



Centro Universitário de Brasília – UniCEUB

Faculdade de Ciências da Educação e Saúde – FACES

Marcella de Salles dos Santos

**A utilização da injeção intracitoplasmática de espermatozoide no
ovócito como recurso na infertilidade masculina**

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado no formato de artigo
científico ao UniCEUB como requisito
parcial para a conclusão do curso de
Bacharelado em Biomedicina, sob
orientação do professor Dr. Ranieri
Rodrigues de Oliveira.

Brasília

2016

A utilização da injeção intracitoplasmática de espermatozoides no ovócito como recurso na infertilidade masculina

Marcella de Salles dos Santos¹
Ranieri Rodrigues de Oliveira²

Resumo

A Infertilidade é definida como a incapacidade de conceber após, no mínimo, um ano de relações sexuais sem uso de métodos contraceptivos. Conhecida como uma técnica de reprodução assistida, a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) é um desenvolvimento altamente sofisticado, técnico e representa uma das principais técnicas para tratamento de infertilidade que consiste na inserção de um único espermatozoide, que é cuidadosamente selecionado, dentro do citoplasma do ovócito. Indicada principalmente para o uso em casos severos de infertilidade masculina se tornou a mais bem sucedida para o tratamento de infertilidade de fator masculino e mudou de forma drástica o gerenciamento dos casos mais severos. O presente trabalho enfoca a técnica da fertilização in vitro por meio de ICSI, abordando seus aspectos técnicos, bem como, suas aplicações dentro da infertilidade masculina.

Palavras-chave: Infertilidade, ICSI, Infertilidade masculina, Fertilização in vitro, Tecnologia de reprodução assistida

Application of intracytoplasmic sperm injection in oocyte as a resource in male infertility

Abstract

Infertility is defined as the inability to conceive after at least one year of regular sexual intercourse without use of contraceptive methods. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI), an assisted reproductive technique, is a sophisticated, technical development and represents one of the main techniques for infertility treatment. It consists of the insertion of a single carefully selected sperm into the cytoplasm of the oocyte. Indicated primarily for use in severe cases of male infertility. ICSI has become the most successful treatment of male infertility and has drastically changed the management of these cases. This article focuses on the technical aspects of the in vitro fertilization technique that uses ICSI as well as its applications within male infertility.

Keywords: Infertility, ICSI, Male Infertility, In Vitro Fertilization, Assisted Reproductive Technology

¹Graduando do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

²Veterinário, Doutor em Ciências da saúde – UnB. Professor do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

1. Introdução

A infertilidade pode ser definida como a inabilidade de um casal sexualmente ativo, sem a utilização de métodos contraceptivos, estabelecer gravidez dentro de um ano (PALERMO et al., 2014a). Cerca de 25% dos casais não alcançam a gravidez no espaço de 1 ano. Destes casais, 15% procuram tratamento médico para a infertilidade e menos de 5% permanece involuntariamente sem filhos (PASQUALOTTO, 2007).

Apesar de as taxas de incidência variarem conforme as regiões, estima-se que em todo o mundo aproximadamente 1 em cada 10 casais sofra de infertilidade (GAMEIRO et al., 2008).

Para Santos (2010), o fator masculino é responsável por um terço dos casos de infertilidade, enquanto 20% das causas são atribuídos conjuntamente à mulher e ao homem. Logo, o fator masculino está presente em 25% a 40% dos casais inférteis, o que torna obrigatória a avaliação clínica do homem. Apesar de hoje conhecermos vários fatores de infertilidade masculina, uma boa parcela de pacientes não consegue chegar a um diagnóstico definitivo, caracterizando como idiopático.

O estudo do sêmen através do espermograma, deve ser considerado como o elemento mais importante na apreciação da infertilidade masculina. De acordo com o fator que compromete a fertilidade do homem, é escolhida a forma terapêutica a ser utilizada para cada caso. Esta pode ser por meio de tratamentos clínicos, procedimentos cirúrgicos e fertilização assistida (PASQUALOTTO, 2007).

As chances de reverter um caso de infertilidade masculina são muito maiores atualmente, pois no último quarto do século XX ocorreram grandes avanços na área da medicina reprodutiva. O primeiro e mais importante deles, amplamente divulgado, foi à fertilização in vitro (FIV), com o nascimento de Louise Brown em 1978 (BUSSO et al., 2007; KAMEL, 2013).

Como uma das ferramentas fundamentais de estudos para correção da infertilidade ligada ao espermatozoide, surge a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Esta técnica representa o processo de inserção mecânica de um espermatozoide inteiro ou do núcleo espermático isolado (cabeça) dentro do ooplasma, o citoplasma do ovócito (PALERMO et al., 1992). Posteriormente, a técnica de ICSI adquiriu variações quanto ao tipo de células germinativas masculinas microinjetadas, onde se destacam as espermátides redondas e espermátides alongadas, as quais também possuem potencial fecundante (MARTINS et al., 2002).

As tecnologias de reprodução assistida (TRA) conseguem criar descendência, a partir de casais inférteis, algo que se pensava anteriormente ser impossível. O tratamento de infertilidade masculina tem melhorado consideravelmente nesses últimos anos, as técnicas de micromanipulação de gametas são as mais indicadas para casos severos de infertilidade (FENG et al., 2003; PALERMO et al., 2014a).

De acordo com Santos (2010), foi possível solucionar com a ICSI, de forma eficaz, grande parte dos casos de infertilidade. As principais indicações para o uso desta técnica são as alterações severas no espermograma, as azoospermias obstrutivas e secretoras e a ausência total de fecundação em ciclos de fecundação in vitro anteriores ou quando a fecundação acontece numa percentagem reduzida de ovócitos.

Nesse contexto, o presente trabalho pretende abordar, sob a forma de revisão, a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e suas aplicações aos casos de infertilidade masculina.

2. Metodologia

O estudo foi desenvolvido por meio de revisão bibliográfica da literatura no formato narrativa, que de acordo com Rother (2007), é uma análise da literatura publicada em artigos de revista impressa, eletrônica e livros na interpretação e análise crítica pessoal do autor. Para a busca de artigos indexados foram utilizadas as bases de dados do Scielo (“Scientific Electronic Library Online”); Medline, Lilacs, PubMed (“US National Library of Medicine”), EBSCO “Discovery Service” e Google Academics, por meio dos termos: “Infertilidade”, “ICSI”, “Infertilidade masculina”, “Fertilização in vitro” “Reprodução assistida” e esses mesmos termos em inglês. Foram utilizados artigos em inglês, espanhol e português, de 2006 a 2016. Além disso, também foram utilizados textos base, para fundamentar aspectos conceituais, mesmo fora desse período temporal.

3. Infertilidade e esterilidade

A Infertilidade é definida como a incapacidade de conceber após, no mínimo, um ano de relações sexuais sem uso de métodos contraceptivos (TAEBI et al., 2016). De acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 8-10% dos casais estão enfrentando algum tipo de problema de infertilidade. Globalmente, isso significa que

50-80 milhões de pessoas estão enfrentando o problema para procriar (ROUPA et al., 2009).

A infertilidade pode ser classificada como primária e secundária. Sendo que a infertilidade primária refere-se a uma situação em que o casal nunca teve um filho, ou seja, nunca houve gestação, na secundária já houve um gestação na vida do casal, mesmo que seja gravidez ectópica ou tópica que tenha terminado em aborto. Em relação ao termo esterilidade, atualmente, significa a incapacidade absoluta de ter filhos (SOARES; RODRIGUES; BARROS, 2011).

Fatores como a duração e classificação do tipo de infertilidade, o resultado do espermograma, a idade e condições de fertilidade feminina, estão ligados com a probabilidade de sucesso de uma gravidez (DINIS, 2014). Pode-se dizer que a fertilidade está muito mais relacionada com a idade da mulher do que com a idade do homem. Há um declínio da fertilidade masculina, especialmente aos 50 anos de idade, mas isso não significa que o homem com essa idade não consiga ser pai (ADAMSON; BAKER, 2003).

Estima-se que 12 a 15% dos casais em idade reprodutiva e cerca de metade deles (cerca de 1,2 milhões de casais inférteis por ano) podem se beneficiar das tecnologias de reprodução assistida (NERI et al., 2014).

Estima-se que as causas masculinas podem chegar entre 40 a 50%, as ovulatórias é de 20%, causas uterinas e/ou tubárias cerca de 5% e aproximadamente 20% seriam por causas inexplicadas. Segundo Passos et al. (2011), a infertilidade ligada às causas femininas são menos frequentes, considerando que as causas inexplicadas sejam relacionadas a fatores masculinos. Contudo, de acordo com Neri et al. (2014), se excluirmos indicações de infertilidade, tais como as causas inexplicáveis, é possível que as principais razões para a incapacidade dos casais de procriar sejam quase igualmente repartidas entre o sexo feminino e o sexo masculino.

3.1 Infertilidade masculina

A infertilidade masculina, de modo geral, pode estar relacionada a deficiências no sêmen, caracterizada pela diminuição da espermatogênese, danos no DNA, à perda de mobilidade e alterações morfológicas dos espermatozoides (PASQUALOTTO, 2007).

Estima-se que os efeitos da infertilidade afetem 7% de todos os homens. A etiologia da produção espermática debilitada e funcional pode ser relacionada a fatores de ação

pré-testicular, pós-testicular ou estar diretamente ligada ao nível testicular. A falha testicular primária conta 75% dos casos (hipogonadismo hipogonatrópico congênito, ausência congênita dos vasos deferentes, falha testicular primitiva). Apesar de avanços, principalmente no campo da genética, a etiologia é ainda desconhecida em 50% dos casos e é atualmente denominada de “infertilidade idiopática” (KRAUSZ, 2011).

Considerando que a qualidade do sêmen, clinicamente falando, é usada como forma de analisar a capacidade de fecundidade do espermatozoide, a OMS preconizou parâmetros seminais (Tabela 1) (PASQUALOTTO, 2007). O espermograma representa o teste inicial para a avaliação da fertilidade masculina. Se esses valores se encontrarem dentro da normalidade, não é necessária repetição, caso o resultado seja anormal uma repetição é recomendada (ESTEVEZ; MIYAOKA; AGARWAL, 2011).

