

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO  
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ICSI (INJEÇÃO  
INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDE)  
EVALUATION OF EMBRYONIC DEVELOPMENT THROUGH TECHNICAL  
ICSI (INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION)**

Categoria: Artigo Original

Carliani Priscila da Silva<sup>1</sup>

Franciele Bona Verzeletti<sup>2</sup>

**RESUMO**

A infertilidade masculina representa 25% a 40% dos casais inférteis. Homens com alterações seminais graves, não apresentavam possibilidade de proporcionar a sua parceira uma gestação até o desenvolvimento da Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide, técnica esta que consiste na seleção de um único espermatozóide para fecundar cada oócito. O objetivo deste trabalho consiste em relacionar a taxa de fertilização, clivagem, transferência e implantação embrionária, com o número de nascidos vivos e através de compilação de dados avaliar o desenvolvimento embrionário. Trata-se de uma pesquisa retrospectiva referentes ao ano de 2010/2011, onde foram aleatoriamente separados prontuários de casais em idade reprodutiva que apresentaram dificuldades em obter uma gestação de forma natural, sendo submetidos à Fertilização *in vitro*, com a utilização da técnica de ICSI. Observou-se que os embriões de grau I, tem quantidade reduzida em relação aos demais, encontrou-se um resultado de 60% de testes positivos e 40% de testes negativos de gravidez, e constatou-se que deste total 15 nasceram vivos. Os resultados indicam queda nas taxas de fertilização após os 32 anos de idade, e sugerem a relação entre a idade dos pacientes e grau de excelência dos embriões, demonstram que pode haver relação entre idade materna e paterna avançada e fetos com anomalias. O desenvolvimento embrionário apresentou resultados pertinentes aos dados encontrados na literatura, constatando que a técnica de ICSI permite excelentes resultados, mesmo com as limitações de seus usuários.

Descritores: Infertilidade, Reprodução Humana Assistida, ICSI, Desenvolvimento Embrionário.

<sup>1</sup>Biomédica coordenadora do Banco de sangue do Hospital Angelina Caron.

<sup>2</sup>Professora da Disciplina de Controle de Qualidade das Faculdades Integradas do Brasil

**Correspondência:** Prof<sup>a</sup>. Franciele Bona Verzeletti, MSc. Faculdades Integradas do Brasil – UNIBRASIL. Rua Konrad Adenauer, 442, Bloco 2, Taramã – CEP 82821-020, Curitiba – PR. e-mail: fra.verzeletti@gmail.com

## ABSTRACT

Male infertility accounts for 25% to 40% of infertile couples. Men with severe seminal changes, had no possibility to provide your partner a gestation until the development of Intracytoplasmic Sperm Injection, a technique which consists in selecting a single sperm to fertilize each oocyte. The objective of this work is to relate the rate of fertilization, cleavage, embryo transfer and deployment, with the number of live births and through this collection of data to evaluate embryonic development. This is a retrospective study for the year 2010/2011, which were randomly selected charts of couples of reproductive age who had difficulties in obtaining a pregnancy naturally, being subjected to in vitro fertilization with the use of ICSI . It was observed that the embryos of grade I, has diminished amount relative to the other, met a score of 60% testing positive and 40% negative pregnancy tests, and found that this total 15 were born alive. The results indicate a decrease in fertilization rates after the age of 32, and suggest the relationship between patient age and degree of excellence of embryos, demonstrate that a relationship between advanced maternal and paternal age and fetal anomalies. The embryonic development showed relevant results to literature data, noting that the ICSI technique allows excellent results, even with the limitations of its users.

Descriptors: Infertility, Assisted Reproduction, ICSI, Embryo Development.

## INTRODUÇÃO

Define-se por infertilidade a ausência de gestação após um ano de relações sexuais, em casal sexualmente ativo e sem uso de métodos anticonceptivos (Larsen, 2005). E segundo a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia, atualmente 10% a 15% dos casais sofrem de patologias relacionadas à infertilidade (Febrasco, 2012).

