

BC/27482

IB/81161

FÁTIMA BÖTTCHER LUIZ

**PRÉ-SELEÇÃO SEXUAL *IN VITRO*
COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE PERCOLL E *SWIM UP*
E PROPOSTA DE NOVA TÉCNICA**

**TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE
BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
CAMPINAS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS**

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS ALBERTO MAGNA

**UNICAMP
1996**

T/UNICAMP

B658 p



**PRÉ-SELEÇÃO SEXUAL *IN VITRO*: COMPARAÇÃO
ENTRE OS MÉTODOS DE PERCOLL E *SWIM UP* E**

PROPOSTA DE NOVA TÉCNICA

Este exemplar corresponde à redação final da tese de doutorado (a) candidato a) Fátima Böttcher-Luiz

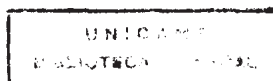
e aprovada pela Comissão Julgadora. [Assinatura]

28/3/96

Tese apresentada no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Luis Alberto Magna

UNICAMP
1996



76 000000

13/81 161

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
	B658p
V.	
TOMBO	27482
PREC	667/96
	X
PREC	R\$ 11,00
DATA	25/04/96
N.º CPD	

CM-00087107-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Böttcher-Luiz, Fátima

L968p

Pré-seleção sexual *in vitro*: comparação entre os métodos de Percoll e *swim up* e proposta de nova técnica / Fátima Böttcher Luiz. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Luis Alberto Magna.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Pré-seleção sexual.
 2. Reprodução humana.
 3. Inseminação artificial.
 4. Concepção.
 5. Fecundidade humana.
- I. Magna, Luis Alberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CAMPINAS, 28 DE MARÇO DE 1996

BANCA EXAMINADORA:

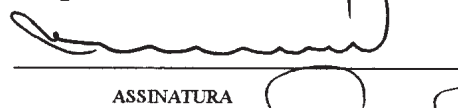
TITULARES:

PROF. DR. LUIS ALBERTO MAGNA (ORIENTADOR)



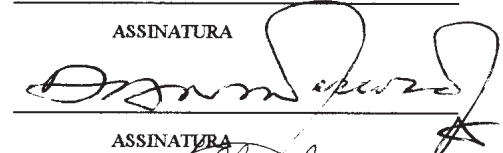
ASSINATURA

DR. LUIS BAHAMONDES



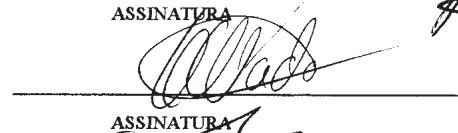
ASSINATURA

DR. DIRCEU MENDES PEREIRA



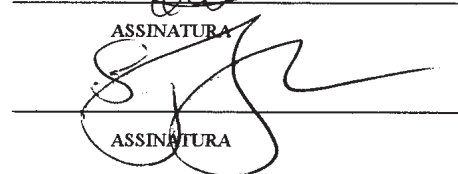
ASSINATURA

DRA. MARIA LÚCIA FURLAN WADA



ASSINATURA

DR. SIDNEY GLINA



ASSINATURA

SUPLENTE:

DR. FRANCISCO ANTONIO FAZANO

ASSINATURA

DR. PAULO AUGUSTO NEVES

ASSINATURA

APROVADA

Para Henrique Guido, com saudade...

**Aos meus defensores incondicionais,
Pedro Henrique, Maíra, Dema e Nide.**

AGRADECIMENTOS

- . Prof. Dr. Luís Alberto Magna , pela orientação, confiança e sensibilidade.
- . Elizete Segaglio Magna, pela "co-orientação".
- . Membros da pré-banca examinadora: Dr. Luís Bahamondes, Dr. Dirceu Mendes Pereira e Dra. Maria Lúcia Furlan Wada, pelas valiosas sugestões e enriquecimento deste trabalho.

Abigail Custódio Camargo

Dr. Aloísio José Bedone

Biól. Denise de Moraes

Biól. Elisabete Aparecida Campos

Fernanda Atibaia

Dr. Francisco Fazano

Isabel Gardenal

Rev. Lázaro Lopes de Almeida

Biól. Lúcia Maria Fagian de Carvalho

Dr. Luis Bahamondes

Márcia Camargo

Márcia Iório Pereira

"Marcinha" e Rogério, do CEB/UNICAMP

Marisa Damasceno

Neder Piagentini do Prado

Dr. Paulo Augusto Neves

Dr. Ricardo Barini

Sueli Chaves

William Alexandre de Oliveira

Subcomissão de Pós-Graduação em Genética

Laboratório de Reprodução Humana/CAISM/UNICAMP

Laboratório de Cultura de Tecidos e Receptores Hormonais/CAISM/UNICAMP

Departamento de Tocoginecologia/FCM/UNICAMP

Departamento de Genética Médica/FCM/UNICAMP

Laboratório do CIPOI/UNICAMP

*O presente estudo foi realizado no Laboratório
de Reprodução Humana CAISM/UNICAMP,
durante o período de janeiro de 1992
a dezembro de 1994. Agradeço a todos os
colegas a troca de experiências e o êxito obtido.*