Tabela 1. Valores de referencia para os parâmetros seminais do manual OMS de 2010.

Parâmetros	Referência normal
Morfologia	4%
Motilidade (progressiva)	32%
Motilidade (total)	40%
Vitalidade	58%
Volume	Pelo menos 1,5 mL
Contagem de espermatozoides	39 milhões por ejaculado 15 milhões por mL
pH	≥7.2
Leucócitos (x106 por mL)	< 1,0

Fonte: Linday e Vitrikas (2015)

As características preconizadas pela OMS são: A contagem de espermatozoides, a morfologia, a motilidade e o volume deles no sêmen, na análise microscópica (ZHENG et al., 2015), além disso a visualização macroscópica seguindo as características como: Liquefação, aparência, viscosidade seminal e pH (LAMMARONE et al., 2003).

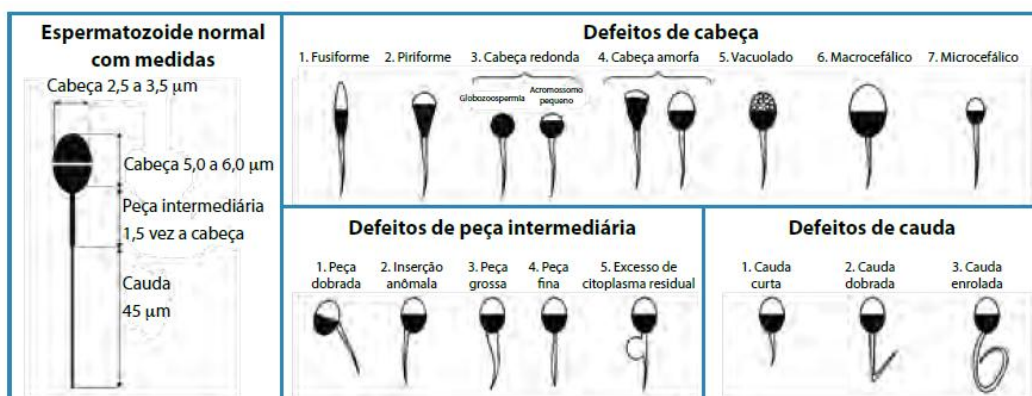
A liquefação tem que ser concluída em um tempo de 15 a 30 minutos, após isso a viscosidade deve ser avaliada, com uma pipeta sorológica e analisar a amostra ao sair da pipeta com a força da gravidade, deve gotejar ou formar um filamento menor que 2 cm. Após a liquefação, a amostra deve se encontrar em aspecto homogêneo, espesso e gelatinoso. A coloração pode indicar infecções, uso de medicamentos ou doenças locais

ou sistêmicas, dessa maneira o sêmen deve ser branco ou acinzentado. O pH deve ser maior ou igual a 7,2 (WHO, 2010).

Quanto à motilidade, o método recomendado pela OMS é simples e é feito subjetivamente pela contagem de 100 células. Essa classificação é feita por graus. Os espermatozoides de grau A tem movimentação retilínea e rápida, os de grau B tem movimentação retilínea lenta ou não ou não retilínea, grau C a movimentação é sem progressão (chamada de “shaking”) e no grau D os espermatozoides são imóveis. E os graus são dados por porcentagem (RAO; CARO; FISHER, 2014).

De acordo com a forma e o aspecto dos espermatozoides a morfologia deles é definida. Recomendado pelo manual da OMS, o sistema de classificação morfológica é o critério de Tygerberg (Figura 1), descrito em 1986. Esse critério emprega: normalidade da cabeça como oval e lisa (5 μm a 6 μm de comprimento e de 2,5 μm a 3,5 μm de largura), o acrossomo tem que acometer de 40 a 70% da cabeça do espermatozoide, o colo deve ser delgado, a largura deve ser menor que 1 μm e o comprimento aproximadamente de 1,5 vez o tamanho da cabeça, sem defeitos. Levemente mais fina que o colo, a cauda tem que ser uniforme, como o comprimento aproximado de 45 μm . As formas limítrofes devem ser consideradas anormais (FEIJÓ et al., 2012). No Quadro 1 estão descritos algumas alterações que podem ser encontradas no sêmen.

Figura 1. Desenho esquemático do espermatozoide visto à microscopia óptica, com as medidas utilizadas na avaliação morfométrica, segundo o critério estrito de Tygerberg (quadro à esquerda). No centro e a direita, ilustrações representando os defeitos morfológicos mais comuns.



Fonte: Feijó et al. (2012).

Quadro 1. Nomenclatura relacionada à qualidade do sêmen

Nomenclatura	Características
Aspermia	Sem sêmen (sem ou ejaculação retrógrada)
Astenozoospermia	Motilidade abaixo do valor de referência
Astenoteratozoospermia	Baixa motilidade progressiva e morfologia alterada
Azoospermia	Sem espermatozoides no ejaculado
Criptozoospermia	Após centrifugação de todo volume ejaculado, são encontrados raros espermatozoides
Hemospermia	Presença de eritrócitos no ejaculado
Leucospermia	Presença de leucócitos no ejaculado acima do valor de referência
Necrozoospermia	Baixa porcentagem de espermatozoides vivos e alta porcentagem de espermatozoides imóveis no ejaculado
Normozoospermia	Sem alterações nos parâmetros seminais
Oligoastenozoospermia	Baixa concentração e motilidade dos espermatozoides
Oligoastenoteratozoospermia	Baixa concentração e motilidade, e morfologia alterada dos espermatozoides
Oligoteratozoospermia	Baixa concentração e motilidade dos espermatozoides
Oligozoospermia	Baixa concentração de espermatozoides
Teratozoospermia	Aumento do grau de anormalidade da forma dos espermatozoides

Nota: O sufixo "spermia" refere-se ao ejaculado e "zoospermia" para os espermatozoides.

Fonte: Adaptado de WHO (2010).

A análise seminal era considerada um teste padrão ouro na avaliação da fertilidade do homem, contudo, 80% dos homens inférteis possuíam concentrações espermáticas normais. Dessa maneira, a análise seminal não é um teste de fertilidade (PASQUALOTTO, 2007).

Por esse motivo, existem testes complementares como as provas de função espermática, que dão informações ligadas à probabilidade de fecundação do espermatozoide. Provas como reação acrossômica, interação espermatozoide-muco cervical, receptores de manose na superfície dos espermatozoides, níveis de creatina

quinase, testes da penetração espermática e hemizona, espécies reativas de oxigênio, capacidade antioxidante total e peroxidação lipídica (PASQUALLOTO, 2007).

Outra forma de avaliar a identificação da infertilidade no homem é através de um estudo hormonal. Sabe-se que os distúrbios hormonais em homens inférteis são mais prevalentes que na população em geral. Um estudo hormonal masculino consiste na determinação do hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e nos níveis de testosterona, que são necessários para a espermatogênese (JUNGWIRTH et al., 2012).

Em relação às causas mais comuns de infertilidade relacionadas a alterações cromossômicas, pode-se afirmar que infertilidade masculina está correlacionada à três fatores genéticos: mutações genéticas, aberrações cromossômicas e microdeleções do cromossomo Y. Alterações como a síndrome de Klinefelter de cariótipo 47,XXY (7-13%) e mosaicos do tipo 46,XY/47,XXY (menos frequentes) são achados comuns em indivíduos azoospermicos. Alterações cromossômicas como translocações equivalem cerca de 5-10%, ou seja, uma chance dez vezes superior à observada nos homens férteis. A pesquisa de microdeleção do cromossomo Y é importante para definir a etiologia da falência da espermatogênese, já que o gene SRY presente no braço curto do cromossomo Y tem como papel importante a diferenciação e crescimento testicular. Esse tipo de microdeleção é relativamente frequentes, varia de 7-10%) e em homens com comprometimento da espermatogênese é aumentada (16% em azoospermicos) (PASQUALOTTO, 2007).

Além de todos esses fatores, é necessário saber o histórico detalhado do paciente, como a duração e a frequência das atividades sexuais, ejaculação, função erétil, estilo de vida (álcool, fumo, entre outros) e o uso de drogas. Outro detalhe importante é saber se o paciente já teve doenças sistêmicas, infecções do trato reprodutor, se já foi submetido à quimioterapia ou radioterapia. O exame físico também é superimportante, como a procura de algum tipo de hipogonadismo (virilização, proporções corporais, ginecomastia, entre outros), e uma análise cuidadosa da genitália, como o tamanho e consistência testicular, presença de neoplasias ou alguma patologia penial (hipospadia) e a presença de varicocele (ISIDORI; LATINI; ROMANELLI, 2005).

A partir do momento em que a causa (Quadro 2) da infertilidade é identificada, sendo ela masculina, é aconselhado um tratamento através de métodos de reprodução assistida (RAO; CARO; FISHER, 2014). A reprodução humana medicamente assistida,

alterando o processo natural de procriação, substitui a relação sexual na reprodução biológica, com o objetivo de facilitar esse processo quando ele não é capaz de ser feito pelo processo natural (SANTOS, 2010).

Quadro 2. Principais causas de infertilidade masculina.

Causas
Varicocele
Infecções: Agudas: Varíola, infecções virais Crônicas: Prostatites, tuberculose
Enfermidades de transmissão sexual
Idiopáticas;
Lesões: Diretas: Trauma testicular ou pélvico Indiretas: Quimioterapia, radioterapia, medicamentos
Falha do descenso testicular
Cirurgia prévia: Vasectomia
Obstruções: Congênitas, vasectomia ou pós-infecções
Enfermidades sistêmicas
Fatores imunológicos
Transtornos ejaculatórios
Lesões medulares
Causas genéticas, endócrinas ou familiares: Síndrome de Klinefelter, fibrose cística
Disfunções sexuais

Fonte: Adaptado de Rao, Caro e Fisher (2014).

4. Reprodução humana assistida

Uma das técnicas mais simples e popular de reprodução assistida praticado nos dias de hoje é a injeção do sêmen previamente preparado para dentro da cavidade uterina, chamado de inseminação intrauterina (IIU) (BANSAL, 2011).