Para alguns casais o desejo de ter um filho se torna inatingível, na medida em que as condições fisiológicas necessárias para tal não se verificam em sua integralidade. Tais situações sugerem alterações no sistema reprodutor e se refletem dando origem a estados patológicos de esterilidade ou infertilidade. Para compreender a infertilidade se faz necessário analisar possíveis distúrbios de ordem reprodutiva e no sistema reprodutor identificar a origem do problema que está tornando inviável a concepção (Figueiredo, 2005).

A infertilidade masculina representa 25% a 40% dos casais inférteis, o que justifica a avaliação obrigatória do homem em casos de infertilidade, sendo a análise seminal um elemento primordial na tentativa de identificação da causa da infertilidade (Menuri *et al.*,1998).

A presença de vacúolo no espermatozóide pode corresponder a alterações do DNA, prejudicando as taxas de fertilização. Na Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI) convencional é possível a visualização dos grandes vacúolos, sendo que tamanhos variados de vacúolos são relacionados à integridade do DNA (Alberto, 2010).

A avaliação do homem infértil inicia-se pelo histórico clínico, seguido por exames físicos e principalmente exames laboratoriais. Muitas vezes, a causa da infertilidade é considerada idiopática, em uma proporção bastante elevada, 25% (Adriano *et al.*,2012).

A infertilidade idiopática está ligada a alterações no processo de maturação espermática, e também à presença de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS). A formação destas desempenha importante papel na reação acrossômica e capacitação espermática. Defeitos na espermatogênese podem gerar níveis elevados de EROS em sêmen alterado, o que pode esclarecer o potencial diminuído que os espermatozoides anormais têm de fertilização (Anita, 2006).

O espermatozóide tem um processo dinâmico de maturação. A espermatogênese se dá nos túbulos seminíferos, no epidídimo ocorre a maturação e só então o espermatozóide adquire capacidade de fertilizar (Moore, 1996). Portanto homens com alterações graves, como epidídimo obstruído, falência testicular, criptozoospermia (baixa concentração de espermatozóide no sêmen) e espermatozoides sem poder fertilizante, não apresentavam possibilidade de proporcionar a sua parceira uma gestação até o desenvolvimento da ICSI (Irvine, 1998).

A ICSI foi descrita no ano de 1992, e consiste na seleção de um único espermatozóide para fecundar cada oócito, a técnica é hoje a mais utilizada quando se trata de graves alterações seminais, pois tem a capacidade de ultrapassar as barreiras do oócito e da membrana plasmática (Palermo *et al.*,1992).

Para obter êxito na ICSI, faz-se a imobilização do espermatozóide antes da execução da técnica, que auxilia na taxa de fertilização e gestação (Nagy *et al.*,1995).

A imobilização do espermatozóide (reação dependente do sistema complemento que é ativado durante o processo de interação das moléculas de anticorpos com os antígenos da superfície dos espermatozóides) faz com que a membrana do espermatozóide fique bastante permeável, permitindo a exposição do núcleo ao ooplasma, facilitando a união do oócito com o espermatozóide, e dando origem a formação do pró-núcleo masculino. Todo esse processo torna viável a extrusão do segundo corpúsculo polar, formando, então, o pró-núcleo feminino (Palermo et al., 1996).

Na ICSI, um único espermatozóide é isolado e inserido diretamente no ooplasma do oócito. Para esse procedimento é utilizado um microscópio diferenciado, no qual se acopla um sistema de micromanipuladores, que possuem micropipetas, possibilitando a fixação do oócito, para que se insira o espermatozóide no seu interior (Clinica Fertility, 2012).

O procedimento inicia-se com estimulação ovariana, onde são indicados agonistas de GNRH (Hormônio liberador de Gonadotrofinas) para supressão da atividade hormonal e gonadotrofina e estimulação da ovulação, com função de controlar o crescimento folicular. O monitoramento do crescimento folicular é realizado através de ultra-som transvaginal e dosagens hormonais. Posteriormente, os oócitos são coletados, sob anestesia, orientado por um ultra-som transvaginal. O material seminal é coletado no mesmo dia em que se efetua a coleta dos oócitos. Para obter a amostra, o homem pode ser submetido a pequenos procedimentos como aspiração do epidídimo ou biópsia testicular. A forma mais utilizada para obtenção da amostra é através de masturbação em sala equipada para este fim. Após estes procedimentos, a ICSI é executada. No dia seguinte realiza-se verificação para confirmação ou não da fertilização, identificada pela presença de dois pró-núcleos. A transferência do embrião para o útero é realizada três dias após a fertilização, e a confirmação da gravidez é realizada no décimo quinto dia após a transferência embrionária através do BHCG (Beta Gonadotrofina Coriônica Humana) (Alessandro, 2012).

