva (*cut off*: 25.5%), velocidade média (*cut off*: 63.65 μ m/segundo), velocidade curvilínea (*cut off*: 102.65 μ m/segundo) e velocidade em linha reta (*cut off*: 52.25 μ m/segundo).

Badawy et al. [37] avaliaram os efeitos do número de espermatozóides móveis inseminados e da porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais no sucesso da IIU. A taxa de gravidez por ciclo foi de 5,55% quando o número de espermatozóides móveis era inferior a cinco milhões e 24,28% quando havia mais de cinco milhões de células móveis. Para a idade da mulher inferior a 25 anos, com o número de espermatozóides móveis maior que cinco milhões, a taxa de gravidez por ciclo foi de 28,2%, sendo significativamente maior do que a de outras faixas etárias. Acima dos 35 anos de idade, nenhuma gravidez foi relatada com o número de espermatozóides móveis menor que cinco milhões, e a taxa de gravidez foi muito baixa (0,84%) com o número de espermatozóides móveis maior que cinco milhões. Quando a morfologia espermática normal foi superior a 30% e o número de espermatozóides móveis inseminados maior que cinco milhões, a taxa de gravidez foi de 20,77%. Os autores concluíram que a inseminação intrauterina utilizada no tratamento da infertilidade masculina tem pouca chance de sucesso quando a idade da mulher é superior a 35 anos e o número de espermatozóides móveis inseminados é menor que cinco milhões.

Dorjpurev et al. [38] em análise retrospectiva de 1177 ciclos de IIU em 283 casais, observaram maiores taxas de gravidez quando a taxa de espermatozóides móveis era $\geq 30\%$ e a concentração espermática $\geq 10 \times 10^6$ /mL.

Em contrapartida, diferente dos resultados de outros autores, Burr et al. [39] referem em seu estudo que o número de espermatozóides móveis inseminados não influenciou significativamente o resultado de IIU.

5 Morfologia dos Espermatozóides

Embora nenhum dos parâmetros seminais (ou até mesmo testes funcionais), isoladamente ou em conjunto, possa ser considerado definitivo, tem sido demonstrado de forma consistente que a morfologia parece ser o melhor indicador da fertilidade masculina [12, 13, 40-43]. Guzick et al. [23], em seu estudo, destacam que a porcentagem de espermatozóides com características morfológicas normais teve o maior poder discriminatório da fertilidade masculina do que todos os outros parâmetros seminais. Com relação à IIU, inúmeros estudos sublinham a importância da morfologia espermática, especialmente para aqueles que utilizam o critério estrito de Kruger [44], inclusive com *cut off* mais definidos.

Ombelet et al. [45, 46] afirmam em seus estudos que, nos casos com menos de um milhão de espermatozóides, a IIU continua a ser importante como uma terapia de primeira escolha no tratamento da infertilidade, desde que a porcentagem de formas com morfologia normal na análise seminal seja maior que 4%.

Burr et al. [39] evidenciaram em seu estudo que o grau de teratozoospermia reduz a taxa de gravidez em ciclos de IIU e um valor de morfologia normal de 10% no sêmen a fresco distingue os casais com bons e maus resultados. Lindheim et al. [47] apoiam a influência da morfologia nos resultados. Em seu estudo retrospectivo com 42 casais, constataram que a morfologia estrita com menos de 4% de formas normais, estava altamente relacionada ao insucesso (ausência de gravidez) após ciclos de IIU. Os autores reforçam que casais com morfologia espermática persistentemente desfavorável devem ser encaminhados para tratamentos mais agressivos como a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI).

Montanaro Gauci et al. [24], em estudo retrospectivo avaliando o impacto de fatores masculinos e femininos sobre a taxa de gravidez no programa de IIU, observaram que a porcentagem de espermatozóides com morfologia normal >14% (critério de Kruger) está associada a risco de gravidez (probabilidade de ocorrência de gravidez) de 1,8 (80% maior) comparada à porcentagem de formas normais ≤14%.

Lee et al. [48] investigaram o valor preditivo do critério de Kruger para a inseminação intrauterina (IIU). As taxas de gravidez por ciclo de IIU foram de 3,8%, 18,5% e 29,9% em pacientes com morfologia espermática <4%, 4-9% e >9% de formas normais, respectivamente. A diferença estatística foi maior entre os casais com <4% e >9% de formas

normais ($p=0,005$). Embora a diferença nas taxas de gravidez entre aqueles com 4-9% e <4% de formas normais não tenha sido estatisticamente significativa, a taxa de gravidez para aqueles com 4-9% de formas normais era aceitável e ainda maior do que naqueles com <4% de formas normais. Os autores concluem que a IIU é um tratamento de primeira linha razoável para pacientes com morfologia espermática apresentando >4% de formas normais, enquanto os casais com <4% de formas normais devem ser aconselhados a usar a ICSI.

Spießens et al. [34] relataram taxa cumulativa de nascidos vivos após 4 ciclos de IIU significativamente menor em casos com teratozoospermia isolada (<10% de formas normais utilizando o critério de Kruger, motilidade normal e contagem normal) (33,4%) do que nos casos com homens normozoospermicos (33,4% vs 52,8%, respectivamente). Segundo os autores, os casais com teratozoospermia isolada devem ser orientados sobre outras opções de tratamento mais complexas. Reforçando a hipótese dos efeitos negativos da morfologia alterada na IIU, Grigoriou et al. [35], em seu estudo, também reportaram taxas de gravidez clínica e de nascidos vivos por ciclo significativamente menores no grupo onde os homens apresentavam teratozoospermia (concentração >20 milhões de espermatozoides/mL, motilidade progressiva >50%, e formas normais <10%) (12,64% e 10,34%) quando comparado ao grupo normozoospermia (20,86% e 18,86%).

Shibahara et al. [36], utilizando o critério de Kruger, observaram que a morfologia normal dos espermatozoides antes do preparo do sêmen $\geq 15,5\%$ era valor preditivo para o resultado positivo de gravidez após IIU (OR:2,2; 95%IC: 1,085-4,429; $p = 0,02$).

Güven et al. [49] avaliaram os indicadores de taxa de gravidez entre mulheres submetidas à IIU. Duzentos e trinta e duas mulheres submetidas a 255 ciclos de IIU foram retrospectivamente avaliadas de acordo com as características clínicas e parâmetros seminais em termos de taxa de gravidez clínica (TGC). A TGC global foi de 9,4%. A TGC foi de 7,9% no grupo de infertilidade primária, enquanto a taxa foi de 21,4% no grupo com infertilidade secundária ($p<0,05$). A TGC foi significativamente maior no grupo cuja morfologia dos espermatozoides encontrava-se acima de 4% (de acordo com os critérios de Kruger) em relação ao grupo com morfologia menor ou igual a 4% (6,7% vs 22,2%, respectivamente, $p=0,003$). O autor observou, utilizando análise de regressão logística, que o número de folículos pré-ovulatórios e o percentual da morfologia espermática normal de espermatozoides processados (pós-preparo) tinha o poder máximo de prever a TGC após IIU. Além de características clínicas e laboratoriais, o autor concluiu que o percentual da morfologia espermática normal de espermatozoides processados pode ser utilizado na

predição de um resultado favorável de IIU.

Hauser et al. [50] submeteram um total de 108 casais com infertilidade sem causa aparente (ISCA) a 264 ciclos de IIU. Uma diferença significativa na taxa de gestação por casal após a inseminação intrauterina foi demonstrada entre os três grupos selecionados de acordo com a morfologia espermática, ou seja, ruim (<4% de formas normais), regular (4-14%) ou bom (>14%). As taxas de gestação por casal foram: 11,1%, 36,1% e 50,0%, respectivamente. Os autores concluíram que a IIU é um tratamento válido nos casos de infertilidade masculina, desde que a morfologia estrita seja superior a 4%

Badawy et al. , em seu estudo utilizando os critérios da OMS (1993), concluíram que a inseminação intrauterina utilizada no tratamento da infertilidade masculina tem pouca chance de sucesso quando o número de espermatozoides móveis inseminados é menor que cinco milhões ou a morfologia normal é menor que 30% [37].

6 Fragmentação do DNA

Estudos têm sido publicados avaliando a integridade da cromatina dos espermatozoides como fator de avaliação da fertilidade masculina e a correlação com a morfologia do sêmen [51-55]. Poucos trabalhos relacionam o dano ao DNA espermático e a obtenção de gravidez após IIU.

Duran et al. [56], com objetivo de investigar se a qualidade do DNA espermático poderia prever o resultado da IIU, analisaram 119 casais submetidos a 154 ciclos de IIU. Nenhuma gravidez foi obtida quando a amostra de sêmen apresentava fragmentação do DNA >12% avaliado por *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labelling* (TUNEL). Bungum et al. [57] avaliaram 131 ciclos de IIU e observaram que a taxa de gravidez era significativamente maior quando os homens apresentavam índice de fragmentação do DNA espermático $\leq 27\%$ pela técnica *sperm chromatin structure assay* (SCSA) do que quando a fragmentação do DNA era $>27\%$. Estes resultados estão de acordo com dados de estudos publicados previamente avaliando a fragmentação do DNA e a fertilidade [58-60]. Por outro lado, Muriel et al. [61], após analisar a integridade do DNA pela técnica de *sperm chromatin dispersion* (SCD) de amostras de sêmen obtidas de casais que se submeteram a IIU, não observaram relação com os resultados de gravidez, apesar de uma correlação negativa com a motilidade espermática.

7 Conclusão

A inseminação intrauterina é frequentemente a primeira opção no tratamento de casais inférteis em grande parte dos casos, considerando o caráter menos invasivo em comparação a outros procedimentos de reprodução assistida. No entanto, a eficácia do método é influenciada por múltiplas variáveis. A qualidade geral das amostras de sêmen e a morfologia espermática em particular estão entre os fatores prognósticos mais importantes dos resultados clínicos (obtenção de gravidez). A possibilidade de relação entre os parâmetros seminais e os danos da cromatina espermática deve ser explorada em estudos posteriores, com padronização das técnicas empregadas.

