

THE RELATIONSHIP BETWEEN MORPHOLOGY OF HUMAN SPERMATOZOA AND HEMIZONA ASSAY

REINALDO J. RAFAELLI, DEBORAH M.G. SPAINE,
AGNALDO P. CEDENHO, MIGUEL SROUGI

Section of Human Reproduction, Division of Urology, Paulista School of Medicine,
Federal University of São Paulo, SP, Brazil

ABSTRACT

Objective: To evaluate the correlation between human sperm morphology and sperm-zona pellucida binding capacity under in vitro fertilization conditions.

Material and Methods: The semen specimens were collected from 20 male patients who attended the Human Reproduction Outpatient Clinic enrolled in the in vitro fertilization program (IVF). The semen analysis was performed according to the World Health Organization criteria, while the sperm morphology was evaluated using the criteria outlined by Kruger. The motile spermatozoa selection was prepared using a standard swim-up procedure. A Petri dish was prepared by making microdots in its central part with a disposable hypodermic needle in order to assist the oocyte fixation at the moment of the cutting. Under a stereomicroscope and using a microsurgical blade, each oocyte was manually sectioned, resulting in two identical hemizonae. A hundred microliters of sperm suspension (0.5×10^6 motile sperm per ml) from the patient under investigation were added to one hemizona; the other hemizona received the same amount of motile sperm from the control semen sample. After 4 hours of coincubation at 37°C in 5% CO₂ in air, the hemizona were rinsed in order to remove the loosely attached sperm. The number of tightly bound sperm was counted under an inverted microscope at 400x magnification. The hemizona index (HZI) was calculated dividing the number of patient's bound sperm by the number of control's bound sperm, multiplied by 100.

Results: From the 20 semen samples in this study, 7 of them, with sperm morphology $\leq 4\%$, presented HZI $< 35\%$ and 13 samples with normal sperm morphology $> 4\%$ had HZI was $> 35\%$.

Conclusions: Based on the results obtained in this research, sperm morphology assessed by strict criteria outlined by Kruger showed high correlation with the capacity of sperm to achieve tight binding to the zona pellucida (HZI).

Key words: spermatozoa; sperm; germ cells; sperm injections

Braz J Urol, 27: 255-261, 2001

INTRODUÇÃO

O fator masculino na infertilidade conjugal é expressivo e, conseqüentemente, deve receber muita atenção por parte de todos os profissionais da área de reprodução humana. Responsável isoladamente por 30% das causas de infertilidade conjugal e associado ao fator feminino em mais de 20%, o componente masculino vem sendo alvo de muitos estudos e mudança de paradigmas (1).

A análise do sêmen fornece informações bastante valiosas no processo de investigação da infertilidade conjugal, porém deve ser considerada apenas o começo, pois não informa de maneira definitiva se um determinado indivíduo é fértil ou não: o espermiograma informa apenas sobre o potencial de fertilidade. O entendimento do processo de interação dos gametas humanos só se tornou possível com o advento das técnicas de fertilização assistida. Overstreet & Hembree (2), trabalhando com

oócitos obtidos da camada cortical de ovários de cadáver, perceberam que a integridade físico-química da zona pelúcida era mantida por 48 horas pós-morte e permitia que espermatozoides humanos capacitados *in vitro* interagissem com ela. Com esta informação, tornou-se possível estudar, em condições *in vitro*, a primeira fase do processo de fertilização, ou seja, a ligação que ocorre após a reação acrossômica, entre o segmento cefálico do espermatozoide e a zona pelúcida do oócito humano. Em pouco tempo, este teste passou a ser utilizado durante a investigação do fator masculino apesar de apresentar limitação técnica importante. Os oócitos obtidos não estão num mesmo estágio de desenvolvimento, portanto, não apresentam estritamente a mesma composição química na zona pelúcida, e os resultados podem ser diversos não apenas em função do gameta masculino em estudo mas das diferenças entre as zonas pelúcidas.

Em 1988, Burkman et al. (3) desenvolveu um novo teste que superava essa falha. Com o desenvolvimento da micromanipulação foi possível cortar ao meio oócitos excedentes do programa de fertilização *in vitro* que, embora desprovidos do ooplasma, mantinham igual capacidade de interação com o gameta masculino. Este fato trazia, inquestionavelmente, algumas vantagens: permitia trabalhar com oócitos frescos excedentes que não seriam utilizados no programa *in vitro*; com a secção ao meio, inviabilizava a formação de pré-embriões e evitava todas as ações anti-éticas decorrentes desse fato e, por último e muito importante também, permitia um controle *intra-ensaio*, pois o sêmen de um doador conhecido era testado com uma metade do oócito e a outra metade era utilizada para testar o sêmen do paciente em estudo.