SUMÁRIO

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1. Delineamento do Estudo e Constituição das Amostras.....	12
2.2. Coleta de Sêmen e Procedimentos Iniciais.....	13
2.3. Capacitação Espermática pelo Método de <i>Swim up</i> (<i>Método de IRLANNI et alii, 1990, modificado</i>).....	14
2.4. Capacitação Espermática pelo Método de Migração em Gradiente de Percoll (<i>Método de PARD et alii, 1988, modificado</i>).....	15
2.5. Confeção dos Esfregaços	15
2.6. Métodos de Coloração.....	16
2.7. Método de Capacitação Espermática Modificado	19
2.8. Análise Estatística.....	20
3. RESULTADOS	22
3.1. Capacitação Espermática pelos Métodos de Migração em Percoll e de <i>Swim up</i>	22
3.2. Método de Capacitação Espermática Modificado.....	26
4. DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÕES.....	46
6. ANEXOS	47
7. SUMMARY	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

RESUMO

RESUMO

O estudo proposto teve como objetivo principal investigar a atuação de dois métodos de capacitação espermática como possíveis facilitadores da seleção sexual *in vitro*. Para tanto, foram avaliados os métodos de *swim up* e de migração em gradiente de Percoll, através da comparação das razões de sexo obtidas antes e após cada procedimento. A avaliação da razão de sexo foi realizada através da visualização do Corpo F em esfregaços obtidos de suspensões espermáticas representativas de cada situação, corados pelo diidrocloreto de quinacrina e observados sob microscopia de fluorescência, empregando-se nas comparações estatísticas o teste *t de Student* para dados emparelhados. Os resultados indicaram uma seleção favorável para o sexo feminino através do método de *swim up*. A fim de acentuar as diferenças obtidas, algumas amostras foram submetidas a um segundo momento de capacitação espermática, representado por um *swim up* clássico seguido de migração em meio de cultura com concentrações aumentadas de albumina sérica humana, obtendo-se a formação de duas camadas de migração, apresentando a superior uma prevalência de formas masculinas. Os resultados obtidos sugeriram uma seleção favorável para o sexo feminino na utilização do método de *swim up*, e para o masculino com o método de migração em dois tempos. Embora medianamente satisfatórios, constituem, até o momento, alternativas viáveis de operacionalização simples e econômica a serem oferecidas a casais portadores de doenças com padrão de herança ligada ao sexo.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Desde a Antigüidade, o interesse pelo controle do sexo da prole tem se manifestado nas mais diversas culturas, gerando padrões de comportamento influenciados por fatores econômicos, socioculturais e pessoais específicos do momento histórico de cada geração.

Os primeiros registros sobre o tema remontam às citações da Bíblia e do Talmude, acerca de particularidades do coito como método de seleção sexual, embora com interpretação obscura. Paralelamente, o papel da gônada masculina na procriação humana foi definido pelos egípcios através da observação de efeitos específicos, como falta de libido e esterilidade decorrentes da castração testicular (BATZOFIN, 1987; ZARUTSKIE et alii, 1989; JAFFE et alii, 1991). A partir do século V a.C. e com o apogeu da cultura grega ocorreu o entendimento sobre a participação de ambos os sexos na fecundação humana (KOVACS & WALDRON, 1987; ZARUTSKIE et alii, 1989), acentuando-se, contudo, a idéia da superioridade do sexo masculino sobre o feminino e conferindo aos primeiros características privilegiadas.

Nesse contexto, foram incorporados os postulados de grandes pensadores como Hipócrates, que vinculava o desenvolvimento normal e completo do feto masculino à implantação no lado *mais nobre* do útero - o lado direito. Aristóteles, por sua vez, atribuía ao sêmen um papel decisivo na concepção, qualificando o homem como fonte das características herdadas e a mulher como nutriz do ovo, recomendando que esta se reclinasse sobre o seu lado direito durante o coito, a fim de possibilitar a

concepção de um menino (ZARUTSKIE et alii, 1989; WINDSOR, EVANS, WHITE, 1993).