8 Perspectivas

Considerando as discussões sobre o valor do exame tradicional do sêmen e o destaque da morfologia espermática como fator prognóstico não só para a inseminação intrauterina, mas também para as técnicas de FIV e ICSI, novos métodos de análise e classificação morfológica dos espermatozóides poderiam representar melhora na avaliação da qualidade do sêmen, com potencial repercussão clínica.

Para testar a hipótese de que malformações de organelas do esperma [62, 63] poderiam estar associadas aos resultados de FIV/ICSI, Bartoov et al. [64] desenvolveram um novo método para avaliação em tempo real da morfologia espermática, o *motile sperm organelle morphology examination* (MSOME / ainda sem tradução precisa para o português). O MSOME é realizado através da utilização de um microscópio de luz invertida equipado com contraste de fase de alta potência (DIC/óptica Nomarski) para alcançar uma ampliação $\geq 6000\times$, muito maior do que a ampliação usada habitualmente pelos embriologistas na seleção de espermatozóides para o procedimento de ICSI (200x-400x) ou mesmo que a empregada no exame de rotina do sêmen (1000x). Este método levou ao desenvolvimento do *intracytoplasmic morphologically selected sperm injection* (IMSI/injeção intracitoplasmática de espermatozóides morfolologicamente selecionados, procedimento que baseado na normalidade do esperma tal como definido pela classificação MSOME, visa melhorar os resultados da ICSI convencional centrado-se na correlação entre as anormalidades na morfologia espermática observada em grandes ampliações e danos ao DNA [52, 55, 65-71]. Vários estudos têm demonstrado que o IMSI melhora significativamente as taxas de fertilização [72, 73], qualidade do embrião [65, 71, 72, 74, 75], taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto [72, 76], taxas de implantação e gravidez após transferência de embriões no dia 2, com 3 dias [65, 66, 71, 73-75, 77-80] ou no estágio de blastocisto [76, 81] e a probabilidade de ter uma criança normal e saudável [82]. O IMSI também parece diminuir significativamente as taxas de abortamento [65, 66, 75, 77, 78, 80, 83].

O poder de resolução oferecido pelo MSOME (≥ 6000) permite a visualização mais precisa dos espermatozóides com vacúolos nucleares, que são de detecção mais difícil durante a avaliação convencional do sêmen. Bar-Chama et al. [84], empregando o critério de Kruger, analisaram o número de vacúolos do esperma em uma série de 1.295 novas amostras pós-preparo de esperma. Eles descobriram vacúolos em apenas 19,5% (253) do total; 80,5%

(1042) das amostras não tinham vacúolos. Por outro lado, o emprego do MSOME revelou que o ejaculado dos homens rotineiramente encaminhados para ICSI, apresentava em média de 30-40% de espermatozóides com núcleo vacuolizado [78]. Também utilizando o MSOME, outros autores referem índices mais elevados de presença de vacúolos. Além disso, há divergência na quantificação da presença dos vacúolos nucleares. Para o MSOME, o conteúdo da cromatina nuclear é considerado anormal se contiver um ou mais vacúolos que ocupem mais de 4% da área nuclear [64]. No entanto, o critério de Kruger, por exemplo, é muito mais tolerante com relação à presença de vacúolos. O espermatozóide somente é considerado alterado quando >20% de sua área nuclear é ocupada por vacúolos [15, 17, 85].

Por outro lado, a presença de vacúolos tem sido definida como deletério pela possível associação com lesão da cromatina. Barth e Oko [86] e Thundathil et al. [87] relataram que vacúolos nucleares no espermatozóide não impedem a ocorrência de fertilização, mas aumentam a taxa de perda embrionária precoce. Bartoov et al. [88] e Mundy et al. [89] observaram uma clara associação negativa entre a existência de vacúolos nucleares no sêmen e o potencial de fertilidade masculina. Berkovitz et al. [75, 77], graduaram a gravidade das alterações morfológicas nucleares, destacando principalmente a presença de grandes vacúolos, e sugerindo que a vacuolização do núcleo dos espermatozóides reflete defeitos cromossômicos ou do DNA. Berkovitz et al. [78] e Bach et al. [90] relataram que a presença de vacúolos provoca danos ao desenvolvimento embrionário, redução na taxa de gravidez e aumento na taxa de aborto espontâneo. Franco et al. [52, 53] demonstraram uma associação entre grandes vacúolos nucleares e tanto a presença de fragmentação e desnaturação do DNA dos espermatozóides. Além disso, Garolla et al. [68] mostraram que a presença de vacúolos nucleares afeta a função mitocondrial, status da cromatina e taxa de aneuploidia. Oliveira et al. avaliaram a correlação entre MSOME e dano ao DNA e constataram que a presença de vacuolização nuclear acima de 50% seria indicativa de dano ao DNA [55].

Assim, com base nos achados clínico-laboratoriais sobre as repercussões de dano ao DNA possíveis para a prole [91] e considerando que os espermatozóides com vacúolos nucleares são avaliados mais precisamente pelo MSOME, o emprego rotineiro de avaliação morfológica de espermatozóides representaria melhoria em termos de prognóstico, influenciando, conseqüentemente, a decisão terapêutica, principalmente quando técnicas de reprodução assistida são indicadas.

9 Referências Bibliográficas

1. Siegler SL: *Fertility in women; causes, diagnosis and treatment of impaired fertility*. Philadelphia etc.: J.B. Lippincott Company; 1944.
2. Cohen MR: **Intrauterine insemination**. *Int J Fertil* 1962, **7**:235-240.
3. Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, Coulson C, Lambert PA, Watt EM, Desai KM: **Population study of causes, treatment, and outcome of infertility**. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985, **291**:1693-1697.
4. Crosignani PG, Walters DE: **Clinical pregnancy and male subfertility; the ESHRE multicentre trial on the treatment of male subfertility**. *European Society of Human Reproduction and Embryology*. *Hum Reprod* 1994, **9**:1112-1118.
5. Nan PM, Cohlen BJ, te Velde ER, van Kooij RJ, Eimers JM, van Zonneveld P, Habbema JD: **Intra-uterine insemination or timed intercourse after ovarian stimulation for male subfertility? A controlled study**. *Hum Reprod* 1994, **9**:2022-2026.
6. Gregoriou O, Vitoratos N, Papadias C, Konidaris S, Gargaropoulos A, Rizos D: **Pregnancy rates in gonadotrophin stimulated cycles with timed intercourse or intrauterine insemination for the treatment of male subfertility**. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996, **64**:213-216.
7. Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JP, Schats R, Rutten FF, Schoemaker J: **Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis**. *Lancet* 2000, **355**:13-18.
8. Akram A, Imtiaz SA, Jahan S: **Effect of sperm parameters on intrauterine insemination pregnancy rate**. *J Coll Physicians Surg Pak* 2008, **18**:342-346.
9. National Collaborating Centre for Ws, Children's H: *Fertility : assessment and treatment for people with fertility problems*. London: RCOG Press; 2004.
10. Cohlen BJ: **Should we continue performing intrauterine inseminations in the year 2004?** *Gynecol Obstet Invest* 2005, **59**:3-13.
11. Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, Steinkampf MP: **Efficacy of treatment for unexplained infertility**. *Fertil Steril* 1998, **70**:207-213.
12. Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, Vandeput H, Gielen J, Pollet H, Maes M, et al: **Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing**. *Hum Reprod* 1997, **12**:987-993.
13. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP: **Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds**. *Hum Reprod* 2001, **16**:1165-1171.
14. Tartagni M, Cicinelli E, Schonauer MM, Causio F, Petruzzelli F, Loverro G: **Males with subnormal hypo-osmotic swelling test scores have lower pregnancy rates than those with normal scores when ovulation induction and timed intercourse is used as a treatment for mild problems with sperm count, motility, or morphology**. *J Androl* 2004, **25**:781-783.
15. World Health Organization.: *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th edn. Geneva: World Health Organization; 2010.

16. World Health Organization.: *WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interactions*. 2nd edn. Cambridge Cambridgeshire ; New York: Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press; 1987.
17. World Health Organization.: *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. 4th edn. Cambridge, UK ; New York, NY: Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press; 1999.
18. Special Programme of Research Development and Research Training in Human Reproduction (World Health Organization): *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. 3rd edn. Cambridge England ; New York, NY, USA: Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press; 1992.
19. Akanji Tijani H, Bhattacharya S: **The role of intrauterine insemination in male infertility**. *Hum Fertil (Camb)* 2010, **13**:226-232.
20. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, Skakkebaek NE: **Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners**. *Lancet* 1998, **352**:1172-1177.
21. Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, Horte A, Irvine S, Suominen J, Andersen AG, Auger J, et al: **Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities**. *Hum Reprod* 2002, **17**:503-515.
22. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM: **World Health Organization reference values for human semen characteristics**. *Hum Reprod Update* 2010, **16**:231-245.
23. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, et al: **Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men**. *N Engl J Med* 2001, **345**:1388-1393.
24. Montanaro Gauci M, Kruger TF, Coetzee K, Smith K, Van Der Merwe JP, Lombard CJ: **Stepwise regression analysis to study male and female factors impacting on pregnancy rate in an intrauterine insemination programme**. *Andrologia* 2001, **33**:135-141.
25. Hughes EG: **The effectiveness of ovulation induction and intrauterine insemination in the treatment of persistent infertility: a meta-analysis**. *Hum Reprod* 1997, **12**:1865-1872.
26. Horvath PM, Bohrer M, Shelden RM, Kemmann E: **The relationship of sperm parameters to cycle fecundity in superovulated women undergoing intrauterine insemination**. *Fertil Steril* 1989, **52**:288-294.
27. Wainer R, Merlet F, Bailly M, Lombroso R, Camus E, Bisson JP: **[Prognostic sperm factors in intra-uterine insemination with partner's sperm]**. *Contracept Fertil Sex* 1996, **24**:897-903.
28. Berg U, Brucker C, Berg FD: **Effect of motile sperm count after swim-up on outcome of intrauterine insemination**. *Fertil Steril* 1997, **67**:747-750.
29. Dodson WC, Moessner J, Miller J, Legro RS, Gnatuk CL: **A randomized comparison of the methods of sperm preparation for intrauterine insemination**. *Fertil Steril* 1998, **70**:574-575.

