

Causas Espermáticas de Má Fertilização Após a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide

Leonardo Augusto Meyer de Moraes

Alessandra Clarizia

Ricardo Mello Marinho

João Pedro Junqueira Caetano

Clínica Pró-Criar / Mater Dei – Belo Horizonte, MG.

Endereço para Correspondência:

Clínica Pró-Criar / Mater Dei

Rua Alvarenga Peixoto 1365

Belo Horizonte - Minas Gerais

CEP: 30.180-121

TeleFax: (031) 292-5299

E-mail: pro-criar@fiv.com.br

RESUMO

Apesar de durante a ICSI o espermatozóide ser injetado diretamente no interior de um oócito maduro, nem sempre a fertilização ocorre. Esta não-fertilização pode estar relacionada a diversos fatores, sendo os fatores espermáticos os mais importantes, tais como presença de radicais livres no sêmen, anormalidades cromossômicas e defeitos protéicos na superfície dos gametas ou na organização de sua cromatina. A identificação destes fatores pode contribuir para a melhoria dos resultados após a ICSI.

UNITERMOS: compactação de DNA espermático, ICSI, cromomicina A₃, protamina, espécies reativas ao oxigênio.

Spermatic Causes of Failure Fertilization After Intracytoplasmic Sperm Injection

ABSTRACT

Even in the course of ICSI process the spermatozoa is injected into a mature oocyte, not always the fertilization occurs. This failure fertilization can be associated with several factors, been the spermatic factors the most important, such as free radicals in semen, chromosomal aberrations, and proteic deffects on gamete surface or in its cromatine packaging. The identification of these factors can contribute for better results after ICSI.

Key words: human spermatozoa chromatin packing, ICSI, chromomycin A₃, protamine, reactive oxygen species.

Introdução

As técnicas de reprodução assistida (TRA) empregadas atualmente para o tratamento da infertilidade vêm apresentando grande desenvolvimento tecnológico. Um marco importante no avanço das TRA ocorreu em 1992, quando Palermo *et al.* descreveram a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), a qual revolucionou o tratamento da infertilidade por fator masculino grave. Já em 1993, Van Steirteghem *et al.* reportaram taxas de gestação de aproximadamente 35%, bastante superiores àquelas obtidas com a utilização de outras técnicas de micromanipulação de gametas (PZD- partial zone dissection; SUZI- subzonal insertion). Assim sendo, a ICSI é hoje a TRA mais empregada nos casos onde existem graves alterações nos parâmetros seminais, superando os resultados obtidos com qualquer outro tipo de técnica.

Com o advento da ICSI, postulou-se que a infertilidade masculina estaria com seus dias contados, pois com a utilização dessa técnica não haveria mais obstáculos para a interação dos gametas (Payne *et al.*, 1994). O único critério necessário para realização da ICSI é a presença de, no mínimo, um espermatozóide vivo na amostra seminal, haja visto que a concentração, motilidade e morfologia espermáticas não apresentam influência significativa sobre as taxas de fertilização (Nagy *et al.*, 1995). Entretanto, o que se observa na prática é que as taxas de fertilização pós-ICSI podem variar de 30% a 80%, ou seja, mesmo injetando-se um espermatozóide no interior de um oócito maduro, pode haver uma taxa de insucesso significativa. Dubey *et al.* (1997), estudando oócitos que apresentaram falha de fertilização após a ICSI, demonstraram que a falha técnica na deposição do espermatozóide no interior do oócito não é a maior causa de falha de fertilização em ciclos de ICSI. Assim sendo, a não ocorrência de fertilização com a utilização da ICSI pode estar relacionada a outros fatores, tais como a presença de radicais livres no sêmen, anormalidades cromossômicas e defeitos protéicos na superfície dos