Numa variação desses postulados, Anaxágoras afirmava que os homens eram gerados a partir do sêmen advindo do testículo direito, aconselhando a extirpação do contralateral para garantir uma descendência masculina. Embora aparentemente anedótico, este conceito foi mantido ao longo dos séculos, sendo a extirpação do testículo esquerdo uma prática adotada entre os nobres da França do século XVIII, a fim de assegurar a sucessão do trono ao primogênito da família (GLASS, 1976; BATZOFIN, 1987; ZARUTSKIE et alii, 1989; WINDSOR et alii, 1993).

Os períodos seguintes foram marcados por tentativas esparsas de substituição de alguns mitos pela argumentação científica, ainda que fortemente contaminada pela idéia da superioridade masculina, de modo que, mesmo com o avanço da Biologia e as evidências sobre os efeitos da nutrição no desenvolvimento fetal, SCHENK (1898)¹ recomendava uma dieta com alto teor protéico para promover a maturação do óvulo e a concepção de um feto masculino.

A partir do século XX, as investigações citológicas de PAINTER (1921)² resultaram na constatação de que células masculinas e femininas apresentavam cromossomos sexuais diferentes, visualizados não somente na mitose, mas também na intérfase (BARR & BERTRAN, 1949)³, observações que foram exploradas apenas décadas depois, com a introdução do tratamento hipotônico às preparações celulares. Tal recurso possibilitou o estabelecimento do número de cromossomos da espécie

¹ SCHENK apud KOVÁCS, G.T. & WALDRON, K. - Sex preselection - A review. *Australian Family Physician*, 16:608-13, 1987.

² PAINTER, T.S. apud THERMAN, E. & SUSMAN, M. - Origins and directions of Human Cytogenetics. In: THERMAN, E. & SUSMAN, M. *Human Chromossomes - Structure, Behavior and Effects*. 3rd edition. Springer-Verlag, NY, 1993. p. 1-13.

³ BARR, M.L. & BERTRAN, E.G. apud THERMAN, E. & SUSMAN, M. - Origins and directions of Human Cytogenetics. In: THERMAN, E. & SUSMAN, M. - *Human Chromossomes - Structure, Behavior and Effects*. 3rd edition, Springer-Verlag, NY, 1993. p. 1-13.

humana, a caracterização de cada um deles, bem como, juntamente com as demais técnicas de cultivo celular, a evolução da Citogenética como ciência. As evidências obtidas não foram, contudo, suficientes para despojar o antigo axioma de que a determinação do sexo, na espécie humana, estaria vinculada a fatores externos ambientais e, por isso, passíveis de controle (WINDSOR et alii, 1993).

A década de 70 foi marcada pela profusão de estudos que procuravam a associação entre a fertilidade humana e a atuação dos mais variados fatores ambientais, entre os quais a dieta (STOKOWSKY & LORRAINS, 1980), o pH da vagina (DIASIO & GLASS, 1971; DOWNING & BLACK, 1976), a sazonalidade (LYSTER, 1971) ou, ainda, uma combinação destes (SHETTLES, 1970; GLEDHILL, 1983). Foi neste período que os estudos de Biologia Reprodutiva, associados aos da Genética, promoveram o avanço das técnicas de reprodução assistida e sua imediata aplicação na clínica. Acompanhando esta tendência, os estudos sobre pré-seleção sexual abandonaram parcialmente a questão especulativa, de cunho sociocultural, para adquirir, gradativamente, uma conotação ética diante de um recurso oferecido a casais portadores de doenças genéticas com padrão de herança ligada ao sexo (WERTZ & FLETCHER, 1988; VEIT & JEWELWICZ, 1988; CARSON, 1988; KHATAMEE, LEINBERGER-SICA, MATOS, 1989; WINDSOR et alii, 1993; MUNNÉ et alii, 1994).

A partir da evidência citogenética acerca das diferentes proporções entre os cromossomos X e Y, multiplicaram-se os ensaios a respeito da biologia do gameta masculino, bem como algumas deduções empíricas sobre o seu comportamento em condições fisiológicas. Considerando o espermatozóide humano maduro como constituído quase que exclusivamente de núcleo, portanto material genético, então o espermatozóide portador do cromossomo X seria comparativamente maior e mais pesado, provavelmente mais denso, conseqüentemente mais lento e, no caminho para a

fecundação do óvulo, retardatário. Por outro lado, o espermatozóide portador do cromossomo Y seria menor, mais leve, menos denso e mais ágil (GOODALL & ROBERTS, 1976; HEWITT, 1987). Desta forma, as diferenças morfofisiológicas seriam suficientes para constituir duas populações em um ejaculado, uma predominantemente masculina e a outra feminina, conferindo comportamento distinto a cada uma delas.