30. Khalil MR, Rasmussen PE, Erb K, Laursen SB, Rex S, Westergaard LG: **Homologous intrauterine insemination. An evaluation of prognostic factors based on a review of 2473 cycles.** *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001, **80**:74-81.
31. Miller DC, Hollenbeck BK, Smith GD, Randolph JF, Christman GM, Smith YR, Lebovic DI, Ohl DA: **Processed total motile sperm count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination.** *Urology* 2002, **60**:497-501.
32. Strandell A, Bergh C, Soderlund B, Lundin K, Nilsson L: **Fallopian tube sperm perfusion: the impact of sperm count and morphology on pregnancy rates.** *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003, **82**:1023-1029.
33. Van Voorhis BJ, Barnett M, Sparks AE, Syrop CH, Rosenthal G, Dawson J: **Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization.** *Fertil Steril* 2001, **75**:661-668.
34. Spiessens C, Vanderschueren D, Meuleman C, D'Hooghe T: **Isolated teratozoospermia and intrauterine insemination.** *Fertil Steril* 2003, **80**:1185-1189.
35. Grigoriou O, Pantos K, Makrakis E, Hassiakos D, Konidaris S, Creatas G: **Impact of isolated teratozoospermia on the outcome of intrauterine insemination.** *Fertil Steril* 2005, **83**:773-775.
36. Shibahara H, Obara H, Ayustawati, Hirano Y, Suzuki T, Ohno A, Takamizawa S, Suzuki M: **Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility.** *Int J Androl* 2004, **27**:63-68.
37. Badawy A, Elnashar A, Eltotongy M: **Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination.** *Fertil Steril* 2009, **91**:777-781.
38. Dorjpurev U, Kuwahara A, Yano Y, Taniguchi T, Yamamoto Y, Suto A, Tanaka Y, Matsuzaki T, Yasui T, Irahara M: **Effect of semen characteristics on pregnancy rate following intrauterine insemination.** *J Med Invest* 2011, **58**:127-133.
39. Burr RW, Sieberg R, Flaherty SP, Wang XJ, Matthews CD: **The influence of sperm morphology and the number of motile sperm inseminated on the outcome of intrauterine insemination combined with mild ovarian stimulation.** *Fertil Steril* 1996, **65**:127-132.
40. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ: **Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review.** *Hum Reprod Update* 1998, **4**:73-82.
41. Gunalp S, Onculoglu C, Gurgan T, Kruger TF, Lombard CJ: **A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds.** *Hum Reprod* 2001, **16**:110-114.
42. Kruger TF, Van der Merwe F, Van Waart J: **The Tygerberg strict criteria: what are the clinical thresholds for in vitro fertilization, intrauterine insemination, and in vivo fertilization?** In *Atlas of Human Sperm Morphology Evaluation*. Edited by Kruger TF, Franken DR. London: Taylor and Francis; 2004: 13–18
43. van der Merwe FH, Kruger TF, Oehninger SC, Lombard CJ: **The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population.** *Gynecol Obstet Invest* 2005, **59**:86-91.
44. Toner JP, Mossad H, Grow DR, Morshedi M, Swanson RJ, Oehninger S: **Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial (intrauterine) insemination.** *Andrologia* 1995, **27**:143-148.
45. Ombelet W, Deblaere K, Bosmans E, Cox A, Jacobs P, Janssen M, Nijs M: **Semen quality and intrauterine insemination.** *Reprod Biomed Online* 2003, **7**:485-492.
46. Ombelet W, Vandeput H, Van de Putte G, Cox A, Janssen M, Jacobs P, Bosmans E, Steeno O, Kruger T: **Intrauterine insemination after ovarian stimulation with**

- clomiphene citrate: predictive potential of inseminating motile count and sperm morphology.** *Hum Reprod* 1997, **12**:1458-1463.
47. Lindheim SR, Barad DH, Zinger M, Witt B, Amin H, Cohen B, Fisch H, Barg P: **Abnormal sperm morphology is highly predictive of pregnancy outcome during controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination.** *J Assist Reprod Genet* 1996, **13**:569-572.
 48. Lee RK, Hou JW, Ho HY, Hwu YM, Lin MH, Tsai YC, Su JT: **Sperm morphology analysis using strict criteria as a prognostic factor in intrauterine insemination.** *Int J Androl* 2002, **25**:277-280.
 49. Guven S, Gunalp GS, Tekin Y: **Factors influencing pregnancy rates in intrauterine insemination cycles.** *J Reprod Med* 2008, **53**:257-265.
 50. Hauser R, Yogev L, Botchan A, Lessing JB, Paz G, Yavetz H: **Intrauterine insemination in male factor subfertility: significance of sperm motility and morphology assessed by strict criteria.** *Andrologia* 2001, **33**:13-17.
 51. Grow D, Oehninger S: **Strict criteria for the evaluation of human sperm morphology and its impact on assisted reproduction.** *Andrologia* 1995, **27**:325-333.
 52. Franco JG, Jr., Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L: **Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI.** *Reprod Biomed Online* 2008, **17**:42-45.
 53. Franco Jr JG, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Silva LF, Felipe V, Cavagna M, Pontes A, Baruffi RL, Oliveira JB, Vagnini LD: **Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa.** *Int J Androl* 2011: [Epub ahead of print].
 54. Oliveira JB, Massaro FC, Mauri AL, Petersen CG, Nicoletti AP, Baruffi RL, Franco JG, Jr.: **Motile sperm organelle morphology examination is stricter than Tygerberg criteria.** *Reprod Biomed Online* 2009, **18**:320-326.
 55. Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Silva LF, Vagnini LD, Franco JG, Jr.: **Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage.** *Fertil Steril* 2010, **94**:1937-1940.
 56. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S: **Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study.** *Hum Reprod* 2002, **17**:3122-3128.
 57. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A: **The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI.** *Hum Reprod* 2004, **19**:1401-1408.
 58. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP: **Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic.** *Hum Reprod* 1999, **14**:1039-1049.
 59. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G: **Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team.** *Fertil Steril* 2000, **73**:43-50.
 60. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ: **Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility.** *Fertil Steril* 2003, **79 Suppl 3**:1597-1605.
 61. Muriel L, Meseguer M, Fernandez JL, Alvarez J, Remohi J, Pellicer A, Garrido N: **Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in**

- intrauterine insemination: a blind prospective study.** *Hum Reprod* 2006, **21**:738-744.
62. Berkovitz A, Eltes F, Soffer Y, Zabludovsky N, Beyth Y, Farhi J, Levran D, Bartoov B: **ART success and in vivo sperm cell selection depend on the ultramorphological status of spermatozoa.** *Andrologia* 1999, **31**:1-8.
63. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F: **Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection.** *N Engl J Med* 2001, **345**:1067-1068.
64. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y: **Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome.** *J Androl* 2002, **23**:1-8.
65. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y: **Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection.** *Fertil Steril* 2003, **80**:1413-1419.
66. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, Antinori S: **Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial.** *Reprod Biomed Online* 2008, **16**:835-841.
67. Nadalini M, Tarozzi N, Distratis V, Scaravelli G, Borini A: **Impact of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection on assisted reproduction outcome: a review.** *Reprod Biomed Online* 2009, **19 Suppl 3**:45-55.
68. Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, Selice R, Engl B, Foresta C: **High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status.** *Reprod Biomed Online* 2008, **17**:610-616.
69. Perdrix A, Travers A, Chelli MH, Escalier D, Do Rego JL, Milazzo JP, Mousset-Simeon N, Mace B, Rives N: **Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles.** *Hum Reprod* 2011, **26**:47-58.
70. Boitrelle F, Ferfour F, Petit JM, Segretain D, Tourain C, Bergere M, Bailly M, Vialard F, Albert M, Selva J: **Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation.** *Hum Reprod* 2011, **26**:1650-1658.
71. Wilding M, Coppola G, di Matteo L, Palagiano A, Fusco E, Dale B: **Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa.** *J Assist Reprod Genet* 2011, **28**:253-262.
72. Yazbeck C, Delaroche L, Jacquesson L, J-P A, J S, N R: **Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): is it a good choice after two or more IVF or ICSI failures? .** *Fertil Steril* 2008, **90**:S416.
73. Junca AM, Cohen-Bacrie P, Hazout A: **Improvement of fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic fine morphologically selected sperm injection.** *Fertil Steril* 2004, **82**:S173.
74. Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J: **High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI.** *Reprod Biomed Online* 2006, **12**:19-25.
75. Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, Bartoov B: **How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection.** *Reprod Biomed Online* 2006, **12**:634-638.
76. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, Uher P, Zintz M, Lejeune B, Vanderzwalmen S, et al: **Blastocyst development after sperm**

- selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online* 2008, **17**:617-627.
77. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B: **The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm.** *Hum Reprod* 2005, **20**:185-190.
 78. Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B: **Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome?** *Hum Reprod* 2006, **21**:1787-1790.
 79. Balaban B, Yakin K, Alatas C, Oktem O, Isiklar A, Urman B: **Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized study.** *Reprod Biomed Online* 2011.
 80. Souza Setti A, Ferreira RC, Paes de Almeida Ferreira Braga D, de Cassia Savio Figueira R, Iaconelli A, Jr., Borges E, Jr.: **Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a meta-analysis.** *Reprod Biomed Online* 2010, **21**:450-455.
 81. Tasaka A, Doshida M, Sato Y, Kyoya T, Nakajo Y, Kyono K: **Outcome of IMSI (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection) in patients with repeated ICSI failures.** *Fertil Steril* 2009, **Supplement**:S76.
 82. Berkovitz A, Eltes F, Paul M, Adrian E, Bartoov B: **The chance of having a healthy normal child following intracytoplasmic morphologically-selected sperm injection (IMSI) treatment is higher compared to conventional IVF-ICSI treatment.** *Fertil Steril* 2007, **88**:S20.
 83. Ai L, Liu SY, Huang J, Chen SW, Liu J, Zhong Y: **[Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection of testicular sperm: clinical outcome in azoospermia patients].** *Zhonghua Nan Ke Xue* 2010, **16**:826-829.
 84. Bar-Chama N, Schiff J, Luna M, Dann AB, Copperman JB: **The level of sperm vacuoles in the fresh post-processed sperm sample significantly affects IVF cycle outcomes.** *Fertil Steril* 2007, **88**:S18.
 85. Franken DR, Kruger TF: **The what is a normal spermatozoon? .** In *Atlas of Human Sperm Morphology Evaluation*. Edited by Kruger TF, Franken DR. London: Taylor and Francis; 2004: 49–74
 86. Barth AD, Oko RJ: **Defects of the sperm head.** In *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Edited by Barth AD, Oko RJ. Ames: IS Iowa State University Press; 1988 130–192
 87. Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ: **Fertilization characteristics and in vitro embryo production with bovine sperm containing multiple nuclear vacuoles.** *Mol Reprod Dev* 1998, **50**:328-333.
 88. Bartoov B, Eltes F, Pansky M, Langzam J, Reichart M, Soffer Y: **Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analyses.** *Hum Reprod* 1994, **9**:2069-2075.
 89. Mundy AJ, Ryder TA, Edmonds DK: **A quantitative study of sperm head ultrastructure in subfertile males with excess sperm precursors.** *Fertil Steril* 1994, **61**:751-754.
 90. Bach M, Neyer A, Stecher A, Uher P, Vanderzwalmen P, ZIntz M, Zech N: **Morphological integrity of human sperm nuclei and blastocyst formation after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI).** *Hum Reprod* 2007, **22**:i108–i109.
 91. Carrell DT: **Contributions of spermatozoa to embryogenesis: assays to evaluate their genetic and epigenetic fitness.** *Reprod Biomed Online* 2008, **16**:474-484.

**Efficacy of the motile sperm organelle morphology examination (MSOME)
in predicting pregnancy after intrauterine insemination**

Lívia Drumond Ak1¹, João Batista A Oliveira^{1,2,3*}, Claudia G Petersen^{1,2,3}, Ana L Mauri^{2,3},
Liliane F I Silva^{1,2,3}, Fabiana C Massaro^{2,3}, Ricardo LR Baruffi^{2,3}, Mario Cavagna^{2,3}, José G
Franco Jr^{1,2,3}

¹Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State
University - UNESP, Botucatu, Brazil

²Center for Human Reproduction Prof. Franco Jr, Ribeirão Preto, Brazil

³Paulista Center for Diagnosis, Research and Training, Ribeirão Preto, Brazil

*Corresponding author

E-mails:

LDA: ldak12@yahoo.com.br

JBAO*: joabatista@crh.com.br

CGP: petersenclaudia@crh.com.br

ALM: analucia@crh.com.br

LFIS: liliane@crh.com.br

FCM: fabiana@crh.com.br

RLRB: baruffir@crh.com.br

MC: mariocavagna@crh.com.br

JGF: crh@crh.com.br

Texto padronizado de acordo com as normas de publicação da revista a que foi
enviado: Reproductive Biology and Endocrinology

Abstract

Background: Although motile sperm organelle morphology examination (MSOME) was developed only as a selection criterion, its application as a method for classifying sperm morphology may represent an improvement in the evaluation of semen quality. This study aimed to determine the prognostic value of normal sperm morphology by MSOME regarding clinical pregnancy (CP) after intrauterine insemination (IUI).

Method: A total of 156 IUI cycles performed in 111 couples were prospectively analyzed. All subjects received 75IU recombinant FSH every other day from the third day of the cycle. On the 10th day of the cycle, follicular development started to be monitored by vaginal ultrasound. When one or two follicles measuring ≥ 17 mm were observed, recombinant hCG was administered and IUI was performed 12-14h and 36-40h after hCG. Before the IUI procedure, sperm samples were analyzed according to MSOME at 8400x magnification with an inverted microscope equipped with DIC/Nomarski differential interference contrast optics. At least 200 motile spermatozoa per semen sample were evaluated and percentages of normal spermatozoa were determined.

Results: Pregnancy occurred in 34 IUI cycles (CP rate per cycle: 21.8%, per patient: 30.6%). A statistically significant higher incidence of normal spermatozoa according to the MSOME criterion was found in the group of men in which IUI cycles resulted in pregnancy ($2.6 \pm 3.1\%$) compared to the group that did not achieve pregnancy ($1.2 \pm 1.7\%$; $P=0.019$). Logistic regression showed that the percentage of normal cells in the MSOME was determinant for the likelihood of clinical pregnancy (OR: 1.28; 95% CI: 1.08 to 1.51; $P=0.003$). The ROC curve showed an area under the curve of 0.63 and an optimum cut-off point of 2% of normal sperm form. At this cut-off level, the ability of the percentage of sperm normal form by MSOME to predict pregnancy present 50% sensitivity, 40% positive predictive value, 79% specificity, and 85% negative predictive value. The efficacy of the percentage of sperm normal form by MSOME in predicting pregnancy was 65%.

Conclusion: The present findings support the use of high-magnification microscopy not only for selecting spermatozoa but also as a routine method for semen analysis before indicating IUI.

Keywords: intrauterine insemination; msome; sperm morphology; pregnancy rate.

Background

Intrauterine insemination (IUI) is a simple and noninvasive procedure used to treat couple subfertility, which allows, in many cases, to avoid more complex assisted reproduction techniques (ART), such as in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). On the other hand, IUI yields discrepant results, with doubts about its actual effectiveness as a consequence of the large number of variables involved in the treatment, such as the etiology of infertility, women's and men's age, ovarian stimulation protocols, timing and number of inseminations [1]. The most common indications for IUI are cervical hostility, mild male factor, mild endometriosis, ovarian dysfunction, and unexplained infertility [2]. Regarding male infertility, there is insufficient evidence about the effectiveness of IUI, and more data are necessary to recommend or advise against IUI in these situations [3]. Since one of the most common indications for IUI is mild male factor, and in view of the doubts about the efficacy of the procedures with respect to this indication, it would be of great clinical interest to determine semen parameters that could work as predictive factors.

Innovative methods for the selection of sperm in ART [4-9] have been published, giving a new insight into the correlation between sperm quality and clinical results. On the other hand, the value of traditional semen analysis has been the object of discussion. Via analysis of semen, clinicians expect to obtain a clear indication of fertilization potential, which, except in particular situations (total teratozoospermia, globozoospermia), conventional evaluation does not provide [10, 11]. Although none of the semen parameters (or even the functional test), either in isolation or jointly, could be considered definitive, morphology has been shown, consistently, to be the best indicator of male fertility. Diverse studies, originating principally from IVF/ICSI programmes and IUI, corroborate the sensitivity of morphology as a prognostic factor [10-20].

To test the hypothesis that subtle sperm organelle malformations [21, 22] Bartoov *et al.*, 2001) could be associated with the ART result, Bartoov *et al.* [23, 24] developed a method of human spermatozoa evaluation performed in real time at high magnification, which was called motile sperm organelle morphology examination (MSOME). MSOME is performed using an inverted microscope equipped with interferential contrast Nomarski optics, which enables a magnification of >6000x [23], much higher than the magnification used habitually by embryologists in spermatozoa selection for the ICSI procedure (200x to 400x) or even that employed in routine semen examination (1000x). This method favored the development of the intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI), based on sperm normality

as defined by the MSOME classification, aiming at improving conventional ICSI outcomes by giving attention to the existence of a correlation between sperm morphological abnormalities observed at high magnification and DNA damage [24-28]. Although MSOME was developed only as a selection criterion, its application as a method for classifying sperm morphology may represent an improvement in the evaluation of semen quality. In the specific case of IUI, seminal evaluation performing MSOME could represent an adjuvant tool in order to predict the efficacy of the technique.

To better comprehend the diagnostic/prognostic value of morphologic analysis of semen by high magnification, this study aimed to evaluate the prognostic value of normal sperm morphology by MSOME classification for clinical pregnancy (CP) after IUI.

Methods

Study participants

A total of 156 IUI cycles performed in 111 couples at the Center for Human Reproduction Professor Franco Junior were prospectively analyzed. Females' and males' mean ages at the time of IUI cycles were 32.7 ± 3.9 and 35.4 ± 5.6 years, respectively. Indications for the procedure were idiopathic infertility in 51.4%, mild male infertility in 23.4%, cervical factor in 15.3%, ovulatory dysfunction in 5.4%, mild endometriosis in 3.6%, and male factor associated with endometriosis in 0.9% (Table 1). Written informed consent was obtained from all couple on the day of first IUI. This study received institutional review board approval.

IUI procedures

For ovarian stimulation, all subjects received 75IU recombinant FSH (r-FSH; Gonal F, Serono, Brazil) every other day from the third day of the cycle. On the 10th day of the cycle, follicular development started to be monitored by vaginal ultrasound, with the doses of r-FSH being adapted according to ovarian response. When one or two follicles (maximum=2) measuring ≥ 17 mm were observed, recombinant hCG (r-hCG; Ovidrel, Serono, Brazil) was administered.

All patients underwent two consecutive IUI procedures (12-14h and 36-40h after r-hCG). Semen samples were collected in sterile containers by masturbation and immediately taken for IUI procedures. The liquefied fresh semen samples were prepared by Isolate (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) discontinuous concentration gradient. The final pellet was resuspended in 0.5ml modified HTF medium (Irvine) supplemented with 10% human serum albumin (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) for the first insemination (12-14h) and in 0.3ml for the second insemination (36-40h).

All IUI were carried out with a Frydman catheter (Frydman[®] Classic Catheter 4.5 CCD Laboratoire C.C.D; Paris, France) guided by abdominal ultrasound using a 3.5MHz convex transducer (Aloka SSD-1100; Aloka Co. Ltd, Tokyo, Japan) by the same physician. Patients with a full bladder were placed in the lithotomy position and the cervix was exposed using a bivalve speculum. In all IUI the catheter passed smoothly through the cervix without the need for uterine fixation clamps with clear visualization of the catheter tip upon ultrasound. In all inseminations, the medium containing the spermatozoa was gently expelled into the uterine

cavity under ultrasound monitoring. The catheter was immediately and carefully removed after IUI, and the patient was allowed to rest in bed for 15min. All patients received luteal phase supplementation with vaginal natural progesterone.