gametas ou na organização de sua cromatina. O papel desses fatores intrínsecos, de origem espermática e oocitária, devem ser melhor estudados, pois podem estar relacionados a um mau prognóstico após a ICSI, uma vez que impossibilitam a conclusão da meiose, a descondensação do DNA e a formação dos pró-núcleos (Sakkas *et al.*, 1996; Dubey *et al.*, 1997). Embora a fisiologia deste mau resultado pós-ICSI ainda não seja compreendida, há evidências de que alterações bioquímicas ou até mesmo moleculares inerentes ao espermatozóide sejam mais importantes que a morfologia espermática (Sakkas *et al.*, 1996). Além disso, a deficiência de alguns fatores contidos no citoplasma do oócito, responsáveis pela descondensação da cromatina espermática, também contribui para a falha de fertilização pós-ICSI (Dubey *et al.*, 1997). A deficiência desses fatores responsáveis pela descondensação da cromatina ocorre quando não há maturação citoplasmática completa do oócito, mesmo quando este se encontra em metáfase II quando injetado (Dubey *et al.*, 1997). Diante dessas observações, estudos devem ser realizados com o intuito de se desenvolverem técnicas que possibilitem a investigação das anormalidades moleculares (DNA). A seguir, abordaremos algumas causas de má-fertilização após a ICSI relacionadas ao espermatozóide.

Anormalidades na Compactação da Cromatina Espermática

A compactação do DNA espermático ocorre durante a espermatogênese e depende fundamentalmente da presença de protamina (Bianchi *et al.*, 1996b). Esta alta compactação da cromatina nuclear espermática ocorre fundamentalmente através da troca de histonas pela protamina, o que torna o DNA espermático altamente resistente às desnaturações físicas e químicas (Lopes *et al.*, 1998). Em homens subférteis, defeitos na compactação da cromatina causam instabilidade do DNA e maior susceptibilidade à desnaturação (Manicardi *et al.*, 1995).

Após a fertilização do oócito, ocorre então a descondensação da cromatina espermática, processo indispensável para que ocorra a interação entre os gametas (Sakkas *et al.*, 1996).

A defeituosa deposição de protamina durante a espermatogênese parece ser um dos principais fatores relacionados aos problemas na compactação do DNA. Vários estudos têm demonstrado que espermatozoides de pacientes inférteis exibem anomalias em sua cromatina relacionadas à deposição irregular de protamina durante a espermatogênese. As regiões do DNA que apresentam deficiência de protamina têm grande probabilidade de exibirem alterações importantes, tais como desnaturação e fragmentação (Yebra *et al.*, 1993; Bianchi *et al.*, 1993). Como a qualidade da espermatogênese está diretamente subordinada a fatores genéticos e às condições do trato reprodutivo, anormalidades relacionadas a esses fatores podem ter como consequência irregularidades no depósito de protamina e falhas no processo de compactação e proteção da cromatina espermática. Portanto, defeitos relacionados à protamina estão atribuídos a fatores genéticos e anomalias no trato reprodutivo masculino, sendo causas importantes de anormalidades no processo de compactação do DNA (Sakkas *et al.*, 1996).

Experimentalmente, tem sido utilizado um método que tem como objetivo verificar a qualidade da compactação da cromatina espermática, denominado Cromomicina A₃ (CMA₃). Essa substância é um fluorocromo guanina-citosina específico que evidencia a baixa qualidade de compactação da cromatina em espermatozoides humanos. Assim sendo, a CMA₃ permite uma visualização indireta da deficiência de protamina e da quebra ou desnaturação parcial do DNA (Bianchi *et al.*, 1993 e 1996a,b; Manicardi *et al.*, 1995; Sakkas *et al.*, 1996).

Experiências utilizando CMA₃ mostraram que sêmens com alta fluorescência (taxas de CMA₃->40%) estão relacionados a alterações na morfologia espermática e baixas taxas de fertilização utilizando-se SUZI (Bianchi *et al.*, 1996a). Esterhuizen *et al.* (2000) observaram que sêmens com <4% de formas normais pela morfologia estrita apresentam taxas significativamente

mais elevadas de CMA₃ em comparação às amostras com >4% de formas normais. Além disso, estes autores reportaram uma relação inversa significativa entre os níveis de CMA₃ e as taxas de fertilização após FIV. Por outro lado, Sakkas *et al.* (1996) não observaram diferença significativa entre as taxas de fertilização de pacientes com altas ou baixas taxas de CMA₃-positivo utilizando-se a ICSI. Gravidezes foram obtidas utilizando espermatozóides de pacientes com alta fluorescência CMA₃ e grande quantidade de fragmentação de DNA. Entretanto, ao analisarem os espermatozóides injetados em oócitos que não fertilizaram, observaram maior incidência de espermatozóides que permaneceram com suas cromatinas condensadas entre os pacientes com altas taxas de CMA₃-positivo. Uma conclusão sobre este achado seria que a baixa qualidade da compactação da cromatina espermática prejudicaria o processo de descondensação do DNA espermático após a fertilização e a interação entre os gametas, podendo representar uma possível causa de ausência de fertilização após a ICSI. De fato, um estudo realizado por Lopes *et al.* (1998) demonstrou que defeitos do DNA espermático podem contribuir para a falha de fertilização após a ICSI.