Mesmo utilizando a técnica de ICSI, a fertilização pode não ocorrer. Essa porcentagem de insucesso pode ser significativa, variando de 30% a 60% (Iritani, 1991). Isto justifica-se pela presença de radicais livres no sêmen, anormalidades cromossômicas, anomalias protéicas na superfície dos gametas ou na cromatina (Dubey et al., 1997).

Modificações bioquímicas e moleculares nos espermatozóides podem ser mais relevantes do que a morfologia espermática, o que explica alguns dos baixos resultados pós ICSI (Sakkas et al., 1996).

Um embrião capaz de desencadear uma implantação e gestação normal é fator determinante para bons resultados da técnica ICSI. Observa-se que a elevação significativa nas taxas de gestação está relacionada a embriões com alta qualidade morfológica. Os aspectos mais relevantes a serem analisados para determinar a qualidade do embrião são três, o tamanho e forma dos blastômeros, a forma e extensão da fragmentação e quantidade de células em desenvolvimento prematuro. Os embriões recebem uma classificação em relação a sua morfologia e aos fragmentos que possam ter. Um embrião de grau I apresenta seus blastômeros íntegros sem fragmentação, grau II blastômeros íntegros com pouca fragmentação, grau III entre 25 e 50% de blastômeros fragmentados e grau IV 50 a 75% dos blastômeros fragmentados (Anita, 2006).

Certas alterações na qualidade dos gametas podem refletir na deficiência do desenvolvimento embrionário e nas taxas de implantação. Portanto técnicas, como a ICSI tornam possível a seleção de gametas através da sua melhor morfologia, agregando grandes benefícios à saúde reprodutiva, aumentando significativamente as taxas de gestação (Fertilitat, 2012).

A procura por resultados mais eficientes nos tratamentos de fertilização "*in vitro*" é contínua, portanto, essa pesquisa justifica-se pela sua contribuição ao tratamento da infertilidade, tanto fator masculino quanto conjugal, fornecendo orientação a casais inférteis, e auxiliando profissionais da saúde, na área de Reprodução Humana, na busca de aperfeiçoamento, nos serviços de fertilização "*in vitro*".

O objetivo deste trabalho é relacionar a taxa de fertilização, clivagem, transferência e implantação embrionária, com o número de nascidos vivos e através de compilação de dados avaliar o desenvolvimento embrionário fazendo uso da técnica de (ICSI).

## **METODOLOGIA**

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética das Faculdades Integradas do Brasil-Unibrasil, tendo como parecer o número 212.840 e a Reprodução Humana como sua área temática.

A pesquisa foi realizada em uma clínica de Reprodução Humana Assistida (RHA), localizada na cidade de Curitiba, Paraná.

Trata-se de uma pesquisa retrospectiva de prontuários, baseado na análise de dados técnicos, onde foram aleatoriamente separados para análise 30 prontuários de casais em idade reprodutiva que apresentaram dificuldades em obter uma gestação de forma natural, sendo submetidos à Fertilização *in vitro*, com a utilização da técnica de ICSI.

Foram analisados arquivos da clínica referentes ao ano de 2010/2011, com o objetivo de avaliar a influência da técnica de ICSI nas taxas de fertilização, clivagem, transferência, implantação, gestação e nascidos vivos, sendo que esses dados foram utilizados exclusivamente para os propósitos da pesquisa.

Este trabalho foi desenvolvido de forma coerente com a lei 196/96, que regulamenta as normas de pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com a resolução 1.957/2010 do CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA que adota normas éticas para utilização das técnicas de reprodução assistida e RDC 23 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos.