Pregnancy was diagnosed based on an increase in serum β -hCG concentration 14 days after IUI. Clinical pregnancy was defined by the presence of a gestational sac accompanied by an image of the embryo/fetal cardiac activity on transvaginal ultrasounds 4 weeks after IUI.

Determination of morphology by MSOME

Before the IUI procedure semen samples were analyzed for MSOME, for standard semen quality parameters according to the World Health Organization [29] and for DNA fragmentation by TUNEL assay (as previous described [30, 31]).

For MSOME the liquefied fresh semen samples were prepared by Isolate (Irvine Scientific, USA) discontinuous concentration gradient. The final pellet was resuspended in 0.2 ml modified human tubal fluid (HTF) medium (Irvine Scientific). An aliquot of 1 μ l of sperm cell suspension was transferred to a 5 μ l microdroplet of modified HTF medium containing 7% polyvinylpyrrolidone solution (PVP medium; Irvine Scientific). This microdroplet was placed in a sterile glass dish (FluoroDish; Word Precision Instrument, USA) under sterile paraffin oil (Ovoil-100; VitroLife, Goteborg, Sweden). The sperm cells, suspended in the microdroplet, were placed on a microscope stage above an Uplan Apo x100 oil/1.35 objective lens previously covered by a droplet of immersion oil. In this manner, suspended motile sperm cells in the observation droplet could be examined at high magnification by an inverted microscope (Eclipse TE 2000U; Nikon, Japan) equipped with high-power differential interference contrast optics (DIC/Nomarski). The images were captured by a color video camera containing effective picture elements (pixel) for high quality image production, and a color video monitor. Morphological evaluation was accomplished on a monitor screen and the total calculated magnification was 8400x (total magnification: objective magnification = 100 x magnification selector = 1.0 x video coupler magnification = 1.0 x calculated video magnification = 84.50).

A spermatozoon was classified as morphologically normal when it exhibited a normal nucleus as well as acrosome, postacrosomal lamina, neck and tail, besides not presenting cytoplasm around the head [23]. The subcellular organelles were morphologically classified on the basis of the presence of specific malformations, which were defined according to the arbitrary descriptive approach reported by Bartoov et al. [23] after studies utilizing

transmission and scanning electron microscopy: acrosome: absent, partial or vesiculated; post-acrosomal lamina: absent or vesiculated; neck: abaxial, disordered or showing cytoplasmic droplet; tail: absent, coiled, broken, multi or short.

For the nucleus, also according to transmission electron microscopy estimations [23, 32], the morphological normal state was defined by the shape and content of the chromatin. The criterion for normality of nuclear shape was a smooth, symmetric and oval configuration. Normal means for length and width were estimated as 4.75 ± 2.8 and $3.28\pm 0.20\mu\text{m}$ [23] respectively, where the form classified as abnormal presented variation of 2SD on at least one of the axes (length: ≥ 5.31 or $\leq 4.19\mu\text{m}$, width: > 3.7 or $< 2.9\mu\text{m}$). For rapid evaluation of nuclear shape, a fixed, transparent, celluloid form of sperm nucleus fitting the criteria was superimposed on the examined cell (chablon construction based on ASTM E 1951-2[33]). The criterion for normality of chromatin content was the absence of vacuoles occupying $> 4\%$ of the sperm nuclear area. Figure 1A shows normal spermatozoa analyzed by MSOME.

The same technician performed all sperm selection. At least 200 motile spermatozoa per sample were evaluated and the percentages of normal spermatozoa were determined. The analysis lasted 30-60 min/sample.

Statistical analysis

Data management and univariate analysis were conducted using the StatsDirect statistical software (Cheshire, UK) in order to compare the variables between the group of cycles in which IUI procedure resulted in pregnancy and the group that IUI procedure did not result in pregnancy. The analysis was done at cycle level, i.e., each cycle was considered as a separate unit of analysis. To compare the means for the continuous variables, non-parametric Mann-Whitney tests were used if the continuous variables were not normally distributed and Student's t test if the continuous variables were normally distributed. The results were expressed as the arithmetic mean \pm standard deviation (SD), range and median. For categorical variables, chi-squared test was used to check their association between the groups. The results were expressed as percentage. Univariate Logistic regression was also used to estimate the value of an independent variable in to predict the chance of becoming pregnant in an IUI cycle. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) constituted the descriptive analysis.

Receiver operating characteristic curve (ROC) were constructed to examine the performance of the significant variables (as highlighted by the previous statistical tests), i.e.,

to evaluate the ability of a variable to predict pregnancy occurrence after an IUI cycle. Optimized threshold was determined. Discriminative performance of the model was assessed by the area under the ROC curve. Sensitivity was defined as the fraction of cycles that resulted in a pregnancy that was predicted correctly, and specificity was defined as the fraction of cycles not resulting in a pregnancy that was predicted correctly. StatsDirect requires two columns of data for each ROC plot, one with test results in cases where the condition tested for is known to be present (pregnancy positive) and another for test results in known negative (pregnancy negative) cases. Sensitivity is then plotted against 1-specificity. StatsDirect calculates the area under the ROC curve directly by an extended trapezoidal rule [34] and by a non-parametric method analogous to the Wilcoxon/Mann-Whitney test [35]. A confidence interval is constructed using DeLong's variance estimate [36].

Results

Pregnancy occurred in 34 IUI cycles (CP rate per cycle: 21.8%, per patient: 30.6%). A statistically significant higher incidence of normal spermatozoa by the MSOME criterion was found in the group of men in which IUI cycles resulted in pregnancy ($2.6\pm 3.1\%$) compared to the group that did not achieve pregnancy ($1.2\pm 1.7\%$; $P=0.019$). The laboratory and clinical parameters evaluated according to IUI outcome are shown in Table 1. With the exception of the percentage of normal spermatozoa, there were not differences between the groups.

Logistic regression showed that the percentage of normal cells in the MSOME was determinant for the likelihood of clinical pregnancy (OR: 1.28 95% CI 1.08 to 1.51; $P=0.003$). On the other hand, logistic regression did not reveal a statistically significant ($P>0.05$) association between IUI outcome (CP) and other parameters analyzed such as women's age (OR: 0.96; 95% CI 0.88 to 1.06) and men's age (OR: 0.98; 95% CI 0.91 to 1.05), duration of infertility (OR: 0.81; 95% CI 0.63 to 1.03), DNA fragmentation (OR: 0.97; 95% CI 0.97 to 1.02), number of follicles ≥ 17 (OR: 1.40; 95% CI 0.53 to 5,21), other semen characteristics: total sperm count (OR: 1.00; 95% CI 0.99 to 1.00), progression motility (OR:0.98; 95% CI 0.95 to 1.00), and leukocytes (OR:1.77; 95% CI 0.46 to 6.70). Table 2 summarizes the results.

ROC curve was created just for percentage of sperm normal forms by MSOME (the only variable that showed a significant difference between the groups in previous analysis). ROC curve (Figure 2) showed an area under the curve (see Materials and methods) of 0.63 (95% confidence interval: 0.52–0.78) indicating that the percentage of normal forms by MSOME had a reasonable prognostic potency in predict pregnancy after IUI. Setting the threshold at 2% offered the best compromise between specificity (50%) and sensitivity (79%) and between positive predictive value (40%) and negative predictive value (85%). At this cut-off level the efficacy of the percentage of sperm normal form by MSOME in predicting pregnancy was 65%.

Discussion

The rationale for the IUI procedure is to maximize the number of motile spermatozoa at the site of fertilization in order to increase the possibilities of pregnancy. Although IUI is widely used in the treatment of couple subfertility, its real efficacy remains to be proved, especially when the technique is employed in the presence of male subfertility [1]. According to Merviel *et al* [37], the most important predictive factors for pregnancy in IUI cycles are the recruitment of two preovulatory follicles >16 mm in a woman aged ≤ 30 years and a concentration ≥ 5 million motile spermatozoa and teratospermia $\leq 70\%$ after preparation of semen by a discontinuous concentration gradient. Another investigation has reported that IUI performed for male factor subfertility has a low possibility of success when the woman's age is > 35 years, the number of motile spermatozoa inseminated is <5 million, or normal sperm morphology, defined by the criteria of the World Health Organization, is $<30\%$ [38].

On the other hand, Dorjpurev *et al.*[39] have shown that, in the presence of motility rates $\geq 30\%$ and motile sperm concentration ≥ 10 million/mL, IUI could be a useful tool for male subfertility treatment. Kamath *et al.*[40] reported that duration of infertility less than 5 years and more than 10 million total motile spermatozoa are related to a better prognosis in IUI, and found a trend toward a higher pregnancy rate with endometrial thickness >6 mm. Wainer *et al.* [41] reported that a minimum of 5 million motile spermatozoa should be inseminated only when the normal morphology of the sperm after preparation is $<30\%$, because the quantity compensates at least in part for the poor seminal quality, and if these parameters cannot be reached, in vitro fertilization should be recommended. Other clinical parameters have also been evaluated, such as the comparison of recombinant FSH and highly purified FSH for ovarian stimulation [42], the use of GnRH antagonists to avoid a premature LH surge [43, 44], association of chromatin condensation of spermatozoa with conventional semen parameters [45], and the use of soft versus firm catheters for the insemination procedure [46], aiming at finding predictive factors of the chances of pregnancy rates in IUI. Sperm morphological alterations seem to determine significantly poorer outcomes in IUI [37, 47, 48] and have been reported to be one of the most relevant semen parameters when compared to sperm concentration and sperm motility [49]. Karabinus and Gelety [50] stated that pregnancy rates per cycle after IUI were not different when the percentage of morphologically normal sperm (strict criteria) in raw semen was 5%, 5% to 9%, 10% to 19%, 20% to 29%, and $\geq 30\%$ ($6.55 \pm 3.9\%$, $13.6\% \pm 3.2\%$, $8.8\% \pm 2.4\%$, $7.1\% \pm 2.5\%$, and $9.7\% \pm 3.3\%$, respectively). Thus, the authors concluded that IUI appears to be a successful

treatment modality for male factor infertility, even when the percentage of morphologically normal sperm in raw semen is very low.