Portanto, a utilização da CMA₃ pode ser útil para nos informar sobre a qualidade da compactação da cromatina, permitindo a visualização indireta da deficiência de protamina e evidenciando a presença de quebras endógenas do DNA espermático (Bianchi *et al.*, 1996a,b; Sakkas *et al.*, 1996). A detecção de alterações da cromatina espermática poderia ser incluída como um método complementar na avaliação do fator masculino, pois apresenta grande valor prognóstico em relação aos resultados das técnicas de fertilização assistida.

Espécies Reativas de Oxigênio

As espécies reativas ao oxigênio (ERO) vêm sendo estudadas desde a década de 80, sendo apontadas como importante causa de infertilidade. As ERO incluem os radicais livres, os

quais são agentes potencialmente oxidativos. As principais ERO presentes no sêmen são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH) (Wolff, 1995), dentre os quais o peróxido de hidrogênio apresenta ação mais deletéria sobre os espermatozóides humanos (de Lamirande & Gagnon, 1992). A maior concentração de ERO observada em sêmens de pacientes inférteis (D'Agata *et al.*, 1990; Aitken *et al.*, 1991; Iwasaki & Gagnon, 1992; Mazzilli *et al.*, 1994) e em sêmens com concentração, motilidade e morfologia alteradas (Agarwal *et al.*, 1994; Sukcharoen *et al.*, 1995, 1996; Zalata *et al.*, 1995) demonstram a ação deletéria dos radicais livres de oxigênio sobre o espermatozóide e sobre as diversas etapas da fertilização.

A fonte primária das ERO no plasma seminal são os próprios espermatozóides e os leucócitos polimorfonucleares. As ERO são fisiologicamente produzidas pelo espermatozóide e são necessárias, por exemplo, para a ocorrência dos processos de capacitação espermática e reação acrossômica (de Lamirande *et al.*, 1993). Entretanto, existem fortes indícios de que os radicais livres estejam envolvidos na etiologia dos defeitos da função espermática, pois altas concentrações de ERO promovem a peroxidação dos ácidos graxos insaturados da membrana plasmática do espermatozóide, a qual se torna mais rígida (Jones *et al.*, 1979). Este aumento da rigidez da membrana plasmática do espermatozóide afeta diretamente os resultados da FIV, pois prejudica o processo de fusão do espermatozóide com o oócito (Jones *et al.*, 1979; Aitken, 1989; Aitken *et al.*, 1989) e também a clivagem embrionária (Nasr-Esfahani *et al.*, 1990, 1992). O espermatozóide humano é particularmente susceptível ao dano peroxidativo, pois suas membranas contêm altas concentrações de ácidos graxos insaturados (Jones *et al.*, 1979). Esta riqueza em ácidos graxos insaturados confere maior fluidez às membranas dos espermatozóides, fator indispensável para o processo de fusão com a membrana oocitária durante a fertilização (Aitken & Fisher, 1994).

Um outro fator que contribui para o aumento na geração de ERO é a remoção do plasma seminal e o processo de centrifugação e ressuspensão utilizados no preparo do sêmen para as TRA (Iwasaki & Gagnon, 1992; Agarwal *et al.*, 1994). Este processo promove um contato direto dos espermatozóides com os leucócitos, sabidamente produtores de ERO (Aitken & Clarkson, 1988). Já a remoção do plasma seminal torna os espermatozóides mais susceptíveis ao dano oxidativo, pois a maioria das substâncias antioxidantes estão presentes no plasma seminal (Jones *et al.*, 1979; Iwasaki & Gagnon, 1992). Homens com alta proteção pelo plasma seminal podem tolerar altos níveis de ERO no sêmen, enquanto aqueles com baixos níveis de ERO podem apresentar danos severos em seus espermatozóides devido à deficiência de substâncias antioxidantes (Kovalski *et al.*, 1992). As variações que ocorrem na tensão de oxigênio durante a manipulação dos gametas representam um outro fator que pode promover aumento na geração de ERO, prejudicando o desenvolvimento embrionário (Pabon *et al.*, 1989).