Esse teste permanece em uso até os dias de hoje. Entretanto, grandes questões começaram surgir a respeito dos fatores do sêmen que poderiam influenciar no resultado do teste. Dentre os vários parâmetros, ficou claro que a motilidade e a forma dos espermatozoides tinham um papel preponderante (4). No tocante à morfologia dos espermatozoides, uma grande contribuição para o nosso conhecimento foi introduzida por Kruger et al. (5,6) quando esses autores estabeleceram uma nova descrição para a forma normal dos espermatozoides: segmento cefálico

oval, regular e com acrossomo ocupando de 40 a 70% desse segmento; nenhum defeito na peça intermediária ou cauda. Esse critério correlacionou-se muito bem com taxa de fertilização quando a percentagem de formas ovais era superior a 14%. Levando-se em consideração este novo critério para análise da forma dos espermatozoides, propusemos esse trabalho com os seguintes objetivos: avaliar o efeito da forma do espermatozoide humano frente ao teste de penetração de espermatozoides em hemizona pelúcida humana e se o teste de penetração teria algum valor preditivo antes do início do tratamento nos programas de fertilização assistida.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram envolvidos neste estudo 20 pacientes do sexo masculino, com idade entre 24 e 41 anos, que foram encaminhados para o Setor de Reprodução Humana durante o período compreendido entre junho e setembro de 1998, com indicação para serem tratados de acordo com o protocolo do programa de fertilização *in vitro*.

O sêmen de um único doador, sem alterações seminais e com paternidade comprovada nos últimos dois anos foi utilizado como controle.

São aceitos para o programa de fertilização *in vitro* clássico no Laboratório de Reprodução Humana apenas pacientes que apresentam pelo menos 5×10^6 de espermatozoides móveis por mililitro após o processo laboratorial de seleção pela técnica de swim-up. Ficou assegurado assim que todos os pacientes envolvidos nesta pesquisa atendiam com plenitude esse critério.

As amostras de sêmen foram obtidas por masturbação, após um período de 3 a 5 dias de abstinência sexual. Todas as amostras foram colhidas em frascos de polipropileno estéril e descartável. Após a colheita, registrou-se a presença ou a ausência de coagulação e, os frascos contendo as amostras foram imediatamente colocados em estufa de ar, à temperatura de 37°C, por um período máximo de uma hora, para que ocorresse a liquefação do sêmen.

Após a liquefação das amostras, foram determinados os parâmetros seminais de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundi-

al de Saúde (1992) (7). Para a forma dos espermatozoides foi utilizado o critério estabelecido por Kruger et al. que considerada normal quanto a forma apenas quando mais de 14% dos espermatozoides apresentassem um segmento cefálico oval e bem regular, região acrossômica compreendendo de 40 a 70% do segmento cefálico; segmento cefálico entre 5 a 6 micrômetros (μm) de comprimento por 2.5 a 3.5 μm de largura; nenhum defeito de peça intermediária ou cauda (5,6).

Seleção de Espermatozoides pela Técnica de Swim-up

Essa técnica foi preparada removendo-se, inicialmente, o plasma seminal: 1 ml de sêmen liqüefeito foi transferido para um tubo cônico graduado estéril e diluído com 3 ml de meio Human Tubal Fluid (HTF, Irvine Scientific, EUA) suplementado com 10% de albumina humana (fator V, código 5120, Irvine Scientific, EUA). O tubo foi colocado em centrífuga por 10 minutos a 1000 rotações por minuto (rpm); em seguida removeu-se o sobrenadante e, ao sedimento resultante, foram adicionados 1.5 ml de meio de HTF. O tubo foi novamente centrifugado e, após remoção do sobrenadante, adicionou-se cuidadosamente 1 ml de meio HTF, evitando-se a dispersão do sedimento formado. O tubo, contendo os espermatozoides livres do plasma seminal, foi incubado em estufa a 5% CO_2 , 37°C, por uma hora, em ângulo de inclinação de 30° (8).

Decorrido o período de incubação aspirou-se, com auxílio de pipeta Pasteur, a porção superior do meio de cultura que continha a subpopulação de espermatozoides móveis. Foram determinados os parâmetros de motilidade e concentração de espermatozoides móveis segundo critérios da Organização Mundial da Saúde (1992) (7).