Esse procedimento de inseminação artificial começou em 1770, e foi documentada por John Hunter, que realizou uma técnica de inseminação vaginal em uma mulher cujo marido era portador de hipospádia, malformação congênita do meato urinário no sexo masculino, o que impossibilita o parceiro de ejacular no interior da

vagina. No século 19 surgiram várias outras experiências que resultaram em gravidez bem sucedida (MUKHERJEE; PAL; SARKAR, 2012).

O sêmen tendo que ser previamente analisado para a eficácia da inseminação, fez surgir o desenvolvimento de técnicas de preparo, daí veio a fertilização *in vitro* (FIV), mais eficaz que o IUI muito útil nos casos de subfertilidade (BANSAL, 2011).

A história da FIV começou em meados de 1890 quando Walter Heape, um professor da Universidade de Cambridge, no Reino Unido, relatou o primeiro caso de transferência embrionária em coelhos. Em 1934, Gregory Pincus juntou ovócitos e espermatozoides de coelhos, na parte superior de vidro de um relógio, e implantou o embrião em desenvolvimento em um coelho. Após 14 anos, em 1948, Miriam Meken e John Rock conseguiram recolher 800 ovócitos de mulheres, mas só em 1959, que Min Chueh Chang, uma investigadora reprodutiva chinesa, conseguiu resultado, ou seja, nascidos vivos, a partir de coelhos, com a técnica (KAMEL, 2013).

O primeiro relato de gravidez em humanos com o uso do método FIV em 1973, pelo professor Carl Wood e John Leeton, em Melbourne na Austrália, que terminou na morte do embrião em menos de uma semana. Em 1976, Patrick Steptoe e Robert Edwards publicaram e relataram uma gravidez ectópica vinda da transferência de um embrião no estágio final da mórula (WANG; SAUER, 2006).

A partir de 1978, com o nascimento de Louise Brown em julho, seguido de Courtney Cross em outubro e Alastair MacDonald em janeiro de 1979, os três primeiros bebês vindos do método de FIV, esse procedimento se tornou comum com um recorde de mais de 5 milhões de nascimentos no mundo inteiro (KAMEL, 2013).

Para se iniciar um tratamento utilizando o método de FIV, a mulheres passam por um processo, para que o resultado seja o melhor possível. Os protocolos de tratamento convencionais, para estimulação dos ovários, realizam procedimentos como injeções diárias do agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) com o objetivo de impedir a ovulação precoce, o hormônio foliculotrófico (FSH) para estimular o desenvolvimento de folículos, hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG) para facilitar a maturação final dos ovócitos e a progesterona para suportar alterações no endométrio. Tudo isso é monitorado por meio de ultrassonografia transvaginal e frequentes exames de sangue (YING; WU; LOKE, 2015).

Após a estimulação ovariana, os ovócitos são recuperados pela aspiração do fluido folicular através de ultrassonografia, é feita a seleção do melhor ovócito, que são classificados dentro da sua fase de maturação. Apenas os ovócitos em metáfase II são

selecionados. Mantidos em uma incubadora com o ambiente similar ao das tubas uterinas, 37 °C com 5% de CO₂, os óvulos ficam por um período de 12 a 18 horas (VAN VOORHIS, 2007).

É feito um preparo do sêmen e a seleção dos espermatozoides de acordo com a motilidade e a capacidade de fertilização, que são colocados ao redor do ovócito para que seja feita a fecundação. Após a fecundação, os óvulos são observados no laboratório, afim de que possam ser identificados os que não foram desenvolvidos corretamente, geralmente na fase de clivagem (após três dias) ou na fase de blastocisto (após cinco dias) (Figura 2) e são classificados de acordo com a morfologia e a capacidade de divisão (ELDER; DALE, 2011).

Figura 2. Blastocisto em desenvolvimento após 5 dias.



Fonte: Merchant, Gandhi e Allahbadia (2011).

Antes da transferência dos embriões é recomendado fazer o diagnóstico pré-implantacional (PGD) com o objetivo de analisar a integridade cromossômica do embrião. A transferência do embrião é feita através de um cateter especial, e monitorada através de ultrassonografia transabdominal para o melhor posicionamento do mesmo (VAN VOORHIS, 2007).

Durante meados dos anos 80, com o objetivo de simplificar e melhorar as taxas de sucesso de reprodução assistida, foi desenvolvida a técnica “gamete intrafallopian transfer” (GIFT) ou transferência de gametas intratubária. O método consiste na recuperação de ovócitos através da laparoscopia, e depois juntamente com o espermatozóide é

transferido para as trompas para que o óvulo possa fertilizado na tuba uterina (MENIRU, 2001).

Em seguida, foi criada a técnica de transferência de ovócitos, recuperados através da laparoscopia, chamada transferência intratubária de zigoto (ZIFT) ou “zygote intrafallopian transfer”, que seguia alguns dos passos teóricos do GIFT, a diferença é que a fecundação do óvulo acontece fora do corpo da mulher. No ZIFT é necessária a utilização de dois laparoscópios, um para a recuperação dos ovócitos e outro para a transferência do zigoto, e foi essa uma das principais limitações do método (NAKAGAWA et al., 2014).

Durante esse era, estudos sobre o FIV estavam sendo desenvolvidos e com taxas de sucesso baixas, entre 23,5 a 30%. A partir disso, foi possível descobrir que a técnica não era muito eficaz para pacientes com problemas tubários ou quando se tratava de parâmetros seminais abaixo do valor de referência, como valores de concentração, motilidade e morfologia o que resultava em taxas de fertilização significativamente baixas e menos embriões disponíveis para transferência. Além disso, pacientes azoospermicos não tinham solução de tratamento, e foi a partir disso que iniciaram estudos da micromanipulação (WANG; SAUER, 2006).

4.1 Reprodução assistida e micromanipulação

O método de microinjeção de ovócitos, usando técnicas quantitativas, foi inicialmente usado por Pierre de Fonbrune em 1930 utilizando uma ameba (JAFFE; TERASAKI, 2004). O primeiro experimento com mamíferos foi feito por Rynzo Yanagimach et al. puderam indicar que os eventos de fusão da membrana dos ovócitos podem ocorrer sem distúrbios no desenvolvimento do mesmo, e fizeram isso utilizando amostras de hamsters. A evolução das técnicas de micromanipulação começou a partir de Gordon e Talansky, descreveram a abertura química da zona pelúcida, usando enzimas digestivas ou uma solução ácida chamada de “zona drilling” (ZD), esta enzima estava em pH muito baixo o que na maioria das vezes destruía o ovócito, logo as taxas de sucesso eram muito baixas (NERI et al., 2014). No final dos anos 80, Jacques Cohen e colaboradores, descreveram a dissecação parcial da zona pelúcida ou “partial zone dissection” (PZD) em ovócitos humanos (BANSAL, 2011).

A técnica PZD consiste em fazer uma pequena abertura na zona pelúcida, com o objetivo de facilitar a entrada do espermatozoide no citoplasma, e também para facilitar a

ruptura do citoplasma pelo embrião. Esse método foi empregado em pacientes que tiveram ausência ou baixa de fertilização nos procedimentos convencionais de FIV e naqueles com alterações nos parâmetros espermáticos. Os resultados dessas técnicas foram inconstantes devido à possibilidade de anormalidades (HAMMADEH; FISCHER-HAMMADEH; ALI, 2011; WANG; SAUER, 2006; PALERMO et al., 2014a).

Um pouco depois da descoberta do PZD, foi relatado em 1987 a inserção subzonal de espermatozoides ou “sub-zonal sperm injection” (SUZI), que é a inseminação de espermatozoides no espaço perivitelínico, e relataram a primeira gravidez decorrente desse método (ELDER; DALE, 2011).

Nesta técnica, a zona pelúcida não é apenas aberta, mas ultrapassada fisicamente e funcionalmente. Os espermatozoides são sugados para dentro de uma micropipeta, esta é colocada em contato com a zona pelúcida do ovócito e pressionando-a sob essa zona, até penetrar no espaço perivitelínico. Com apenas 20% de sucesso na fertilização, o índice era muito baixo para aplicar esse método na rotina dos casais inférteis (WANG; SAUER, 2006; PALERMO et al., 2014a).

A partir disso, um grupo de Bruxelas, Palermo e sua equipe em 1992 relataram a primeira gravidez a partir da injeção intracitoplasmática de espermatozoides no ovócito, e com isso revolucionaram o tratamento da infertilidade masculina. (MERCHANT; GANDHI; ALLAHBADIA, 2011).

4.2 Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides

A ICSI (PALERMO et al., 1992) abreviação do inglês “intracytoplasmic sperm injection”, conhecida como injeção intracitoplasmática de espermatozoides, é conhecida como uma técnica de reprodução assistida e é um desenvolvimento altamente sofisticado, técnico e representa uma das principais técnicas para tratamento de infertilidade (BANSAL, 2011). A técnica consiste na inserção de um único espermatozoide, que é cuidadosamente selecionado, dentro do citoplasma do ovócito (Figura 6) (MERCHANT; GANDHI; ALLAHBADIA, 2011).

As indicações para o uso da técnica encontram-se no quadro 3. Mas é geralmente destinado a casais inférteis, incluindo principalmente a infertilidade de fator masculino ou quando os resultados da fertilização da FIV convencional não foram

eficazes. Porém existem vários outros fatores que tem a ICSI como opção de tratamento (BANSAL, 2011).

Quadro 3. Principais indicações para o uso de ICSI

Fator masculino	Fator não masculino
<i>Espermatozoide do ejaculado</i>	Falha prévia no FIV
Oligozoospermia	Dismorfismo oocitário
Astenozoospermia	Baixo número de oócitos
Teratozoospermia	Baixa maturidade oocitária
Anticorpos antiespermáticos	Oócitos criopreservados
Preservação da fertilidade	Maturação oocitária in vitro (MOIV)
Desordens ejaculatórias	PGD/PGS (FISH OU PCR)
Eletroejaculação	Casais sorodiscordantes de HIV e hepatite C
Ejaculação retrógrada	Legislação restritiva
Espermatozoide sem acrossoma	
Criptoospermia	
<i>Recuperados cirurgicamente</i>	
Epididimal	
Azoospermia obstrutiva	
Ausência congênita bilateral dos vasos deferentes	
Vasoepididimostomia falha	
Vasostomia falha	
<i>Espermatozoide testicular</i>	
Necrozoospermia	
Todas as indicações para espermatozoides epididimais	
Azoospermia não obstrutiva	
Hipospermatogênese	

Abreviações: FISH – “fluorescent in situ hybridization” hibridização fluorescente in situ; HIV – “human immunodeficiency virus” vírus da imunodeficiência humana; FIV – Fertilização in vitro; PCR – “polymerase chain reaction” reação em cadeia da polimerase; PGD – “preimplantation genetic diagnosis” diagnóstico genético pré-implantacional; PGS – “preimplantation genetic screening” screening genético pré-implantacional.