Os altos níveis de ERO observados em sêmens alterados parecem ser decorrentes de defeitos na espermatogênese, havendo retenção de um excesso de citoplasma residual e aumento da disponibilidade de algumas enzimas citoplasmáticas que favorecem a geração de ERO (Aitken & Fisher, 1994), o que explicaria o baixo potencial de fertilização de espermatozóides anormais. Portanto, a produção excessiva de ERO pelos espermatozóides contribui para as baixas taxas de sucesso obtidas pela FIV convencional na presença de fator masculino.

Por outro lado, hoje se sabe da interferência das ERO sobre a estrutura do DNA espermático, fragmentando-o, sendo portanto causa indireta de má-fertilização através da interferência no processo de compactação do DNA. Lopes *et al.* (1998) demonstraram que altas concentrações de ERO no sêmen podem levar a problemas a nível molecular, como por exemplo distúrbios na descondensação da cromatina espermática e fragmentação do DNA. Assim sendo, altos níveis de radicais livres podem também influir nos resultados da ICSI e a utilização de

substâncias antioxidantes durante o preparo do sêmen para ICSI podem reduzir significativamente o dano ao espermatozóide e contribuir para melhores resultados (Lopes *et al.*, 1998).

Aberrações Cromossômicas

A incidência de aberrações cromossômicas entre casais inférteis, tanto no homem quanto na mulher, é bastante elevada se comparada à incidência na população geral (Hens *et al.*, 1988). Esta incidência também é bastante alta entre os homens com graves alterações nos parâmetros seminais (Pandiyana & Jequier, 1996). Com o advento da ICSI, deu-se oportunidade a estes homens de terem filhos, os quais podem herdar as aberrações cromossômicas dos pais e, conseqüentemente, serem também inférteis (Testart *et al.*, 1996). Entretanto, pouco ainda se sabe a respeito da influência destas alterações sobre o prognóstico de sucesso da ICSI. Um estudo realizado por Scholtes *et al.* (1998) demonstrou que as taxas de implantação e gravidez são menores entre casais cujo homem apresenta alterações dos cromossomas sexuais (mosaicismos). Portanto, este problema representa um outro fator prejudicial aos resultados da ICSI e deve ser mais freqüentemente pesquisado.

Conclusão

Embora tenha havido um grande desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida nos últimos anos, os resultados de fertilização ainda não são totalmente satisfatórios. Danos moleculares, como por exemplo as anomalias na compactação da cromatina espermática e fragmentação do DNA, tem sido atualmente responsabilizados pelo insucesso da fertilização pós-ICSI. Por isso, torna-se importante o desenvolvimento de técnicas capazes de identificar essas alterações para avaliação da qualidade dos gametas antes da realização das TRA, reduzindo-se assim as taxas de insucesso. O conhecimento das bases moleculares e genéticas do fator masculino é importante para a compreensão das causas inerentes ao espermatozóide que há alguns anos não eram conhecidas. O dano oxidativo causado pelas ERO também deve ser evitado, seja através da diminuição na geração das ERO ou através da adição de substâncias antioxidantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal A., Ikemoto I., Loughlin KR. - Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *J. Urol.*, 152: 107-110, 1994.

Aitken RJ., Clarkson JS. - Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl.*, 9: 367-376, 1988.

Aitken RJ. - The role of free oxygen radicals and sperm function. *Int. J. Androl.*, 12: 95-97, 1989.

Aitken RJ., Clarkson JS., Fishel S. - Generation of oxygen reactive species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol. Reprod.*, 40: 183-197, 1989.

Aitken RJ., Irvine DS., Wu FC. - Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 164: 542-551, 1991.

Aitken RJ., Fisher H. - Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, 16: 259-267, 1994.

Bianchi PG., Manicardi GC., Bizzaro D., Bianchi U., Sakkas D. - Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 49: 1083-1088, 1993.

Bianchi PG., Manicardi GC., Urner F., Campana A., Sakkas D. - Chromatin packing and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, 2: 139-144, 1996(a).

Bianchi PG., Manicardi GC., Bizzaro D., Campana A., Bianchi U., Sakkas D. - Use of the guanine-cytosine (GC) specific fluorochrome, chromomycin A₃, as an indicator of poor sperm morphology. *J. Assist. Reprod. Gen.*, 13: 246-250, 1996(b).