Teste de Ligação de Espermatozoides com Hemizonas Pelúcidas de Oócitos Humanos

Todos os oócitos utilizados neste estudo foram fornecidos pelo Laboratório de Reprodução Humana; esses oócitos não tinham sido inseminados e eram excedentes do programa de fertilização in vitro. Após consentimento de doação assinado pelas paci-

entes, os oócitos foram estocados em solução salina Salt Storage Solution (cloreto de magnésio 1.5 M suplementado com polivinilpirrolidona 0.1% e hepes sódico 40 mM, Sigma, EUA) por um período máximo de 30 dias (9).

No dia anterior ao teste, um oócito foi transferido da solução salina para uma gota de meio de cultura HTF, suplementado com 10% de albumina humana, em uma placa de cultura de poliestireno 35 x 10 mm previamente preparada com micropontilhados feitos com uma agulha hipodérmica descartável, a fim de promover uma melhor fixação do oócito no momento do corte.

Utilizando-se um estereomicroscópio, em aumento de 40 vezes, e com auxílio de uma microlâmina, de 3.5 mm de comprimento por 0.02 mm de largura e ângulo de 30°, o oócito foi cortado, manualmente, em duas partes simétricas. Cada hemizona foi aspirada com auxílio de uma micropipeta e, após ter sido lavada para a retirada de todo o ooplasma, foi transferida para uma gota de solução salina, recoberta com óleo mineral e armazenada a 4°C por 24 horas.

Decorrido este período, cada hemizona foi transferida, separadamente, para uma placa de cultura contendo uma gota (60 μl) de meio de cultura HTF e lavada cinco vezes, com auxílio de pipeta Pasteur, para remoção da solução salina. Na primeira placa de cultura contendo uma hemizona foram adicionados 100 μl da suspensão de espermatozoides (0.5 x 10⁶ espermatozoides móveis por ml) do paciente em estudo e, na segunda placa à outra hemizona foi adicionada a mesma quantidade de espermatozoides móveis do sêmen controle. Cada gota foi coberta com óleo mineral (Sigma, código M8410, EUA) para prevenir o movimento destas, e as placas foram incubadas à 37°C em 5% de CO_2 por 4 horas. Após esse período, transferiram-se as hemizonas, separadamente, para 60 μl de meio de cultura (HTF) suplementado com 0.3% de albumina humana, lavando-se cada hemizona cinco vezes a fim de remover os espermatozoides aderidos fracamente à hemizona pelúcida.

A contagem dos espermatozoides aderidos à hemizona foi realizada com auxílio de microscópio invertido em aumento de 400 vezes. O cálculo

do índice de aderência dos espermatozoides à hemizona (HZI) foi feito dividindo-se o número de espermatozoides aderidos do paciente pelo número de espermatozoides aderidos do controle, multiplicado por 100.

A análise estatística utilizada constou do teste t para comparação de variáveis de duas amostras, dos cálculos do coeficiente de Pearson e curva de regressão linear (com o uso do teste t de significância), assumindo a probabilidade do erro tipo I em 5%.

RESULTADOS

A Tabela apresenta os parâmetros seminais, as idades e os índices de hemizona obtidos para cada paciente do grupo de estudo. As médias de volume das amostras seminais, concentração e motilidade dos

espermatozoides estão dentro da amplitude considerada normal segundo critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (7), o que não ocorre em relação à forma (valor de normalidade: > 14% de formas ovais) (5,6).

Nesse estudo, um único doador colhia uma amostra de sêmen para cada teste realizado, num total de 20 amostras seminais utilizadas como controle do teste. A média e desvio padrão dos parâmetros seminais foram volume: 1.3 ± 0.3 ml concentração: $138.5 \pm 57 \times 10^6$ ml; motilidade: $78.6 \pm 6.4\%$ e morfologia: $15 \pm 3.7\%$ ovais. Houve diferença significativa entre a forma dos espermatozoides do controle e dos pacientes do grupo de estudo ($p = 0.00003$).

Esta tabela também permite observar que todas as amostras com forma menor ou igual a 4% (7 amostras, 35% do total) apresentaram índice de

Table - Seminal parameters of the studied patients.