Fonte: Adaptado de Palermo, Neri e Rosenwaks (2015).

O surgimento do ICSI foi marcado como uma importante ferramenta no campo da reprodução assistida (LEANDRI et al., 2013). Em menos de três anos após a introdução dessa técnica, métodos como PZD e SUZI se tornaram obsoletos. Com esse método, foi possível comprovar que as taxas de fecundação e clivagem embrionária aumentaram em relação às outras técnicas de micromanipulação, e com isso obtiveram um maior número de embriões com melhores taxas de implantação e consequentemente

taxas de gravidez evolutiva muito mais elevadas (MERCHANT; GANDHI; ALLAHBADIA, 2011).

Figura 3. Injeção do espermatozoide no ovócito selecionado. O espermatozoide é imobilizado e aspirado com a agulha injetora e é levado até o ovócito selecionado para a injeção.



Fonte: Bartoov e Schneider (2008).

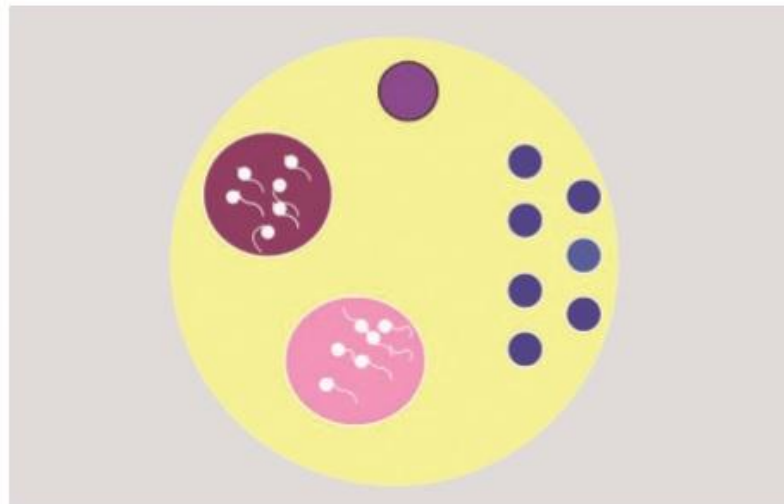
Para se iniciar um tratamento de ICSI é necessário utilizar os mesmos protocolos de tratamento convencionais de estimulação ovariana que são feitas no método FIV, preparando o corpo da mulher para o recebimento do embrião (YING; WU; LOKE, 2015). O procedimento de microinjeção é realizado na ampliação de 200 - 400x e é usado um microscópio com óptica de Nomarski. Nesse microscópio estão acoplados dois manipuladores, de um lado o manipulador tem em sua extremidade uma agulha injetora e do outro lado tem o manipulador com uma micropipeta que tem como objetivo a sucção (MENIRU, 2001).

Antes do procedimento devem ser preparadas as placas com microgotas do meio de cultura. Dois tipos de meio podem ser usados, o meio FIV universal que é usado como meio de monocultura e é um meio simples, pois contém apenas glicose e piruvato que são tidos como componentes de energia, que são importantes para as fases iniciais do desenvolvimento embrionário. Já o meio ISM1 é feito com componentes diferentes como glicose, metabólitos derivados, aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas e colesterol,

e com todos esses componentes se mostrou muito mais eficiente, pois melhorou o crescimento embrionário (XELLA et al., 2009).

No meio de cultura, pode ser tamponado com HEPES que tem como objetivo diminuir a variação do pH e a solução polivinilpirrolidona (PVP) que é um fluido que facilita a captura dos espermatozoides, pois é viscoso assim diminui a motilidade deles e também ajuda a prevenir o espermatozoide de grudar na parte da pipeta de injeção. Com a ajuda do microscópio, é selecionado o espermatozoide selecionado para a microinjeção, ele é imobilizado e aspirado com a agulha injetora, daí é levado até o ovócito que foi selecionado para a injeção, que é imobilizado pela sucção da segunda pipeta, Um exemplo de procedimento de microinjeção é demonstrado na Figura 4. Quando agulha perfura a zona pelúcida e o oolema e o espermatozoide assim é depositado no interior do ovócito (MENIRU, 2001).

Figura 4. Placa de Petri preparada para o procedimento de ICSI. O círculo vermelho representa a gota com os espermatozoides não selecionados, capturados após a lavagem. O círculo rosa representa a gota de destino dos espermatozoides selecionados. Círculos azuis são as gotas com ovócitos recuperados para a injeção e a gota roxa é PVP adicional.



Fonte: Bartoov e Schneider (2008).

Quando ocorre a microinjeção de cada ovócito, eles são imediatamente transferidos para uma placa de quatro poços, incubados nos meios de cultivo e coberto

com 0,5 ml de óleo mineral a 37 °C com uma atmosfera de 5% CO₂. Assim os ovócitos injetados são postos para cultivo geral e ficam armazenados por 12-17 horas para a checagem do processo normal de fertilização (BARTOOV; SCHNEIDER,2008).Com isso vai ser definido a presença de dois pronucleos distintos e dois corpos polares. A evolução da clivagem embrionária é avaliada a cada 4 horas. De três a quatro dias após o procedimento de microinjeção é possível selecionar, morfológicamente, o embrião de boa qualidade para a transferência para a cavidade uterina (PALERMO et al., 2014b).

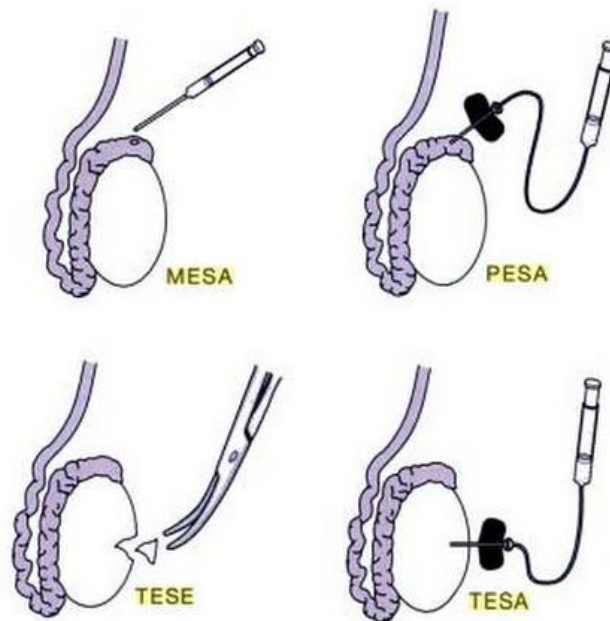
Para um resultado direto e confiável no resultado da ICSI, é necessário realizar métodos que requerem análises genéticas. Esse teste genético é utilizado para evitar a transmissão de distúrbios recorrentes graves pela identificação de uma simples mutação em algum gene identificada através de blastômeros biopsiados usando técnicas como PCR, amplificação do genoma completo ou “whole-genome amplification”; ensaios de polimorfismo de um nucleotídeo ou “single nucleotide polymorphism arrays” (SNP). Além disso, o sexo do embrião, bem como a translocação cromossomal podem ser identificadas usando o método FISH. Também, selecionando um único espermatozoide para o contato com o ovócito diminui a chance de transmissão viral, vírus como o HIV, VHC (Hepatite C), VHB (Hepatite B) e muitos outros. Na verdade, os vírus presentes livremente no sêmen e células acompanhantes podem se reduzir quando expostos a separação espermática por gradiente, o que faz com que a probabilidade de transmissão seja baixa (PALERMO et al., 2014a).

Procedimentos de coleta cirúrgica de espermatozoides vieram antes da introdução da ICSI ao universo da micromanipulação. São técnicas que se tornaram extremamente importantes no desenvolvimento da ICSI. São quatro procedimentos cirúrgicos que são realizados nos testículos, ou nas porções da via eferente dos espermatozoides, como o epidídimo e o ducto deferente. O objetivo dessas técnicas é tornar possível o uso de espermatozoides de homens com azoospermia não obstrutiva ou obstrutiva (que não tiveram sucesso na reconstrução cirúrgica) em técnicas de reprodução assistida, principalmente a ICSI (VIEIRA; NEVES, 2002).

Segundo a pesquisa de Palermo et al. (2014a), no centro de medicina reprodutiva da Universidade Cornell em Nova Iorque, de 1993 a 2010 um total de 20.629 ciclos de ICSI foram realizados, sendo aproximadamente 90% dos ciclos foram utilizados espermatozoides vindos do ejaculado e aproximadamente 10% foram obtidos através das técnicas cirúrgicas, ou seja, mais de 2.000 homens. Deixando claro que essas técnicas são extremamente importantes para o tratamento de infertilidade masculina.

Existem quatro principais técnicas para a obtenção de espermatozoides (Figura 5), a aspiração microcirúrgica de espermatozoides do epidídimo (MESA - “Microsurgical epididymal sperm aspiration”), a aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo (PESA – “Percutaneous epididymal sperm aspiration”), a aspiração de espermatozoides testiculares (TESA – “Testicular sperm aspiration”) e a extração de espermatozoides testiculares (TESE – “Testicular sperm extraction” (VIEIRA; NEVES, 2002).

Figura 5. Ilustração das quatro principais técnicas cirúrgicas de captura de espermatozoides usadas como auxílio para ICSI utilizadas em homens diagnosticados com azoospermia. Aspiração microcirúrgica de espermatozoides (MESA), aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo (PESA), extração de espermatozoides testiculares (TESE) e a aspiração de espermatozoides testiculares (TESA).



Fonte: Adaptado de Hirsh (2005).

Segundo a pesquisa de Gnoth et al. (2015) demonstraram que os resultados de uma injeção de um espermatozoide que a origem tanto do ejaculado quanto do obtido através de alguma técnica de obtenção de espermatozoide, no caso, testicular foram similares.