On the other hand, morphological criteria for the assessment of spermatozoa quality according to parameters of the World Health Organization have been recently modified (normal morphology cut-off value of $> 4\%$, in the 2010 WHO manual) [51], demonstrating that there are still controversies about what a morphologically normal spermatozoon would be. It would be of great clinical utility to set up a laboratory parameter that would be able to predict the outcomes of IUI in a more efficient way, in order to improve the outcomes as well as to optimize the indications of the technique. Recently, our group suggested that MSOME should be included among the routine criteria for semen analysis, given that it is a much stricter criterion of sperm morphology classification when compared to the Tygerberg criterion [27]. One of the most important alterations that can be observed in MSOME is the presence of large nuclear vacuoles (LNV/ Figure 1B). We consider LNV those that occupy more than 50% of the nuclear area [52]. LNV are specific sperm alterations observed at high magnification, and their presence has been related to poor outcomes in ART [53] and to DNA fragmentation and denaturation[31]. Moreover, a recent study has related LNV to the absence of acrosome reaction, which could have deleterious effects on the process of fertilization and embryo development [54]. On the other hand, it is well established that the capacity of human sperm to fertilize an oocyte and to produce an embryo with a high potential of implantation and development depends on DNA integrity [55], so that the MSOME could provide important information about the possibilities of success of ART.

Many investigations have reported the outcomes of in vitro fertilization techniques according to MSOME [24, 25, 32, 52, 56-59], but this evaluation was never employed to determine the success rates of IUI. The present investigation studied the outcomes of IUI comparing semen morphology by MSOME. We observed significantly better pregnancy rates with a higher percentage of normal cells according to MSOME parameters. However, logistic regression analysis was not able to identify a significant correlation of other characteristics, such as patients' age, duration of infertility, number of follicles and other semen parameters with the outcomes of treatment. This disagrees with other results reported in the literature [1, 37, 39], which clearly show the difficulties to find prognostic parameters for IUI outcomes.

With regard of the percentage of morphologically normal spermatozoa, we observed an optimum cut-off point of 2%. With this cut-off point, the efficacy of the exam in predicting pregnancy with IUI reached 65%, according to the ROC curve. Since there are doubts about

the efficacy of IUI for male factor, MSOME could also play a role as a method of classification of sperm morphology, in order to offer another parameter for indication of the technique. Besides woman's age, duration of infertility and concentration of motile spermatozoa, predictive factors considered important by other investigations, our data suggest that 2% of morphologically normal spermatozoa at MSOME are desirable to obtain better chances of pregnancy with IUI.

In conclusion, the present study suggests that the use of MSOME for semen evaluation could be a good predictor of incidence of normal forms in the sperm sample. Performing MSOME prior to the IUI procedure could represent an important tool in order to support or to contraindicate this less expensive treatment, and eventually contribute to the indication of more complex ART procedures, avoiding loss of time. The present findings support the use of high-magnification microscopy not only for selecting spermatozoa but also as a routine method for semen analysis with potential clinical repercussions.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LDA was responsible for designing and coordinating the study. All authors were responsible for data collection, data analysis, and data interpretation presented in the manuscript. JBAO, RLRB, MC and JGF were responsible for the statistical work and for writing of the manuscript. JBAO and JGF were responsible for reviewing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Group TECW: **Intrauterine insemination.** *Hum Reprod Update* 2009, **15**:265-277.
2. Marchetti C, Dewailly D: **[Intrauterine insemination: indications and methods].** *Rev Prat* 2006, **56**:500-506.
3. Bendsdorp AJ, Cohlen BJ, Heineman MJ, Vandekerckhove P: **Intra-uterine insemination for male subfertility.** *Cochrane Database Syst Rev* 2007:CD000360.
4. Baccetti B: **Microscopical advances in assisted reproduction.** *J Submicrosc Cytol Pathol* 2004, **36**:333-339.
5. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Capitani S, Baccetti B: **Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection.** *Fertil Steril* 2010, **93**:807-813.
6. Petersen CG, Vagnini LD, Mauri AL, Massaro FC, Cavagna M, Baruffi RL, Oliveira JB, Franco JG, Jr.: **Relationship between DNA damage and sperm head birefringence.** *Reprod Biomed Online* 2011, **22**:583-589.
7. Razavi SH, Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Shayesteh M, Tavalae M: **Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity.** *Andrologia* 2010, **42**:13-19.
8. Prinosilova P, Kruger T, Sati L, Ozkavukcu S, Vigue L, Kovanci E, Huszar G: **Selectivity of hyaluronic acid binding for spermatozoa with normal Tygerberg strict morphology.** *Reprod Biomed Online* 2009, **18**:177-183.
9. Petersen CG, Massaro FC, Mauri AL, Oliveira JB, Baruffi RL, Franco JG, Jr.: **Efficacy of hyaluronic acid binding assay in selecting motile spermatozoa with normal morphology at high magnification.** *Reprod Biol Endocrinol* 2010, **8**:149.
10. Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, Vandeput H, Gielen J, Pollet H, Maes M, et al: **Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing.** *Hum Reprod* 1997, **12**:987-993.
11. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP: **Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds.** *Hum Reprod* 2001, **16**:1165-1171.
12. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ: **Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review.** *Hum Reprod Update* 1998, **4**:73-82.

13. Gunalp S, Onculoglu C, Gurgan T, Kruger TF, Lombard CJ: **A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds.** *Hum Reprod* 2001, **16**:110-114.
14. Kruger T, Van der Merwe F, Van Waart J: **The Tygerberg strict criteria: what are the clinical thresholds for in vitro fertilization, intrauterine insemination, and in vivo fertilization?** In *Atlas of Human Sperm Morphology Evaluation*. Edited by Kruger T, Franken D. London: Taylor and Francis; 2004: 13–18
15. van der Merwe FH, Kruger TF, Oehninger SC, Lombard CJ: **The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population.** *Gynecol Obstet Invest* 2005, **59**:86-91.
16. Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukcuoglu S, Kahraman S, Biberoglu K: **Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans.** *Hum Reprod* 1997, **12**:1214-1217.
17. De Vos A, Van De Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A: **Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection.** *Fertil Steril* 2003, **79**:42-48.
18. Baccetti B, Capitani S, Collodel G, Estenoz M, Gambera L, Piomboni P: **Infertile spermatozoa in a human carrier of robertsonian translocation 14;22.** *Fertil Steril* 2002, **78**:1127-1130.
19. Chemes EH, Rawe YV: **Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men.** *Hum Reprod Update* 2003, **9**:405-428.
20. Palermo GD, Neri QV, Takeuchi T, Rosenwaks Z: **ICSI: where we have been and where we are going.** *Semin Reprod Med* 2009, **27**:191-201.
21. Berkovitz A, Eltes F, Soffer Y, Zabludovsky N, Beyth Y, Farhi J, Levran D, Bartoov B: **ART success and in vivo sperm cell selection depend on the ultramorphological status of spermatozoa.** *Andrologia* 1999, **31**:1-8.
22. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F: **Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection.** *N Engl J Med* 2001, **345**:1067-1068.

23. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y: **Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome.** *J Androl* 2002, **23**:1-8.
24. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y: **Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection.** *Fertil Steril* 2003, **80**:1413-1419.
25. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, Antinori S: **Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial.** *Reprod Biomed Online* 2008, **16**:835-841.
26. Nadalini M, Tarozzi N, Distratis V, Scaravelli G, Borini A: **Impact of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection on assisted reproduction outcome: a review.** *Reprod Biomed Online* 2009, **19 Suppl 3**:45-55.
27. Oliveira JB, Massaro FC, Mauri AL, Petersen CG, Nicoletti AP, Baruffi RL, Franco JG, Jr.: **Motile sperm organelle morphology examination is stricter than Tygerberg criteria.** *Reprod Biomed Online* 2009, **18**:320-326.
28. Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Silva LF, Vagnini LD, Franco JG, Jr.: **Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage.** *Fertil Steril* 2010, **94**:1937-1940.
29. World Health Organization.: *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.* 5th edn. Geneva: World Health Organization; 2010.
30. Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, Oliveira JB, Franco JG, Jr.: **The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population.** *Reprod Biomed Online* 2007, **15**:514-519.
31. Franco JG, Jr., Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L: **Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI.** *Reprod Biomed Online* 2008, **17**:42-45.
32. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B: **The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm.** *Hum Reprod* 2005, **20**:185-190.

33. ASTM: **Standard E1951-02 Physical and Mechanical Testing Standards West Conshohocken, PA.** [<http://www.astm.org>] DOI:10.1520/E1951-02R07 2007
34. Press WH: *Numerical recipes in FORTRAN : the art of scientific computing*. 2nd edn. Cambridge England ; New York, NY, USA: Cambridge University Press; 1992.
35. Hanley JA, McNeil BJ: **The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve.** *Radiology* 1982, **143**:29-36.
36. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL: **Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach.** *Biometrics* 1988, **44**:837-845.
37. Merviel P, Heraud MH, Grenier N, Lourdel E, Sanguinet P, Copin H: **Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): an analysis of 1038 cycles and a review of the literature.** *Fertil Steril* 2010, **93**:79-88.
38. Badawy A, Elnashar A, Eltotongy M: **Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination.** *Fertil Steril* 2009, **91**:777-781.
39. Dorjpurev U, Kuwahara A, Yano Y, Taniguchi T, Yamamoto Y, Suto A, Tanaka Y, Matsuzaki T, Yasui T, Irahara M: **Effect of semen characteristics on pregnancy rate following intrauterine insemination.** *J Med Invest* 2011, **58**:127-133.
40. Kamath MS, Bhave P, Aleyamma T, Nair R, Chandy A, Mangalaraj AM, Muthukumar K, George K: **Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination: A prospective study of factors affecting outcome.** *J Hum Reprod Sci* 2010, **3**:129-134.
41. Wainer R, Albert M, Dorion A, Bailly M, Bergere M, Lombroso R, Gombault M, Selva J: **Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and of their morphology on the success of intrauterine insemination.** *Hum Reprod* 2004, **19**:2060-2065.
42. Matorras R, Osuna C, Exposito A, Crisol L, Pijoan JI: **Recombinant FSH versus highly purified FSH in intrauterine insemination: systematic review and metaanalysis.** *Fertil Steril* 2011, **95**:1937-1942 e1933.
43. Allegra A, Marino A, Coffaro F, Scaglione P, Sammartano F, Rizza G, Volpes A: **GnRH antagonist-induced inhibition of the premature LH surge increases pregnancy rates in IUI-stimulated cycles. A prospective randomized trial.** *Hum Reprod* 2007, **22**:101-108.