	Age (years)	Volume (ml)	Concentration (million/ml)	Motility (%)	Oval Forms (%)	HZI (%)
	33	3.2	58.1	64	2	12
	40	2.8	15.5	65	3	8
	24	4.5	23.0	52	3	20
	37	4.2	16.0	49	3	7
	30	5.1	69.2	54	3	21
	30	2.1	41.0	76	4	29
	39	3.2	22.7	53	4	28
	37	1.4	40.1	52	5	36
	35	4.7	30.4	52	6	42
	30	5.2	57.0	70	7	57
	38	1.7	73.0	54	7	73
	29	2.8	21.5	34	8	80
	37	3.7	9.0	75	8	61
	39	4.5	35.0	73	8	66
	41	1.5	12.9	73	9	41
	37	4.4	30.0	52	9	68
	37	2.0	42.9	86	9	51
	32	3.5	51.3	48	10	49
	31	2.7	51.0	66	11	72
	39	8.0	120.0	65	15	93
Mean	34.8	3.6	41	60.7	6.7	45.7
SD	4.5	1.6	25.7	12.3	3.3	24.7

HZI = Hemizona Index; SD = standard deviation

hemizona menor que 35%. Note-se também que, nas amostras com forma superior a 4% (13 amostras, 65% do total), o índice de hemizona foi superior a 35%. A curva de regressão linear entre estas variáveis é mostrada na Figure, e pode ser expressa na equação:

$$\text{índice de hemizona (\%)} = 0.47 + 0.14 \times \text{formas ovais (\%)}$$

O coeficiente de correlação de Pearson entre as duas variáveis foi de 92% ($p = 2 \times 10^{-5}$).

questionada, segundo os critérios estabelecidos pelo manual da Organização Mundial da Saúde (7), no que tange a normalidade seminal.

Para a correta identificação das alterações seminais, provas funcionais devem ser realizadas para verificar, de maneira mais apropriada e confiável, a capacidade de fertilização de uma determinada amostra de espermatozoides. Tanto em reprodução natural quanto numa inseminação artificial, na transferência intra-tubária de gametas ou na fertilização in vitro