Discordando com o estudo acima, a pesquisa de Hameed e Ozturk (2010) diz que a origem dos espermatozoides tem efeito sobre o sucesso da ICSI. Principalmente em relação aos espermatozoides capturados diretamente dos testículos, a sua imaturidade pode afetar a fertilização, o desenvolvimento embrionário, a implantação e a gravidez.

Existem complicações que podem ocorrer devido ao uso da técnica ICSI, tanto com espermatozoides vindos do ejaculado, epidídimo ou testicular. Complicações como gravidez ectópica (1,9%), gravidez heterotópica (0,2%), aborto (20,6%), gravidez múltipla (28%), hipertensão induzida pela gravidez (10%), trabalho de parto prematuro (21,5%), baixo peso do bebê ao nascer (30,5%), e morte intrauterina (9,95%) foram relatadas (MERCHANT; GANDHI; ALLAHBADIA, 2011).

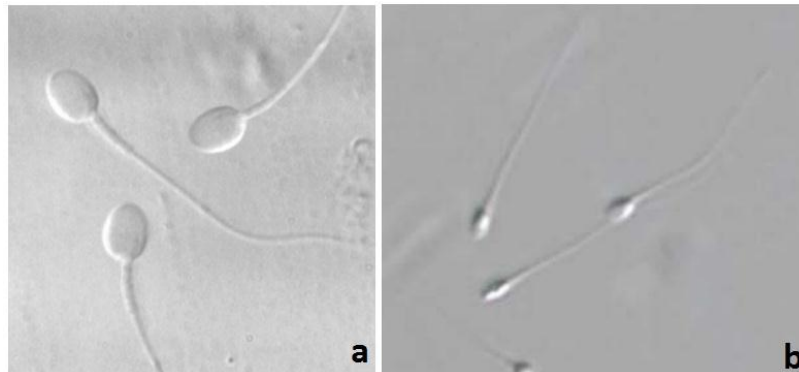
A partir da introdução e de vários estudos referente ao ICSI, ficou claro que a morfologia individual do espermatozoide usado na injeção estava relacionada com a fertilização do ovócito e tendo como resultado a gravidez. (DE VOS et al., 2013a). Um remanescente problema da ICSI é o passo da seleção do espermatozoide para a microinjeção. A lente usada para a visualização do espermatozoide não providencia uma resolução suficiente para a identificação de pequenos defeitos e de anormalidades morfológicas, levando em consideração que a qualidade morfológica do espermatozoide é um papel importantíssimo para a fertilização, implantação e a gravidez (LEANDRI et al., 2013).

4.2.1 Super-ICSI

A Super-ICSI ou também chamada de IMSI, abreviação de “intracytoplasmic morphologically selected sperm injection”, ou injeção intracitoplasmática de espermatozoide morfolologicamente selecionado, é um tratamento semelhante à ICSI convencional. Tem uma forma de visualização mais precisa do espermatozoide na seleção (DE VOS et al., 2013b; LA SALA et al., 2015).

O nome Super-ICSI é devido ao aumento superior a 6.600 vezes, considerado um “ICSI avançado”, que tem um sistema de alta resolução óptica acoplado ao microscópio, o que difere do ICSI convencional, que geralmente oferece um aumento de até 400 vezes (Figura 6) (LO MONTE et al., 2013).

Figura 6. Espermatozoides visualizados em alta magnificação (a) e em baixa magnificação (b).



Fonte: Adaptado de Lo Monte et al. (2013) e Oliveira et al. (2009).

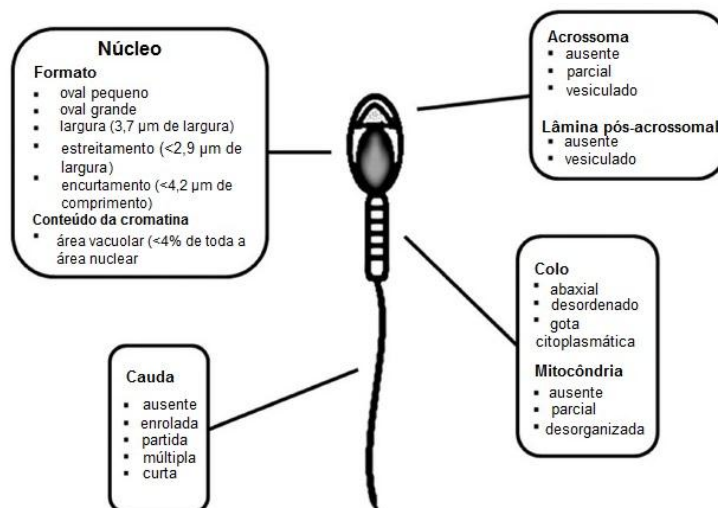
Para se observar cada espermatozoide em alta amplificação, inicialmente foi utilizado um microscópio invertido equipado com contraste de interferência diferencial (NADALINI et al., 2009).

Em 2002, Bartoov e colaboradores desenvolveram um novo método de avaliação do espermatozoide, chamado “motile sperm organelle morphology examination” (MSOME), que é um método de análise da morfologia espermática em alta magnificação. A aplicação desse método nos procedimentos de candidatos ao ICSI e FIV fez com que se desenvolvesse o super-ICSI (DE VOS et al., 2013a)

Inicialmente o MSOME avaliava seis organelas dos espermatozoides: a acrossoma, a lâmina pós-acrossomal, a peça intermediária, as mitocôndrias, a cauda e o núcleo. (Figura 7) (DE VOS et al., 2013a). A normalidade morfológica do núcleo do espermatozoide era definida pelo formato (suave, simétrico e oval) e o conteúdo da cromatina (a homogeneidade da massa da cromatina não deve conter extrusão ou invaginação, e os vacúolos não podem acometer mais 4% da área nuclear). Os limites médios de comprimento e largura do núcleo espermático foram estimados em $4,75 \pm 0,28$ e $3,28 \pm 0,20$ μm , respectivamente. Quanto ao acrossoma e a lâmina pós-acrossomal, são considerados anormais se estiverem ausentes, parciais ou com presença de vesículas, assim como as mitocôndrias normais, que não devem estar ausentes, parciais ou desorganizadas. A porção intermediária é considerada anormal a presença de

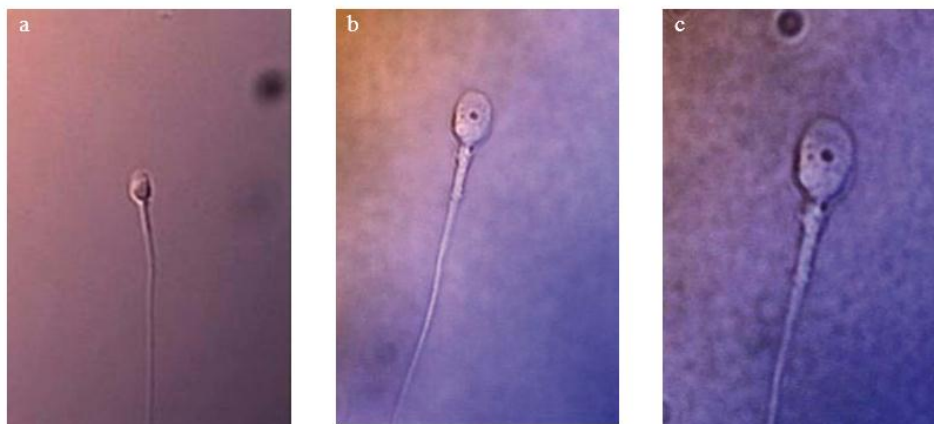
um pescoço abaxial, com presença de desordem ou gotículas citoplasmáticas, e a cauda não pode estar enrolada, quebrada, curta ou dupla (NADALINI et al., 2009).

Figura 7. Morfologia do espermatozoide de acordo com o método MSOME.



Fonte: Adaptado de Lo Monte et al. (2013).

Figura 8. Espermatozóide humano: (A) $\times 400$, aparentemente adequado para ser injetado no procedimento de ICSI; (B) $\times 3670$, o mesmo espermatozóide mostrando cabeça (vacúolos, vesículas, lâmina pós-cromossomal irregular) e deformações no pescoço; (C) $\times 5880$, um foco maior nas malformações anteriores.



Fonte: Adaptado de Antinori et al. (2008).

Um estudo comparativo feito por Oliveira et al. (2009) em que comparou a classificação MSOME com a classificação morfológica de Tygerberg, concluiu que o MSOME é um critério muito mais rigoroso de classificação de morfologia espermática que o critério de Tygerberg. Uma vez que o MSOME identifica vacúolos e anormalidades da cromatina que não são avaliadas com tanta precisão no critério de Tygerberg. A partir desse estudo, pode-se concluir que o MSOME é um critério diferenciado e superior que os critérios normalmente utilizados na análise seminal de rotina.

As indicações para o IMSI são frequentemente indiretas, como recorrentes falhas de implantação, altos níveis de fragmentação do DNA, altos níveis de aneuploidia espermática ou abortos precoces repetidos, e até mesmo falha no procedimento de ICSI convencional (LO MONTE et al., 2013).

Com o IMSI é possível a identificação de pequenos defeitos e anormalidades morfológicas que não seriam possíveis de visualizar, e com isso aperfeiçoa os resultados do ICSI, a avaliação é feita em tempo real. Através da melhor avaliação dos espermatozoides, associando o método MSOME com o IMSI, foi possível observar um significativo aumento qualidade do embrião, da implantação, das taxas de gravidez e da chance de vida saudável da criança, enquanto a taxa de aborto ficou significativamente diminuída (LEANDRI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2010).

Segundo um estudo comparativo feito por González-Ortega et al. (2010), a taxa de gestação IMSI foi de 63% e a da ICSI de 50%. Outra estudo pode comprovar também, segundo Knez et al. (2011) que as taxas de implantação e gestação do IMSI são maiores que a da ICSI, 17.1% vs. 6.8%, e de 25.0% vs. 8.1%, respectivamente.