Bourgain C., Nagy ZP., De Zutter H., Van Ranst H., Nogueira D., Van Steirteghem AC. - Ultrastructure of gametes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 13 (Suppl 1): 107-116, 1998.

D'Agata R., Vicari E., Moncada ML., Sidoti G., Calogero AE., Fornito MC., Minacapilli G., Mongioi A., Poloso P. - Generation of reactive oxygen species in subgroups of infertile men. *Int. J. Androl.*, 13: 344-351, 1990.

de Lamirande E., Gagnon C. - Reactive oxygen species and human spermatozoa I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J. Androl.*, 13: 368-378, 1992.

de Lamirande E., Eiley D., Gagnon C. - Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrossome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. *Int. J. Androl.*, 16: 258-266, 1993.

Dubey A., Penzias A., Emmi A., Layman L., Reindollar R., Ducibella T. - Failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection: the extent of paternal and maternal chromatin decondensation. *Fertil. Steril.*, 68: 714-717, 1997.

Esterhuizen AD., Franken DR., Lourens JGH., Prinsloo E., van Rooyen LH. - Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. *Hum. Reprod.*, 15: 657-661, 2000.

Hens L., Bonduelle M., Liebaers I., Devroey P., Van Steirteghem AC. - Chromosome Aberrations in 500 couples referred for in-vitro fertilization or related fertility treatment. *Hum. Reprod.*, 3: 451-457, 1988.

Iwasaki A., Gagnon C. - Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil. Steril.*, 57: 409-416, 1992.

Jones R., Mann T., Sherins R. - Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil. Steril.*, 31: 531-537, 1979.

Kovalski NN., de Lamirande E., Gagnon C. - Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertil. Steril.*, 58: 809-816, 1992.

Lopes S., Jurisicova A., Sun JG., Casper R. - Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 13: 896-900, 1998.

Manicardi GC., Bianchi PG., Pantano S. - Under protamination and nicking of DNA in ejaculated human spermatozoa are highly related phenomena. *Biol. Reprod.*, 52: 864-867, 1995.

Mazzilli F., Ronconi C., Rossi T., Dondero F., Marchesini M. - Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. *Fertil. Steril.*, 62: 862-868, 1994.

Nagy ZP., Liu J., Joris H., Verheyen G., Tournaye H., Camus M., Derde M., Devroey P., Van Steirteghem A. - The results of intracytoplasmic sperm injection are not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum. Reprod.*, 10: 1123-1129, 1995.

Nasr-Esfahani MH., Johnson MH., Aitken RJ. - The effect of iron chelators on the in vitro block to development of the mouse pre-implantation embryo: BAT6 a new medium for improved culture of mouse embryos in vitro. *Hum. Reprod.*, 5: 997-1003, 1990.

Nasr-Esfahani MH., Winston NJ., Johnson MH. - Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid, and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen

species and on the development of the mouse preimplantation embryo *in vitro*. J. Reprod. Fert., 96: 219-231, 1992.

Pabon JE., Findley WE., Gibbons, MD. - The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. Fertil. Steril., 51: 896-900, 1989.

Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A. - Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet, 340: 17-18, 1992.

Pandiyan N., Jequier AM. - Mitotic chromosomal anomalies among 1210 infertile men. Hum. Reprod., 11: 2604-2608, 1996.

Payne D., Flaherty SP., Jeffrey R., Warners GM., Matthews CD. - Successful treatment of severe male factor infertility in 100 consecutive cycles using intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 9: 2051-2057, 1994.

Sakkas D., Urner F., Bianchi PG., Bizzaro D., Wagner I., Jaquenoud N., Manicardi G., Campana A. - Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 11: 837-843, 1996.

Sukcharoen N., Keith J., Irvine DS., Aitken RJ. - Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. Fertil. Steril., 63: 1293-1300, 1995.

Testart J., Gautier E., Brami C., Rolet F., Sedbon E., Thebault A. - Intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with structural chromosome abnormalities. Hum. Reprod., 11: 2609-2612, 1996.

Van Steirteghem A., Liu A., Joris H., Nagy Z., Janssenswillen C., Smits J., Tournaye H., Derde M., Van Assche E., Devroey P. - Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. Hum. Reprod., 8: 1055-1060, 1993.

Wolff H. - The biologic significance of white blood cells in semen. Fertil. Steril., 63: 1143-1157, 1995.

Zalata A., Hafez T., Comhaire F. - Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. Hum. Reprod., 10: 1444-1451, 1995.