44. Cantineau AE, Cohlen BJ, Klip H, Heineman MJ: **The addition of GnRH antagonists in intrauterine insemination cycles with mild ovarian hyperstimulation does not increase live birth rates--a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial.** *Hum Reprod* 2011, **26**:1104-1111.
45. Lazaros L, Kaponis A, Vartholomatos G, Hatzi E, Botsari S, Plachouras N, Makrydimas G, Zikopoulos K, Sofikitis N, Georgiou I: **Using semen flow cytometry to evaluate association of ploidy status and chromatin condensation of spermatozoa with conventional semen parameters: clinical application in intrauterine insemination.** *Fertil Steril* 2011, **95**:110-115.
46. van der Poel N, Farquhar C, Abou-Setta AM, Benschop L, Heineman MJ: **Soft versus firm catheters for intrauterine insemination.** *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD006225.
47. Burr RW, Sieberg R, Flaherty SP, Wang XJ, Matthews CD: **The influence of sperm morphology and the number of motile sperm inseminated on the outcome of intrauterine insemination combined with mild ovarian stimulation.** *Fertil Steril* 1996, **65**:127-132.
48. Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Plachot M: **[Intra-uterine insemination].** *Contracept Fertil Sex* 1999, **27**:614-619.
49. Guerif F: **[Which assisted reproduction technique as a function of sperm morphology?].** *Gynecol Obstet Fertil* 2010, **38**:508-510.
50. Karabinus DS, Gelety TJ: **The impact of sperm morphology evaluated by strict criteria on intrauterine insemination success.** *Fertil Steril* 1997, **67**:536-541.
51. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM: **World Health Organization reference values for human semen characteristics.** *Hum Reprod Update* 2010, **16**:231-245.
52. Oliveira JB, Petersen CG, Massaro FC, Baruffi RL, Mauri AL, Silva LF, Ricci J, Franco JG, Jr.: **Motile sperm organelle morphology examination (MSOME): intervariation study of normal sperm and sperm with large nuclear vacuoles.** *Reprod Biol Endocrinol* 2010, **8**:56.
53. Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B: **Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome?** *Hum Reprod* 2006, **21**:1787-1790.

54. Kacem O, Sifer C, Barraud-Lange V, Ducot B, De Ziegler D, Poirot C, Wolf J: **Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin.** *Reprod Biomed Online* 2010, **20**:132-137.
55. Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, Selice R, Engl B, Foresta C: **High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status.** *Reprod Biomed Online* 2008, **17**:610-616.
56. Junca A, Cohen-Bacrie P, Hazout A: **Improvement of fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic fine morphologically selected sperm injection.** *Fertil Steril* 2004, **82**:S173.
57. Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J: **High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI.** *Reprod Biomed Online* 2006, **12**:19-25.
58. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, Uher P, Zintz M, Lejeune B, Vanderzwalmen S, et al: **Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles.** *Reprod Biomed Online* 2008, **17**:617-627.
59. Tasaka A, Doshida M, Sato Y, Kyoya T, Nakajo Y, Kyono K: **Outcome of IMSI (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection) in patients with repeated ICSI failures.** *Fertil Steril* 2009, **92**:S76.

Table 1: Clinical and laboratory parameters evaluated according to IUI outcomes

Parameters	Total	Pregnancy (n=34)	No Pregnancy (n=122)	<i>P</i>
Women's age(years) Mean±SD	32.8±3.9	32.3±4.0	32.9±3.9	0.45
Range	24-39	25-39	24-39	
Median	33	33	33	
Men's age(years) Mean±SD	35.5±5.6	34.9±5.0	35.5±5.7	0.59
Range	24-50	27-48	24-50	
Median	34	35	34	
Duration of infertility (years) Mean±SD	2.8±1.9	2.4±1.9	2.9±1.9	0.25
Range	1-13	1-10	1-13	
Median	2	2	2	
M SOME (%)				
-Normal spermatozoa Mean±SD	1.5±2.2	2.6±3.1	1.2±1.2	0.019
Range	0-13	0-13	0-13	
Median	1	1.5	0.5	
Follicles ≥17 mm (n) Mean±SD	1.2±0.4	1.2±0.4	1.2±0.4	0.64
Range	1-2	1-2	1-2	
Median	1	1	1	
Etiology				
-Idiopathic	51.4%(57/111)	46.2%(12/26)	52.9%(45/85)	0.66
-Male (mild)	23.4%(26/111)	30.8%(8/26)	21.2%(18/85)	
-Cervical	15.3%(17/111)	19.2%(5/26)	14.1%(12/85)	
-Ovulatory	5.4%(6/111)	3.8%(1/26)	5.9%(5/85)	
-Endometriosis	3.6%(4/111)	0	4.7%(4/85)	
-Male (mild) + Endometriosis	0.9%(1/111)	0	1.2%(1/85)	
DNA fragmentation (%) Mean±SD	16.4±8.0	15.0±7.4	16.7±8.1	0.26
Range	3-37.5	5-35.5	3-37.5	
Median	15	12	15	
Total sperm count (x10 ⁶ /ml) Mean±SD	79.2±54.4	83.6±43.4	78±57.2	0.24
Range	5-280	15-160	5-280	
Median	68.5	86	62	
Motility (% spermatozoa) (rapid + slow progression) Mean±SD	63.2±15.4	59.7±14.9	64.2±14.5	0.12
Range	19-93	19-87	19-93	
Median	63	60	66	
Leukocytes (x10 ⁶) Mean±SD	0.26±0.26	0.30±0.28	0.25±0.26	0.34
Range	0-1.6	0-1.3	0-1.6	
Median	0.2	0.2	0.2	

Table 2: Univariate analysis of pregnancy occurrence after intrauterine insemination by Logistic regression

Parameters	Logistic Regression		
	Odds Ratio	95% CI	<i>P</i>
Women's age (years)	0.96	0.87 to 1.06	0.44
Men's age (years)	0.98	0.91 to 1.05	0.61
Duration of infertility (years)	0.81	0.63 to 1.03	0.10
MSOME (%)			
-Normal spermatozoa	1.28	1.08 to 1.51	0.003
Follicles ≥ 17 mm (n)	1.40	0.53 to 3.68	0.49
DNA fragmentation (%)	0.97	0.97 to 1.02	0.26
Total sperm count ($\times 10^6$ /ml)	1.00	0.99 to 1.01	0.59
Motility (% spermatozoa)(rapid + slow progression)	0.98	0.96 to 1.01	0.13
Leukocytes ($\times 10^6$) (mean \pm SD)	1.77	0.46 to 6.70	0.39

CI: confidence interval

Figure Legends

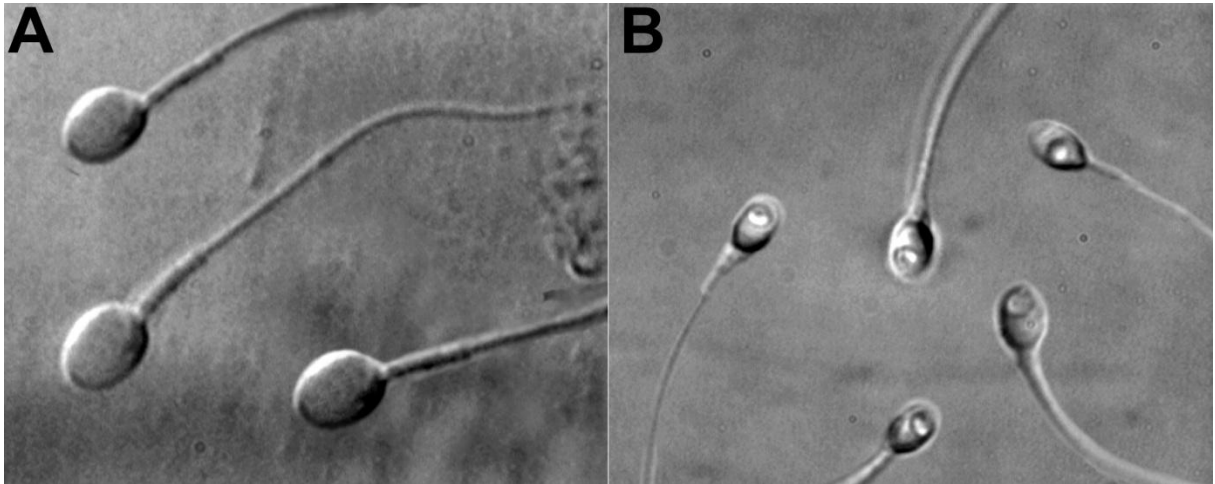


Figure 1. **A** Normal spermatozoa observed at high magnification (8400x); **B** Spermatozoa with large nuclear vacuoles observed at high magnification (8400x).