Já o estudo de Leandri et al. (2013), não mostrou resultados que mostrem superioridade do IMSI quando comparados com a ICSI, os resultados foram quase similares, tendo diferença de um pouco mais de 1% nas taxas de nascimentos, porém os pesquisadores não tiram a importância da seleção do melhor espermatozoide e de desenvolvimento de técnicas que melhorem a análise para evitar altas fragmentações de DNA espermático resolvendo os casos de falhas na ICSI convencional.

5. ICSI e infertilidade masculina

Inicialmente, em 1992, quando foi relatado pela primeira vez o uso da ICSI com sucesso de gestações, foi dada como uma técnica promissora no tratamento dos casos de

infertilidade que através de técnicas de micromanipulação de gametas anteriores (como FIV e SUZI, por exemplo) não conseguiram resolver. A partir daí foi óbvio perceber que os casos que não tinham sido solucionados eram a maioria casos de infertilidade masculina. Nesse estudo foi possível confirmar 65% de embriões fertilizados de boa qualidade (PALERMO et al., 1992).

Nagy et al. (1998) não encontraram parâmetros espermáticos que afetem resultados de fertilização e gravidez feitas pela técnica ICSI. Os parâmetros espermáticos utilizados foram: a contagem de espermatozoides, a motilidade e a morfologia. Os resultados da pesquisa mostraram que essas características, bem como o tipo e a extensão do comprometimento do espermatozoide não tinham uma influência importante no resultado da ICSI, exceto se estivessem imóveis (presumidamente mortos) ou com a cabeça redonda (sem acrossoma). Concluindo que a injeção de espermatozoides móveis (vivos) em ovócitos é o fator mais importante na determinação de bons resultados com a ICSI, e que a maioria dos casos de infertilidade masculina tem a chance de procriar através da técnica, uma vez que a seleção do melhor espermatozoide seja feita rigorosamente.

Outro dado que comprova que o tipo de infertilidade masculina não é uma barreira para a obtenção de gravidez através da ICSI é o fato da fonte dos espermatozoides, como por exemplo, os oriundos de fonte epididimal, testicular ou do ejaculado não influenciar no resultado da ICSI. Outros fatores que também parecem não influenciar na ICSI são: O estado do sêmen, se fresco ou criopreservado, bem como se o paciente possui alguma obstrução na via reprodutiva. O fator realmente importante e significativo até o momento é a idade da mulher, considerando que obviamente os resultados da técnica com o uso de sêmen obtido do ejaculado são superiores (MERCHANT; GANDHI; ALLAHBADIA, 2011).

Schlegel e Girardi (1997) puderam afirmar que aplicação da ICSI para infertilidade severa de fator masculino permite taxas de gravidez de até 52% e que as taxas de gravidez em curso são 37% elevadas em relação ao FIV. E que tanto espermatozoides vindos do ejaculado quanto dos recuperados cirurgicamente podem ser aplicados ao ICSI com sucesso.

Busso et al. (2007), afirmaram que ICSI é um tratamento de baixo índice de complicações, como gestação múltipla e síndrome de hiperestímulo ovariano. Nesse estudo, os autores conseguiram recuperar 84,6% de ovócitos, nisso tiveram a taxa de fertilização de 70% e gestações por transferência de 29,6%. Das gestações conseguidas

a maioria era de mulheres com idade inferior a 37 anos, e a única gestação com mulher entre 37-43 anos evoluiu para abortamento. Com isso puderam dizer que ICSI em ciclos naturais é uma opção satisfatória de tratamento, e comprovaram novamente que a idade da mulher é o fator que influencia muito nas taxas e no sucesso da ICSI, ou seja, os resultados são melhores em pacientes mais jovens, com idade inferior a 37 anos.

Um dos mais comuns casos de infertilidade masculina, que no mundo todo equivale a aproximadamente 40% dos casos, a varicocele é um tipo de causa tratável. O estudo feito por Pathak et al. (2016) pode comprovar que o reparo cirúrgico da varicocele ajuda a melhorar os parâmetros seminais de homens com esse problema, e a partir daí aumentar as taxas de sucesso da fertilização tanto usando a FIV quanto a ICSI, ou ainda diminuir a utilização dessas técnicas de reprodução.

A severa teratozoospermia foi observada por French et al. (2010) para saber se esse grau de infertilidade afetaria a formação do blastocisto para o uso na ICSI, e foi possível afirmar que a presença de uma teratozoospermia completa não atua de forma negativa para o sucesso da ICSI, embora fosse possível observar que IIU e FIV, a morfologia espermática afeta no sucesso dessas técnicas. Logo, ICSI é a melhor solução nos casos de alterações espermáticas morfológicas severas.

Outro tipo de infertilidade é a oligoastenozoospermia, que é definida com alteração na concentração e motilidade dos espermatozoides, segundo Shuai et al. (2015) comparando os resultados de fertilização, qualidade embrionária e implantação não foram diferentes. Mas foi possível ver que o número de embriões de boa qualidade foi significativamente maior nos casos de ICSI do que usando o método FIV. Foi também sugerido pelos autores que homens oligoastenozoospermicos moderados não deveriam ser submetidos ao método ICSI por causa da segurança em relação aos fatores genéticos que ainda estão sob avaliação.

Mas de acordo com Turhan et al. (2011) demonstraram que os defeitos de motilidade desse tipo de caso não impede a fertilização e nem a produção normal de embriões. Foi selecionado dois grupos de pacientes oligoastenozoospermicos, sendo que o primeiro grupo tinha motilidade progressiva de 10% e o outro grupo tinha a motilidade progressiva maior ou igual a 10%. O resultado do segundo grupo foi de 62,5% e o primeiro foi de 32,5%. Logo, foi possível concluir que os resultados da ICSI são melhores em pacientes com motilidade progressiva acima de 10%.

6. Influência do procedimento da ICSI nas malformações congênitas e desenvolvimento pós-natal.

Há mais de duas décadas, ICSI vem contribuindo muito bem nos casos de infertilidade masculina, inclusive nos casos mais severos. Existem questões que vem sendo debatidas em relação ao risco sofrido pelos nascidos a partir desse procedimento, considerando que a técnica ultrapassa todas as barreiras de seleção natural dos espermatozoides e ovócitos (SANTOS, 2010).

Por esse motivo, pode-se dizer que a ICSI tem um maior potencial teratogênico quando comparado ao FIV. Teoricamente, riscos como mutações da doença fibrose cística ou deleções do cromossomo Y, podem ser encontradas na utilização de espermatozoides que podem transportar anormalidade genéticas. Espermatozoides que possuem defeitos estruturais como falta de proteínas espermáticas ou formas graves de teratozoospermia, também podem ser utilizados. Danos químicos ou mecânicos, como a ativação mecânica dos ovócitos e até mesmo na introdução de materiais não naturais no ovócito, como contaminação de meio de cultura ou injeção de DNA estranho vinda do esperma (ARAÚJO FILHO et al., 2006).

Em um estudo feito por Palermo et al. (2003), em um acompanhamento genético feito com nascidos com a ajuda da técnica ICSI, essas crianças tinham uma incidência alta de anormalidades cromossômicas (3,6%) comparados com a população geral. Entretanto, a anormalidade de cromossomos sexuais aumentou de nascidos de homens inférteis e com incidências da deleção do braço longo do cromossomo Y (Yq) o que é uma incidência esperada dentro da população oligospermica/azoospermica.

Em relação à qualidade seminal de jovens adultos nascidos pelo método ICSI, foi feito um estudo na Universidade Ziekenhuis, em Bruxelas, um pequeno grupo desses jovens tiveram os parâmetros abaixo dos valores de referência vindo da OMS no manual de 2010. O estudo indicou que crianças nascidas de ICSI com pais com caso de infertilidade severa teriam provavelmente três vezes mais chance de ter o nível de concentração espermática <15 milhões/ ml e quatro vezes mais chance de ter uma contagem total no ejaculado <39 milhões. Logo, deve ser interpretado que essa condição desses jovens terem uma qualidade seminal inferior aos valores normais, deve-se aos pais, e que provavelmente são problemas originados de uma espermatogênese defeituosa (BELVA et al., 2016).

Uma associação entre as técnicas de reprodução assistida e o autismo foi feita por Kissin et al. (2015), na Califórnia de 1997 a 2006. O diagnóstico de autismo foi encontrado em 1% das crianças nos primeiros cinco anos de vida, que nasceram com a ajuda dos métodos de reprodução assistida. Comparado com crianças não diagnosticadas, a maior parte delas eram meninos, gêmeos ou trigêmeos e maior ainda quando nasceram prematuros ou abaixo do peso. Os pais dessas crianças autistas eram mais velhos dos que os pais das crianças não autistas comparadas no estudo. Foi encontrada a incidência de diagnóstico de autismo de aproximadamente 0,8% nos procedimentos de reprodução assistida que resultaram em filhos únicos, e nos casos de gravidezes múltiplas a incidência de autismo foi de 1,2%.

Mas em resposta ao trabalho de Kissin et al. feita por Barad et al. (2015) dizendo que uma associação não pode ser considerada uma causa. E que se o risco de autismo realmente aumentar, conforme sugerido nesse trabalho, obviamente com o aumento da proporção dos ciclos de ICSI, deveria concomitantemente ter havido um aumento nos casos de autismo, o que não foi observado. Logo, a conclusão desse trabalho associando o risco aumentado para o autismo pareceu incorreto.

Fallah et al. (2011) compararam o desenvolvimento de crianças de 5 anos concebidas com a ajuda da reprodução assistida com crianças concebidas naturalmente, no Irã. O status de desenvolvimento dessas crianças foi feito através do teste que avalia a idade e o estágio da vida, chamado ASQ (ages and stages questionnaire) e fizeram uma entrevista com os pais dessas crianças. Nesse estudo concluíram que a principal influência no desenvolvimento da criança é o nível de educação materna e o peso ao nascimento.

Outro estudo de análise de desenvolvimento avaliou as capacidades cognitivas e motoras de concebidos através de ICSI, FIV e naturalmente. Ponjaert-Kristoffersen et al. (2005) fizeram testes de avaliação verbal e de desempenho, onde nenhuma diferença foi identificada entre os concebidos das técnicas de reprodução in vitro e os concebidos naturalmente. Em um teste os concebidos naturalmente tiveram um ponto acima dos nascidos de ICSI/FIV, mas essa variável pode ser explicada através de variáveis demográficas, como a idade e o nível de escolaridade materno que desempenham um papel importante no desenvolvimento cognitivo das crianças. Logo se pode dizer que o desenvolvimento motor e cognitivo tem influência materna no acompanhamento do crescimento do seu filho.