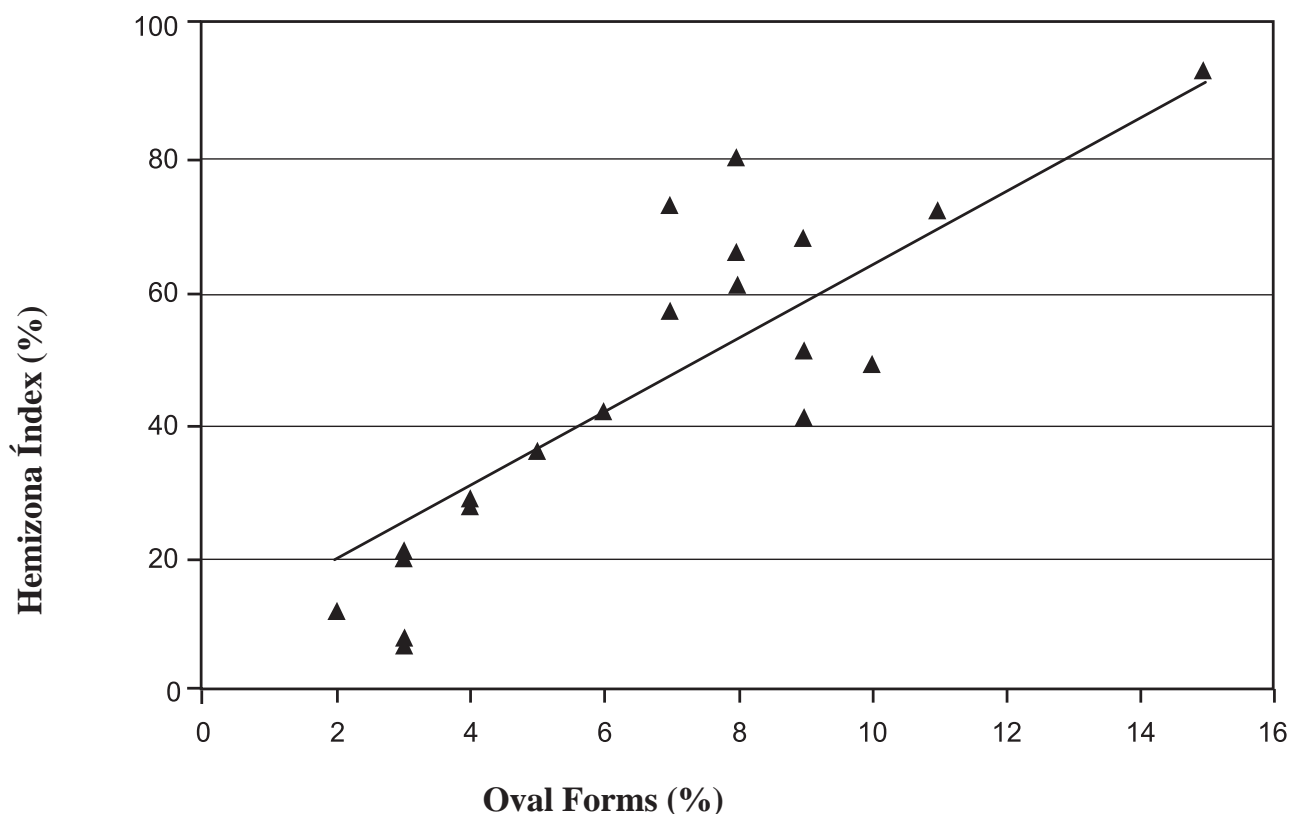


Figure - Linear regression curve between the spermatozoa morphology (% oval forms) and the hemizona index of human oocyte.

DISCUSSÃO

Quando o sêmen de um paciente é analisado por um laboratório especializado, e o laudo do espermograma apresenta um ou mais dos parâmetros clássicos alterados (concentração, motilidade, morfologia), esse paciente poderia ter sua fertilidade

clássica, a interação entre o espermatozóide e a zona pelúcida do oócito é o evento crítico para que a fertilização ocorra; deficiências no processo interativo dos gametas podem ser decorrentes tanto dos oócitos quanto dos espermatozoides e, especialmente neste último caso, de anormalidades do segmento cefálico, local onde se encontram os receptores específicos de

membrana (10). Enquanto as alterações da zona pelúcida não foram objeto desta pesquisa, todo o método aqui empregado foi para verificar a importância da forma dos espermatozoides nesse processo interativo. E isto só foi possível porque dispomos, na atualidade, de recursos laboratoriais que aferem esta ligação com eficácia, como o teste da hemizona pelúcida (3), sem ferir os princípios éticos e formar pré-embriões com finalidade de pesquisa (11).

Sabe-se que um paciente com teratozoospermia (morfologia dos espermatozoides < 14% formas ovais) tem um índice menor de penetração na zona pelúcida e, conseqüentemente, menor taxa de fertilização nos processos *in vitro*; seu potencial de fertilidade é diminuído, o que poderia dificultar a concepção (12-14). De acordo com Franken et al. (15) quando o índice do teste de hemizona (Hemizona Index – HZI) é inferior a 30%, a taxa de fertilização é muito baixa e pode contra indicar qualquer técnica em que a interação entre os gametas seja essencial (16).

Neste estudo, utilizando-se o teste do hemizona descrito por Burkman et al. (3) e modificado no nosso laboratório, foi possível verificar o efeito que a alteração na forma dos espermatozoides causou no índice de aderência, comparando o sêmen de um doador fértil, conhecido, com pacientes inférteis que tinham sido encaminhados para o programa de fertilização *in vitro* clássico. Este resultado foi considerado significativo do ponto de vista estatístico, demonstrando-se assim que quando as formas ovais, numa determinada amostra seminal, estiverem presentes em menos de 4% a aderência na zona pelúcida será muito baixa ou não ocorrerá. O que vale dizer que uma taxa baixa de fertilização deve ser esperada e bastante atenção deve ser dispensada quanto ao programa a ser indicado para um determinado casal.

Um outro aspecto importante que deve ser levantado neste capítulo é o pouco uso deste teste *in vitro* que possibilita informações tão valiosas. O hemizona é um teste laborioso e necessita de protocolo padronizado para sua execução (17). Desde a sua idealização até os dias de hoje tem sido realizado com o auxílio de um micromanipulador (18); exige manutenção pelo laboratório de um doador fértil, cadastrado e com disponibilidade semanal e, sobretudo, afinidade do pessoal do laboratório com o teste.

No entanto, trabalhando dentro de um ambiente universitário e impulsionados pelas dificuldades inerentes, experimentou-se e se constatou que era possível, mediante treinamento e aplicando os princípios básicos de microcirurgia e micromanipulação, cortar manualmente oócitos humanos ao meio sem danificá-los. Uma vez certificado que o teste realizado com corte manual sob um estereomicroscópio apresentava os mesmos resultados daqueles obtidos com o micromanipulador, publicados na literatura (18), passou-se a usá-lo na rotina como um teste discriminador do potencial de fertilização dentro do programa de Reprodução Humana da nossa Instituição.