Os dados coletados foram processados e submetidos ha cálculos como média, moda, mediana e desvio-padrão, também foi realizada análise exploratória no formato de tabela. O programa de computação utilizado para o desenvolvimento da pesquisa foi o Microsoft Excel 2010 que faz parte do pacote Microsoft Office 2010.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo foram analisados 30 ciclos de ICSI, onde a média de idade das pacientes está em torno de 34 anos, a mediana se situa por volta dos 33 anos e o desvio padrão é de 3,75, indicando que a maior parte dos pacientes (quase 2/3 dos pacientes) tem entre 30 e 37 anos, esses dados tem base na análise de dados técnicos e reprodutivos dos pacientes representados nos prontuários, onde se verificou o perfil morfológico dos gametas e embriões desses casais, não havendo nenhum tipo de comparação entre as técnicas de reprodução assistida, portanto, não havendo necessidade de teste estatístico.

Observou-se a quantidade dos embriões inseminados e fertilizados para cada intervalo de idade, ficando nítido que o percentual de embriões fertilizados decresce conforme aumenta a faixa de idade das pacientes, e que entre 32 e 36

anos de idade é o ponto culminante de oócitos inseminados, e que nessa mesma faixa etária o número de oócitos fertilizados decresce muito. O desenvolvimento embrionário é um processo complexo e dependente de fatores masculinos e femininos. Estudos comprovam que uma baixa concentração espermática, motilidade ou morfologia podem originar taxas baixas de fertilização pós ICSI, pois algumas proteínas presentes no espermatozóide (izumo e anti Desintegrina Metaloproteinase) parecem exercer papel fundamental no processo de fertilização (Alberto, 2010).

Na literatura há indícios de que a fragmentação do primeiro corpúsculo polar possa ser resultado do envelhecimento oocitário quando cultivado *in vitro*, tal fato pode influenciar de forma negativa os resultados de fertilização. Da mesma forma, a utilização de protocolos diferentes de manipulação dos gametas e o intervalo de tempo entre a captação oocitária, desnudamento e realização da injeção intracitoplasmática de espermatozóide podem ser os responsáveis pelo decréscimo nas taxas de fertilização, justificando assim os resultados encontrados (Maria Cristina, 2008).

Os embriões recebem uma classificação em relação a sua morfologia e aos seus fragmentos, nesse trabalho os embriões grau I e grau IV foram percentualmente relacionados em cada faixa de idade. Ao observar o total de embriões obtidos e seus respectivos graus, fica claro que os embriões de grau I, de qualidade superior, tem quantidade reduzida em relação aos demais. A quantidade de embriões cresce até a faixa de 32 a 36 anos, a partir dessa faixa de idade o número de embriões decresce muito.

Trabalhos científicos comprovam a relação direta entre qualidade embrionária e taxas de gestação, raros são os casos de gestação efetiva utilizando embriões altamente fragmentados (grau IV), apesar de embriões de grau III ou IV serem capazes de iniciar uma gravidez, a chance de nascimento é muito baixa, esses mesmos trabalhos científicos alertam em relação à malformação de embriões de grau III e IV, o que se explica pela perda de proteínas reguladoras, desordens cromossômicas e índice aumentado de apoptose que eles possuem, sendo que o comprometimento morfológico desses embriões aumenta consideravelmente o índice de aborto dos mesmos (Nilka et al., 2005). Os dados da tabela mostraram justamente que a obtenção de embriões de qualidade superior (grau I) é rara em relação aos demais, e quando a idade das pacientes aumenta essa diferença fica

ainda maior, sendo que a partir dos 40 anos de idade os embriões grau I tornam-se raros.

O resultado geral das taxas de gestação foi de 18 testes (60%) positivos e 12 testes (40%) negativos em um total de 30 testes (100%), entre os 30 ciclos de ICSI realizados foram transferidos um total de 72 embriões, sendo que deste total 15 nasceram vivos. A tabela mostra que por volta dos 35 anos de idade encontra-se o número mais elevado de embriões transferidos e demonstra a tendência da diminuição de nascidos vivos em relação a faixa de idade das pacientes.