De acordo com Araújo Filho et al. (2006), estima-se que as crianças de ICSI tem aproximadamente 5% de risco de anormalidades cromossômicas, devido às aberrações cromossômicas vindas dos genitores, os pais em maioria. Foi feita uma análise populacional retrospectiva que foi possível observar uma taxa de malformações congênitas maiores (MCM), e o número aceitável é de 3%. Nesse estudo a taxa encontrada foi de 2,9%, que foram 520 crianças, sendo 15 casos de MCM.

Merchant, Gandhi e Allahbadia (2011), não encontraram diferenças em termos de anomalias genéticas congênitas, desenvolvimento comportamental e psicológico que tenham sido relatados em crianças concebidas por ICSI em comparação com crianças concebidos naturalmente. Sabendo-se que da participação genética na infertilidade masculina e da plausibilidade biológica de transmissão de doenças genéticas para a prole, obriga como parte do processo de tratamento de infertilidade uma avaliação abrangente, um exame físico, anamnese, análise seminal, teste de função espermática e testes genéticos (como o PDG) aplicados de forma eficaz e cuidadosa para que esses tipos de complicações não sejam maiores em comparação a concepção natural.

Recentemente, Cassuto (2016) avaliou em um estudo de coorte de 1070 crianças nascidas através das técnicas ICSI e IMSI, e observou que o risco de MCM foi menor quando utilizado o IMSI. No estudo 96% das crianças nasceram normais, comparando ICSI com IMSI as MCM foram significativamente baixas em IMSI com 1,33% contra 3,8% dos casos que utilizaram a ICSI, a maioria dos casos tinham problemas afetando o sistema urogenital. O autor tem como principal hipótese que a seleção do melhor espermatozoide diminui a incidência malformações. No entanto, os dados sobre o IMSI continuam a ser controversos porque os estudos comparando a ICSI com o IMSI em relação aos riscos de malformações não são suficientes para apoiar o uso do IMSI como substituição da ICSI.

7. Considerações finais

A ICSI é a técnica de micromanipulação de gametas mais bem sucedida para o tratamento de infertilidade de fator masculino e mudou de forma drástica o gerenciamento dos casos mais severos. Com a introdução dessa técnica dentro da reprodução assistida mais de dois milhões de crianças em todo o mundo nasceram e tem sido fundamental para ajudar homens com gametas de baixa qualidade no sonho de alcançar a reprodução.

Para o uso da ICSI, o tipo de infertilidade masculina e a situação do espermatozoide não influenciam tanto quanto a idade da mulher, mas precisa ser levado em consideração que o local de obtenção do espermatozoide influencia nas taxas de fertilização.

O uso do espermatozoide perfeito para a injeção é uma das etapas mais importantes do processo da técnica ICSI. Uma vez que ele pode ser capturado através de técnicas cirúrgicas ou do próprio ejaculado, várias questões são levantadas em relação à diferença nas taxas de sucesso entre essas formas de captura. Os espermatozoides obtidos do ejaculado tem taxas maiores de sucesso em relação aos conseguidos através de cirurgias. Sabendo que os pacientes azoospermicos estão impossibilitados de obterem espermatozoides através do ejaculado, essas técnicas de obtenção cirúrgicas são extremamente importantes.

Por ser uma técnica que atravessa as barreiras da seleção natural, tem sido muito discutido desde sua descoberta questões sobre perpetuação de anomalias genéticas, malformações, e desenvolvimento pós-natal. Apesar da possibilidade desses problemas, é possível minimizar através de vários procedimentos que antecedem a implantação do embrião, como o PGD ou o PGS, para tornar o método seguro em relação às questões genéticas, o que faz com que o método seja seguro e eficaz. O aconselhamento genético está totalmente indicado para casos de infertilidade masculina grave, seja com o uso da ICSI ou não.

Entretanto, estudos precisam ser feitos em relação à determinação do papel dos testes de aneuploidia do espermatozoide para auxiliar os conselheiros genéticos na previsão de anomalias cromossômicas nos embriões.

Embora existam estudos de acompanhamento das crianças nascidas, mais estudos são necessários e devem ser encorajados, pois o teste PGD analisa transtornos genéticos graves recorrentes da análise de DNA, da contaminação por DNA estranho de espermatozoide, que é um risco onipresente.

O método super-ICSI comparado com a ICSI convencional pode ser considerado melhor, quando falamos de melhor seleção do espermatozoide, por possibilitar uma análise melhorada do mesmo. Mas isso não quer dizer que a ICSI não seja eficaz e que o seu método de análise não seja totalmente seguro. Os estudos que foram feitos em relação às malformações e perpetuação de anomalias genéticas não são suficientes para que a super-ICSI possa vir como um método de substituição da ICSI.

As indicações para o uso da ICSI inicialmente eram para casos severos de infertilidade masculina que não poderiam ser solucionados através dos outros métodos de reprodução assistida, porém com o passar do tempo, foi possível utilizar essa técnica para vários outros problemas, como infertilidade de fator não masculino e idiopático. Logo, essa técnica não só soluciona a área da infertilidade masculina, mas sim o universo da reprodução humana assistida.

8. Referências

ADAMSON, G. D., BAKER, V. L. Subfertility: causes, treatment and outcome. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p-169-185, abr. 2003.

ANTINORI, M. et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 16, n. 6, p. 835-841, abr. 2008.

ARAÚJO FILHO, E. et al. Incidência de malformações congênitas em crianças concebidas através de injeção intracitoplasmática de espermatozoides. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 2, p. 81-90, fev. 2006.

BANSAL, K. **Manual of intrauterine insemination (IUI), in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI)**. 2. ed. Nova Deli: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2011.

BARAD, D. H. et al. CDC analysis of ICSI/ autism: association is not causation. **Human Reproduction**, Oxford, v. 30, n. 7, p. 1745-1746, jul. 2015.

BARTOOV, B., SCHNEIDER, I. Intracytoplasmic morphology selected sperm injection (IMSI/BFS) – an advanced technique for ICSI. **Eppendorf Applications**, nota 190, jun. 2008.

BELVA, F. et al. Semen quality of Young adult ICSI offspring: the first results. **Human Reproduction**, Oxford, 2016. Doi: 10.1093/humrep/dew245

BORGES, E. JR., SETTI, A. S., VINGRIS, L., FIGUEIRA, R. C., BRAGA, D. P., LACONELLI, A. JR. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcomes: the role of sperm preparation techniques. **Journal of assisted reproduction and genetics**, Nova Iorque, v.30, n.6, p. 849-854, jun. 2013.

BUSSO, N. E., BUSO, C.E., TSO, L. O., AUGÉ, A. P. F., BUSO, R. E., BOARO, L., PRADO, R. A. A. Fertilização in vitro com injeção intracitoplasmática de espermatozóide em ciclos naturais. **Revista Brasileira de Ginecologia e obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 7, p. 340-345, jul. 2007.

CASSUTO, N. G. Low birth defect by sperm selection: follow up prospective study children born. **Journal of genital system & disorders**, Henderson, v.5, n. 2, p. 1-2, mar. 2016.

DADA, R., SHAMSI, M. B., VENKATESH, S. Genetics of male infertility. In: RAO, A. K., AGARWAL, A., SRINIVAS, M. S. **Andrology laboratory manual**. 1. ed. Nova Deli: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2010, p. 3-10.

DE VOS, A. et al. POLYZOS, N. P., VERHEYEN. G., TOURNAYE, H. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a critical and evidence-based review. **Basic Clinical Andrology**, Londres, v. 23, n. 10, p. 1-8, 2013a

DE VOS, A. et al. Does intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improve embryo development? A randomized sibling-oocyte study. **European Society of Human Reproduction and Embryology**, Grimbergen, v. 28, n. 3, p. 617-626, jan. 2013b.

DINIS, R. A. F. **Hipogonadismo Hipogonadotrófico e Infertilidade Masculina**. Trabalho final de mestrado. Coimbra. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2014.

ELDER, K., DALE, B. **In-vitro fertilization**. 3. ed. Nova Iorque: Cambridge University Press, 2011.

ESTEVES, S. C., MIYAOKA, R., AGARWAL, A. An Update on the clinical assessment of the infertile male. **Clinics**, São Paulo, v. 66, n. 4, p. 691-700, fev. 2011.

FALLAH, R. et al. Comparison of developmental status of 5-year-old singleton children born through assisted and natural conceptions. **Iranian journal of reproductive medicine**, Yazd, v. 11, n. 5, p. 365-370, maio. 2013.

FEIJÓ, C. M. et al. Espermograma. In: DZIK, A. et al. **Atlas de reprodução humana**. São Paulo: Segmento Farma, 2012, p-45-54.

FENG, H. L. Molecular biology of male infertility. **Archives of Andrology**, Londres, v. 49, n. 1, p. 19-27, jan-fev. 2003.

FRENCH, D. B. et al. Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? **Fertility and Sterility**, Nova Iorque, v. 93, n. 4, p. 1097-1103, mar. 2010.

GAMEIRO, S., SILVA, S., CANAVARRO, M. C. A experiência masculina de infertilidade e de reprodução medicamente assistida. **Psicologia, Saúde & Doenças**, Lisboa, v. 9, n. 2, p. 253-270, nov. 2008.

GNOTH, C., et al. Impact of sperm cell source on the results of intracytoplasmic sperm injection. **Archives of gynecology and obstetrics**, Berlim, v. 291, n. 3, p. 663-669, set. 2015.

GONZÁLEZ-ORTEGA, C., et al. Inyección intracitoplásmica de espermatozoides morfológicamente seleccionados (IMSI) vs inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) em pacientes com fala repetida a ICSI. **Ginecología y Obstetricia de México**, Guadalajara, v. 78, n.12. p. 652-659, dez. 2010.

HAMEED, N., OZTURK, O. Testicular versus epididymal spermatozoa in intracytoplasmic sperm injection treatment cycles. **Journal of ayub medical college**, Paquistão, v. 22, n. 4, p. 159-163, out-dez. 2010.