CONCLUSÕES

Os dados desta pesquisa permitiram as seguintes conclusões: 1)- Amostras seminais com 4% ou menos de espermatozoides com formas ovais normais têm um índice de aderência menor que 35% quando submetidas ao teste do hemizona pelúcida humana; 2)- Amostras seminais com mais de 4% de espermatozoides com formas ovais normais têm um índice de aderência maior que 35% quando submetidas ao mesmo teste.

REFERÊNCIAS

1. Sigman M, Lipshultz LI, Howards SS: Evaluation of Subfertile Male. In: Lipshultz LI & Howards SS (ed.), *Infertility in the Male*, 3rd ed. St. Louis, Mosby Year Book Inc, pp. 173-193, 1997.
2. Overstreet JW, Hembree WC: Penetration of the zona pellucida of nonliving human oocytes by human spermatozoa *in vitro*. *Fertil Steril*, 27: 815-831, 1976.
3. Burkman LJ, Coddington CC, Franken DR, Kruger TF, Rosenwaks Z, Hodgen GD: The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potencial. *Fertil Steril*, 49: 688-697, 1988.
4. Franken DR, Kruger TF, Menkveld R, Oenhinger S, Coddington CC, Hodgen GD: Hemizona as-

- say and teratozoospermia: increasing sperm insemination concentrations to enhance zona pellucida binding. *Fertil Steril*, 54: 497-503, 1990.
5. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, van der Merwe JPV, van Zyl JA, Smith K: Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 46: 1118-1123, 1986.
 6. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S: Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 49: 112-117, 1988.
 7. World Health Organization - WHO - Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1992.
 8. Menkveld R, Swanson RJ, Kotze TJV, Kruger TF: Comparison of a discontinuous Percoll gradient method versus a swim-up method: effects on sperm morphology and other semen parameters. *Androl*, 22: 152-158, 1990.
 9. Kruger TF, Oehninger S, Franken DR, Hodgen GD: Hemizona assay: use of fresh versus salt-stored human oocytes to evaluate sperm binding potential to the zona pellucida. *J in vitro Fertil Emb Transf*, 8: 155-156, 1991.
 10. Franken DR: New aspects of sperm-zona pellucida binding. *Androl*, 30: 263-268, 1998.
 11. Franken DR, Oehninger S, Burkman LJ, Coddington CC, Kruger TF, Rosenwaks Z, Acosta AA, Hodgen GD: The hemizona assay (HZA): a predictor of human fertilizing potential in in vitro fertilization (IVF) treatment. *J in vitro Fertil Emb Transf*, 6: 44-50, 1989.
 12. Oehninger S, Franken D, Alexander N, Hodgen GD: Hemizona assay and its impact on the identification and treatment of human sperm dysfunctions. *Androl*, 24: 307-321, 1992.
 13. Oehninger S, Acosta AA, Toner JP, Swanson RJ, Coddington CC, Kruger TF, Franken DR, Hodgen GD: Sperm-zona pellucida binding: predicting fertilizing potential of human gametes by hemizona assay. *ARTA*, 3: 1-14, 1992.
 14. Kaskar K, Franken DR, van der Horst G, Oehninger S, Kruger TF, Hodgen GD: The relationship between morphology, motility and zona pellucida binding potential of human spermatozoa. *Androl*, 26: 1-4, 1994.
 15. Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Coddington CC, Lombard C, Smith K, Hodgen GD: The ability of the hemizona assay to predict human fertilization in different and consecutive in-vitro fertilization cycles. *Human Reprod*, 8: 1244-1249, 1993.
 16. Oehninger S, Coddington CC, Scott R, Franken DA, Burkman LJ, Acosta AA, Hodgen GD: Hemizona assay: assessment of sperm dysfunction and prediction of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*, 51: 665-670, 1989.
 17. Yao YQ, Yeung WSB, Ho PC: The factors affecting sperm binding to the zona pellucida in the hemizona binding assay. *Human Reprod*, 11: 1516-1519, 1996.
 18. Sánchez R, Finkenzeller C, Schill WB, Miska W: Comparison of two methods to obtain hemizonae pellucidae for sperm function tests. *Human Reprod*, 10: 2945-2947, 1995.

Received: July 27, 2000

Accepted after revision: April 26, 2001

Correspondence address:

Dr. Reinaldo José Rafaelli
 Rua 21 de Abril, 133
 Marília, SP, 17515-220, Brazil
 Fax: + (55) (14) 433-3408