A literatura diz que a idade materna superior a 35 anos é fator preponderante para infertilidade, e que esse fato ocorre geralmente por perdas de fetos com trissomias e euploidias, resultados de perda na qualidade do oócito. E quanto à idade paterna avançada, ainda há muitas discussões, porém alguns estudos já mostraram haver relação entre idade paterna avançada e mutações autossômicas dominantes (Acondroplasia, Síndrome de Apert e Marfan) (Marcia et al., 2008).

Nesse trabalho foram inseminados 232 oócitos, destes, 158 fertilizaram e 138 geraram embriões, dos quais 72 foram transferidos e o excedente foi congelado para posterior uso, conforme opção do casal. A taxa de fertilização mostrou-se maior nas pacientes que tinham idade entre 32 e 35 anos de idade, e os embriões de qualidade superior (grau I) foram obtidos em maior quantidade na faixa etária entre 28 e 31 anos de idade, o número de nascidos vivos foi superior em pacientes com idade entre 28 e 35 anos de idade, conforme os dados da tabela.

A ICSI é uma técnica de grande contribuição ao tratamento da infertilidade, tanto fator masculino quanto conjugal. O cultivo laboratorial de gametas e embriões de qualidade é fundamental para bons resultados de gestação, sendo justamente essa a eficiência desta técnica, onde os embriões são selecionados através de sua melhor morfologia, tornando possível um desenvolvimento embrionário adequado e melhores resultados dos procedimentos de fertilização "*in vitro*" (Anita, 2006).

**TABELA 1-** Resultados gerais obtidos no termino da pesquisa.



Idade		Número de pacientes (fi)	Idade média (xi)	Número de Oócitos inseminados	Número de Oócitos fertilizados	% fertilizados	Embriões Grau I	Embriões Grau II	Embriões Grau III	Embriões Grau IV	Embriões Transferidos	Nascidos vivos
24	27	2	25,5	35	26	74,29	3	6	3	12	4	0
28	31	8	29,5	63	42	66,67	8	8	6	16	20	5
32	35	13	33,5	92	61	66,30	5	18	14	21	31	6
36	39	6	37,5	38	26	68,42	2	3	3	9	14	3
40	43	1	41,5	4	3	75,00	0	0	0	1	3	0
Total		30		232	158	68,10	18	35	26	59	72	15

## CONCLUSÃO

A utilização da Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides se mostrou uma opção de técnica de reprodução assistida bastante eficaz, tanto em casos de infertilidade masculina quanto feminina. O desenvolvimento embrionário obteve resultados pertinentes aos dados encontrados na literatura, com taxas de fertilização, clivagem, transferência, implantação embrionária e nascidos vivos dentro dos padrões esperados, constatando que a técnica de ICSI permite excelentes resultados, mesmo com as limitações de seus usuários.

## AGRADECIMENTOS

Em especial a minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Franciele Bona Verzeletti, pela correção, competência, dedicação e disponibilidade demonstradas durante a execução desse trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup> Marcio Bittencourt Ferro Costa, que colaborou muito para o resultado final deste projeto, pelo tempo dispensado, pelas valiosas sugestões e consultoria na área de bioestatística.