HAMMADEH, M. E., FISCHER-HAMMADEH, C., ALI, K. R. Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art. **Journal of assisted reproduction and genetics**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 119-128, fev. 2011.

HIRSH, A. V. The management of infertile men presenting in the assisted conception unit In: BRINSDEN, P. R. **A textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction: the Bourn Hall guide to clinical and laboratory practice**. Nova Iorque: Taylor & Francis, 2005, p. 50.

IRIS, A., AYDOGAN KIRMIZI, D., TANER, C. E. Effects of infertility and infertility duration on female sexual functions. **Archives of gynecology and obstetrics**, Berlim, v. 287, n. 4, p. 809-812, abr. 2013.

ISIDORI, A., LATINI, M. ROMANELLI, F. Treatment of male infertility. **Contraception**, Nova Iorque, v. 72, p. 314-318, out. 2005.

JAFFE, L. A., TERASAKI, M. Quatitative microinjection of oocytes, eggs and embryos. **Methods in cell biology**, Nova Iorque, n. 74, p. 219-242, ago. 2004.

JUNGWIRTH, A. et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility. **European urology**, Amsterdam, v. 62, n.2, p. 324-332, ago. 2012.

KAMEL, R. M. Assisted Reproductive Technology after the Birth of Louise Brown. **Journal of Reproduction & Infertility**, Teerão, v. 14, n. 3, p. 96-109, ago. 2013.

KISSIN D. M. et al. Association of assisted reproductive technology (ART) treatment and parental infertility diagnosis with autism in ART-conceived children. **Human Reproduction**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 454-465, fev. 2015.

KNEZ, K. et al. The IMSI procedure improves poor embryo development in the same infertile couples with poor semen quality: a comparative prospective randomized study. **Reproductive biology and endrocrinology**. Londres, v. 9, n. 123, p. 1-8, ago. 2011.

KNOESTER, M. et al. Matched follow-up study of 5-8 years old ICSI-singletons: comparison of their neuromotor development of IVF and naturally conceived singletons. **Human reproduction**, Oxford, v. 22, n.6, p. 1638-1646, jun. 2007.

KRAUSZ, C. Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, Amsterdam, v. 25, n.2, p. 271-285, abr. 2011.

LAMMARONE, E., et al. Male infertility. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 211-229, abr. 2003.

LA SALA, G. B., NICOLI, A., FORNACIARI, E., FALBO, A., RONDINI, I., MORINI, D., VALLI, B., VILLANI, M. T., PALOMBA, S. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection versus conventional intracytoplasmic sperm injection: a randomized controlled trial. **Reproductive biology and endocrinology**, Londres, v. 13, n. 97, p. 1-11, ago. 2015.

LEANDRI, R. D., et al. Is intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) beneficial in the first ART cycle: a multicentric randomized controlled trial. **American Society of Andrology and European Academy of Andrology**, Oxford, v. 1, n. 5, p. 692-697, set. 2013

LINDSAY, T. J., VITRIKAS, K. R. Evaluation and treatment of infertility. **American Family Physician**, Leawood, v. 91, n. 5, p. 308-314, mar, 2015.

LO MONTE, G. ET AL. Focus on intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a mini review. **Asian Journal of Andrology**, Pequim, v. 15, n. 5, p. 608-615, set. 2013.

MARTINS, C. F., SILVA, A. E. D., FRUMPT, R. Injeção intracitoplasmática de células espermáticas e suas aplicações na reprodução dos bovinos – **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, v. 84, p.1-39, 2002.

MASCARENHAS, M. N. et al. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. **Public Library of Science medicine**, São Francisco, v.12, n. 9: e1001356, dez. 2012.

MENIRU, G. I. **Cambridge Guide to Infertility Management and Assisted Reproduction**. 1. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.

MERCHANT, R., GANDHI, G., ALLAHBADIA, G. N. In vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection for male infertility. **Indian journal of urology**, Bombaim, v. 27, n. 1, p. 121-132, jan. 2011.

MUKHERJEE, G. G., PAL, B., SARKAR, M. Intrauterine insemination – An overview. In: MUKHERJEE, G. G., CHAKRAVARTY, B. N. **IUI: Intrauterine insemination 2**. ed. Nova Deli: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2012, p. 3-11.

NADALINI, M. et al. Impact of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection on assisted reproduction outcome: a review. **Reproductive biomedicine online**, Cambridge, v. 19, n. 3, p. 45-55, out. 2009.

NAGY, Z. P., et al. Special applications of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. **Human reproduction**, Oxford, v. 13, n. suplemento 1, p. 143-154, abr.1998.

NAKAGAWA, K. et al. Advanced scheduling for zygote intrafallopian transfer is possible via the use of a hormone replacement cycle for patients who have experienced repeated implantation failures. **Archives of gynecology and obstetrics**, Berlim, v. 290, n. 5, p. 1031-1035, nov. 2014.

NERI, Q. V. et al. Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Cell Calcium**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 24-37, jan. 2014.

NEVES, P. A. Micromanipulação de gamentas. In: NEVES, P. A., NETTO JR, N. R. **Infertilidade Masculina**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2002, p.211-218 .

OLIVEIRA, J. B., et al. Motile sperm organelle morphology examination is stricter than Tygerberg criteria. **Reproductive biomedicine online**, Amsterdam, v. 18, n. 3, p. 320-326, mar. 2009.

OLIVEIRA, J. B. et al. Motile sperm organelle morphology examination (MSOME): intervariation study of normal sperm and sperm with large nuclear vacuoles. **Reproductive Biology and Endocrinology**, Londres, v. 8, n. 56, p. 1-7, jun. 2010.

PALERMO, G. D. et al. Application of intracytoplasmic sperm injection in assisted reproductive technologies. **Reproductive BioMedicine Online**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 456-463, fev. 2003.

PALERMO, G. D. et al. Treatment of male infertility. **Methods in molecular biology**. Totowa, v. 1154, p. 385-405, abr. 2014a.

PALERMO, G. D. et al. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in extreme cases of male infertility. **Public Library of Science one**, São Francisco, v. 9, n. 12: e113671, dez. 2014b.

PALERMO, G. D., JORI, H. DEVROEY, P. VAN STEIRTEGHEM, A. C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. **Lancet**, Nova Iorque, v. 340, n.8810, p.17-18, jul. 1992.

PALERMO, G. D., NERI, Q. V., ROSENWAKS. To ICSI or not to ICSI. **Seminars in reproductive medicine**, Nova Iorque, v. 33, n. 2, p. 92-102, mar. 2015.

PASSOS, E. P. et al. Infertilidade. In: FREITAS, F.M. et al. **Rotinas em ginecologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011, p. 686-693.

PASQUALOTTO, F. F. Investigação e reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina. **Revista Brasileira de Ginecologia e obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, p. 103-112, fev. 2007.

PATHAK, P. et al. Varicocele management in the era of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. . **Asian Journal of Andrology**, Pequim, v. 18, n. 3, p. 343-348, maio-jun. 2016.

PONJAERT-KRISTOFFERSEN, I. et al. International collaborative study of Intracytoplasmic sperm injection-conceived, in vitro fertilization-conceived, and

naturally conceived 5-year-old child outcomes: cognitive and motor assessments. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 115, n. 3, e283-e289, mar. 2005.

RAO, K. A., CARP, H., FISCHER, R. **Principles and practice of assisted reproductive technology**. 1. ed. Nova Deli: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2014.

ROTHER, E. T. Revisão sistemática X revisão narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. V-VI, abr-jun. 2007.

ROUPA, Z. et al. Causes of infertility in women at reproductive age. **Health Science Journal**, Delaware, v. 3, n. 2, p 80-87, abr./jun. 2009.

SANTOS, M. F. O. Injeção intracitoplasmática de espermatozoides: questões éticas e legais. **Revista Brasileira Saúde Materno Infantil**, Recife, v. 10, supl. 2, p. S290-S293, dez. 2010.

SCHLEGEL, P. N., GIRARDI, S. K. Clinical review 87: In vitro fertilization for male factor infertility. **The journal of clinical endocrinology and metabolism**, Nova Iorque, v. 82, n. 3, p. 709-716, mar. 1997.

SHUAI, H. L. et al. Comparison of conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcomes in patients with moderate oligoasthenozoospermia. **Andrologia**, Berlim, v. 47, n. 5, p. 499-504, jun. 2015.

SOARES, S., RODRIGUES, T., BARROS, H. Prevalência de infertilidade na cidade do porto. **Acta médica portuguesa**, Lisboa, v. 24, n. 5, p. 699-706, mar. 2011.

TAEBI, M. et al. Association between infertility factors and non-physical partner abuse in infertile couples. **Iranian Journal of nursing and midwifery research**, Bombaim, v. 21, n. 4, p. 368-371, jul-ago. 2016.

TURHAN, N. et al. ICSI outcome in severely oligoasthenozoospermic patients and its relationship to prewash progressive sperm motility. **Turkish journal of medical sciences**. Turquia, v. 41, n. 6, p. 995-999, dez. 2011.

VAN VOORHIS, B. J. In vitro fertilization. **The new England journal of medicine**, Waltham, v. 356, n. 4, p. 379-386, jan. 2007.

VIEIRA, M, NEVES, P. A. Técnicas de coleta cirúrgica de espermatozoides. MESA, PESA, TESE, TESA In: NEVES, P. A., NETTO JR, N. R. **Infertilidade Masculina**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2002, p. 169-174.

XELLA, S. et al. Embryo quality and implantation rate in two different culture media: ISM1 versus Universal IVF medium. **Fertility and Sterility**, Nova Iorque, v. 93, n. 6, p. 1859-1863, abr. 2010.

WHO. **WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 5 ed. Geneva: WHO press, 2010.

YING, L. Y., WU, L. H., LOKE, A. Y. The Experience of Chinese Couples Undergoing In Vitro Fertilization Treatment: Perception of the Treatment Process and Partner Support. **Public Library of Science one**, São Francisco, v. 10, n. 10: e0139691, out. 2015.

ZHENG, J. F. et al. ICSI treatment of severe male infertility can achieve prospective embryo quality compared with IVF of fertile donor sperm on sibling oocytes. **Asian Journal of Andrology**, Pequim, v. 17, n. 5, p. 845-849, set-out. 2015.