Sensitivity

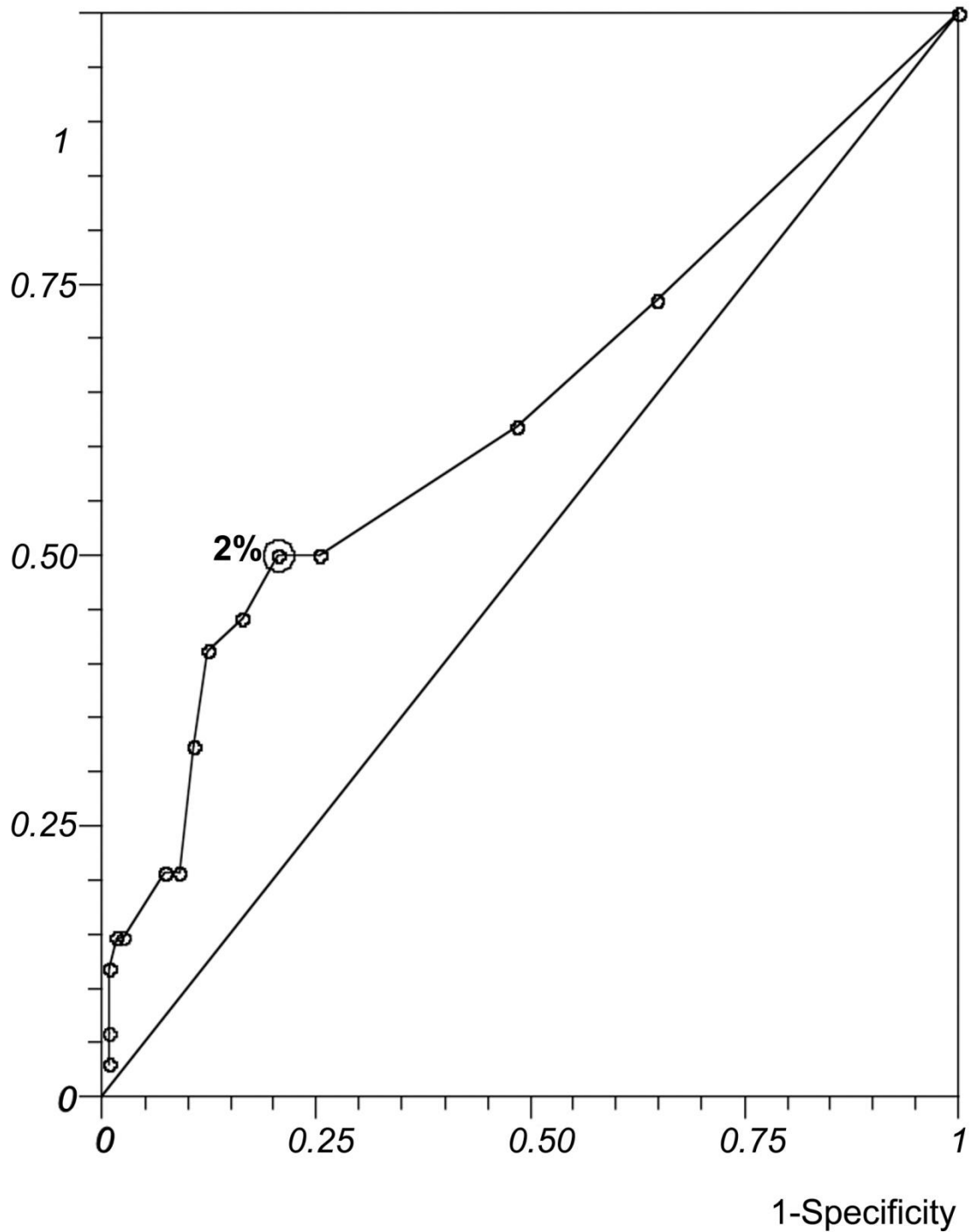


Figure 2. ROC Curve Analysis for percentage of sperm normal forms by MSOME as prognostic factor regarding clinical pregnancy after intrauterine insemination. Area under the curve 0.63. The best discriminating percentage (2%) is indicated. At this cut-off level, the ability of the percentage of sperm normal form by MSOME to predict pregnancy present 50% sensitivity, 40% positive predictive value, 79% specificity, and 85% negative predictive value. The efficacy was 65%.

ANEXO A

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Eficácia do *motile sperm organelle morphology examination* (MSOME) na predição de gravidez após inseminação intrauterina

Você em breve será submetida à inseminação intrauterina (no útero) com espermatozóides do seu esposo para tratamento de infertilidade / Sua esposa em breve será submetida à inseminação intrauterina (no útero) com seus espermatozóides para tratamento de infertilidade. Por isso estão sendo convidados a participar de um estudo clínico que envolve exame de avaliação da morfologia (formas) dos espermatozóides

Nos últimos anos, muitas mulheres com problemas para engravidar têm-se submetido às Técnicas de Reprodução Assistida, que envolvem vários tratamentos, como a inseminação.

Em mulheres sem problemas de fertilidade, no início de cada ciclo menstrual (regra), vários óvulos, que ainda não estão maduros, começam a se desenvolver e a crescer dentro dos ovários, através da ação do hormônio chamado hormônio folículo estimulante (FSH), produzido naturalmente no organismo pela glândula chamada hipófise. No entanto, dentre os vários óvulos que começam a se desenvolver no início de cada ciclo menstrual, geralmente apenas um amadurece completamente. Quando o folículo, pequena “bolsa” que abriga o óvulo durante o processo de amadurecimento, atinge um tamanho adequado (próximo a 20 mm), ocorre a liberação, também pela glândula hipófise, de grande quantidade do hormônio luteinizante (LH) que amadurece e libera do óvulo do ovário (evento chamado de ovulação). Este óvulo maduro sai de dentro do folículo, sai do ovário e vai até a trompa uterina (canal que liga o ovário ao útero), onde encontra com os espermatozóides, ocorrendo a fecundação (união do óvulo com o espermatozóide).

A inseminação requer que os espermatozóides sejam coletados, preparados no laboratório e depois colocados dentro do útero e trompas. Um dos problemas que influencia os resultados da inseminação é a qualidade do sêmen. Além da quantidade e

da motilidade dos espermatozoides, a morfologia (principalmente o número de formas normais) é um dos pontos de observação. Existem vários critérios para classificar a morfologia dos espermatozoides. Contudo há possibilidade de que novos critérios de classificação que utilizam uma tecnologia diferente possam, se não melhorar os resultados, prever melhor as possibilidades de gravidez com a inseminação.

Baseando-se nisso, esse estudo procura analisar o valor prognóstico da morfologia dos espermatozoides avaliada através de um novo critério chamado de MSOME (“motile sperm organelle morphology examination”/ ainda não há uma tradução para o português), na predição de gravidez após inseminação intrauterina. Na MSOME a avaliação das formas dos espermatozoides é realizada empregando equipamento que permite aumentos da imagem superior 6000 vezes.

Para que vocês possam decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

Verificar o valor prognóstico da morfologia espermática avaliada através do “motile sperm organelle morphology examination” (MSOME) na predição de gravidez após inseminação intrauterina homóloga.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se vocês concordarem em participar deste estudo, a morfologia dos espermatozoides do seu esposo (dos seus espermatozoides) será analisada usando MSOME. Esse resultado depois será comparado com o resultado de procedimento (ocorrência ou não de gravidez)

É importante ressaltar que procedimentos de inseminação intrauterina já são utilizados mundialmente. Do mesmo modo, todas as medicações utilizadas têm registro e liberação pelas autoridades competentes, já sendo de uso corrente. Não será testada nenhuma medicação experimental.

As avaliações que serão feitas não são prejudiciais aos espermatozoides, não interferindo no tratamento. De qualquer forma apenas parte da amostra analisada.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Como a indicação para tratamento do problema de infertilidade de vocês é inseminação intrauterina, método alternativo seria a opção de técnica mais invasiva de terapêutica (fertilização “in vitro”). Por outro lado, vocês podem simplesmente não querer participar do estudo.

RISCOS

O tratamento será exatamente o mesmo caso vocês participem ou não deste estudo.

As avaliações serão feitas em material que seria descartado, não interferindo na normalidade do tratamento e não trazendo nenhum risco adicional.

BENEFÍCIOS

O resultado deste estudo propiciará mais opções para classificação e seleção do sêmen com bons resultados, o que representará benefício para a população que necessita de tratamento de infertilidade.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de vocês, seus registros médicos poderão ser consultados pela equipe de pesquisadores envolvidos. Seus nomes não serão revelados ainda que informações de seus registros médicos sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Lembramos que não é esperado nenhum dano para a sua saúde decorrente diretamente desse estudo.

Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS (Ressarcimento e indenização)

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação no estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que vocês saibam que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que vocês podem recusar-se a participar ou interromper suas participações a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais vocês têm direito. Em caso de vocês decidirem interromper a participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e as análises relativas ao estudo serão imediatamente interrompidas.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a vocês a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, entre em contato com a pesquisadora Livia Drumond Akl (RG MG 10160039) nos telefones (31) 8872-4050/ (16) 3911-1100 ou no endereço Av. João Fiusa 689 Ribeirão Preto, SP ou com qualquer médico do Centro de Reprodução Humana Professor Franco Jr.

CONSENTIMENTO

Declaro que, após convenientemente esclarecido(a) pelo pesquisador e ter entendido(a) o que me foi explicado, consinto em participar da presente Pesquisa

São Paulo, de de

Esposa

Esposo

Pesquisador

ANEXO B



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Centro de Referência da Saúde da Mulher

Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 31 de maio de 2011.

FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DATA DA APROVAÇÃO: 25/05/2011

Protocolo nº: 018/11

TÍTULO DO ESTUDO: “ Eficácia do motile sperm organelle morphology examination (MSOME) na predição de gravidez após inseminação intrauterina ”.

NOME DO INVESTIGADOR PRINCIPAL: Livia Drumond Akl.

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tendo sido a referida aprovação constado em ata.

Dr. Jorge Yoshinori Shida
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do CRSM

ANEXO C



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Centro de Referência da Saúde da Mulher

Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

O Protocolo de Pesquisa: “ **Eficácia do motile sperm organelle morphology examination (MSOME) na predição de gravidez após inseminação intrauterina** ”, e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram avaliados por este Comitê de Ética em Pesquisa e considerados **APROVADOS** sem restrições.

Para tal aprovação, foram seguidas as exigências das Resoluções nacionais 196/96 e 251/97, relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos. No presente projeto, foram devidamente enfatizados itens que correspondem ao objetivo do Estudo e seu racional; adequação dos materiais e métodos; referência bibliográfica pertinente; responsabilidade do pesquisador na condução do estudo, bem como possibilidade de interrupção do estudo no caso do paciente julgar conveniente.

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da legislação 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo. Solicitamos que este CEP seja informado quando da inclusão do primeiro paciente.

Atenciosamente

Dr. Jorge Yoshinori Shida
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do CRSM