## REFERÊNCIAS

- 1- ADRIANO, F. et al. **Infertilidade masculina**. Disponível em <HTTP: [http://www.sbu.org.br/pdf/pg\\_sbu\\_infertilidade.pdf](http://www.sbu.org.br/pdf/pg_sbu_infertilidade.pdf)> Acesso em: 08 março. 2012.
- 2- ALBERTO, C. S. **Avaliação dos parâmetros seminais no desenvolvimento embrionário em mulheres submetidas à fertilização *in vitro* com estimulação ovariana**. Porto Alegre, 2010. 19 f. Tese (doutorado em medicina) – Departamento de Urologia da UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- 3- ALESSANDRO, S. **Importância do espermatozóide no desenvolvimento embrionário pré-implantacional.** Disponível em <HTTP: [http://www.clinicaconceber.com.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=278:importancia-do-espermatozoide-no-desenvolvimento-embrionario-pre-implantacional&catid=2:publicacoes-cientificas&Itemid=5](http://www.clinicaconceber.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=278:importancia-do-espermatozoide-no-desenvolvimento-embrionario-pre-implantacional&catid=2:publicacoes-cientificas&Itemid=5)> Acesso em: 10 abril. 2012.
- 4- ANITA, M. P. **Produção de Embriões Humanos Através da Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides Obtidos do Ejaculado, Epidídimo ou Testículo.** Santa Maria, 2006. 43 f. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria.
- 5- CLINICA FERTILITY. **Fertilização Por ICSI.** Disponível em <HTTP: <http://www.fertility.com.br/pdf/cap015.pdf>> Acesso em: 09 abril. 2012.
- 6- COMISSÃO NACIONAL ESPECIALIZADA De REPRODUÇÃO HUMANA Da FEBRASCO. **Infertilidade Conjugal.** Disponível em <HTTP: [www.itarget.com.br/newclients/sqgo.com.BR/2008/extra/download/manualINFERTILIDADE-CONJUGAL](http://www.itarget.com.br/newclients/sqgo.com.BR/2008/extra/download/manualINFERTILIDADE-CONJUGAL)> Acesso em: 08 março.2012.
- 7- DUBEY, A. et al. Failed Fertilization After Intracytoplasmic Sperm Injection: The Extent of Paternal and Maternal Chromatin Decongestion. **Fertility and Sterility**, 1997, v.68, p.714-717.
- 8- FERTILITAT CENTRO DE MEDICINA REPRODUTIVA. **Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides.** Disponível em <HTTP: <http://producao.studiogt.com.br/fertilitat/infertilidade-reproducao-assistida-gravidez-fertilidade01.php?m=02&si=02&sm=21>> Acesso em: 09 abril.2012.
- 9- FIGUEIREDO, HMVS. **A Procriação Medicamente Assistida e as Gerações Futuras.** Coimbra: gráfica de Coimbra, 2005.
- 10-IRITANI, A. Micromanipulation of Gametes for In Vitro Assisted Fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, 1991, v. 28, p. 199-207.
- 11-IRVINE,D.S. Epidemiology and Aetiology of Male Infertility. **HumanReproduction**,1998, v.13, n.1, p.33-44.
- 12-LARSEN, U. Research on Infertility: Which definition should we use. **Fertility and Sterility**, Boston,april.2005, v.83, n.4, p.846-852.
- 13-MARCIA, F. et al. **Crianças Nascidas Após Emprego de Técnica de Fertilização Assistida.** São Paulo. 2008. Dissertação (Mestrado Ginecologia) –

Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein, Hospital Israelita Albert Einstein.

- 14-MARIA CRISTINA, P. M. A. et al. **Morfologia do primeiro corpúsculo polar e taxas de fertilização, clivagem e qualidade embrionária.** Ribeirão Preto, 2008. Dissertação (Mestrado Ginecologia) – Setor Reprodução Humana, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- 15-MENURI, GI. et al. Studies of Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration (PESA) and Intracytoplasmic Sperm injection. **Hum reprodUpdat**,1998,v.4, p.57-71.
- 16-MOORE, H.D.M. AKHONDI, M.A. In Vitro Maturation of Mammalian Spermatozoa. **Reviews of Reproduction**, 1996, v. 1, p. 54-60.
- 17-NAGY, Z. et al. Using ejaculated, fresh, and frozen thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. **Fertility and Sterility**, 1995, v. 63, p. 808-815.
- 18-NILKA, F. D. et al.**Caracterização da inviabilidade evolutiva de embriões visando doações para pesquisas de células tronco.** São Paulo. 2005. Dissertação (Mestrado Ginecologia) – Departamento de Ginecologia e Obstetria, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.
- 19-PALERMO, G. et al. Pregnancy after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. **Lancet**, 1992, v.304, p.17-18.
- 20- PALERMO, G. et al. Aggressive Sperm Immobilization Prior to Intracytoplasmic Sperm Injection With Immature Spermatozoa Improves Fertilization and Pregnancy Rates. **Human Reproduction**, 1996, v. 11, p. 1023-1029.
- 21-SAKKAS, D. et al. Sperm Chromatin Anomalies Can Influence Decondensation After Intracytoplasmic Sperm Injection. **Human Reproduction**,1996, v.11, p. 837-843.