Encorajado por estudos prévios e por alguns relatos de literatura que sugeriam esta tendência (SHETTLES, 1960, 1961, 1970; RHODE, PORSTMANN, DORNER, 1973), SHETTLES (1976) propôs uma série de medidas comportamentais, visando ao preparo do aparelho genital feminino para receber ou facilitar a penetração de espermatozóides de um ou outro sexo. Estas recomendações, resumidas em seis passos principais, referiam-se basicamente ao momento do ato sexual em função do período ovulatório e à posição do casal durante o coito (QUADRO 1). Segundo o autor, as taxas de sucesso obtidas oscilaram entre 84% e 82% para seleção de meninos e meninas, respectivamente (SHETTLES, 1976), valores não confirmados pela literatura nas mais diversas populações (WILLIANSO, LEAN, VENGADASALAM, 1978; FRANCE et alii, 1984; SIMCOCK, 1985).

Numa análise crítica a esse respeito, WILLIANSO e colaboradores (1978) realizaram um estudo em Cingapura - Ásia, quanto à aplicabilidade do método em larga escala, em uma casuística que reuniu 10.000 casais interessados. A inefetividade do método foi comprovada e atribuída não somente a questões básicas, como a restrição de uso às mulheres com irregularidades menstruais, mas principalmente à complexidade da sexualidade humana, de modo a questionarem se todas as recomendações seriam, de fato, rigorosamente seguidas pelos casais, questionamento também partilhado por CARSON (1988). Os procedimentos postulados por SHETTLES (1976) encontraram outra restrição importante, relativa à concepção de meninos proximamente à ovulação,

em oposição aos relatos de alguns autores, cujos dados referiam um aumento na concepção de meninas exatamente neste período (GUERRERO, 1974; HARLAP, 1979; WHO, 1984; GRAY, 1991).

QUADRO 1

RECOMENDAÇÕES SUGERIDAS POR SHETTLES (1976) PARA CASAIS QUE DESEJAVAM GERAR UMA CRIANÇA COM SEXO PRÉ-DETERMINADO

	SEXO MASCULINO	SEXO FEMININO
Coito	no momento da ovulação	2 dias antes da ovulação
Ducha Vaginal	alcalina	ácida
Posição	posterior	face a face
Penetração	profunda	superficial
Orgasmo feminino	recomendado	não recomendado
Abstinência sexual	do início do ciclo até a ovulação	2 a 3 dias antes da ovulação

Estudos como os de SHETTLES, nos quais múltiplas variáveis estão associadas a normas de comportamento, são dificilmente controlados, não somente pela variabilidade da amostra, mas também por apresentarem um amplo intervalo entre a aplicação do método e a obtenção do resultado final, no caso o nascimento. Associando-se o fato da precariedade de registros sobre os abortos ocorridos durante o período de avaliação, as conclusões em geral perdem a relação causal anteriormente pretendida. Como recurso para sanar parte destas dificuldades, os estudos passaram a priorizar a investigação da razão de sexo primária através da análise cromossômica dos gametas, em substituição à verificação da razão de sexo ao nascimento. Entretanto, como a avaliação citogenética de gametas ainda era uma técnica incipiente, com reprodutibilidade insatisfatória e extremamente laboriosa, avaliações desta natureza ganharam novo impulso somente quando ZECH (1969) e VOSA (1970), relataram a

afinidade da cromatina Y pela quinacrina, um corante fluorescente derivado das acridinas, que revelava a região distal do cromossomo Y. Esta era visualizada como um ponto fluorescente específico das células em intérfase advindas de indivíduos do sexo masculino (VOSA, 1970; BARLOW & VOSA, 1970; PEARSON, 1972), constituindo o Corpo F. Deste modo, as células negativas para esta estrutura foram denominadas F0, as positivas F1, aquelas com dois pontos fluorescentes F2, e assim por diante (PEARSON, BOBROW, VOSA, 1970).

Amparados por uma técnica de identificação relativamente simples, não invasiva e sobretudo rápida na detecção da cromatina Y, multiplicaram-se os trabalhos relativos à investigação das propriedades dos espermatozóides e sobre o possível dimorfismo sexual no ejaculado. Com a publicação dos trabalhos de SUMNER, ROBINSON, EVANS (1971) e de GLEDHILL et alii (1976), determinando uma diferença de 2,7% no conteúdo de DNA dos cromossomos X e Y humanos, obtinha-se, finalmente, a base teórica para admitir a possibilidade da seleção de gênero na espécie.

A procura de dimorfismo sexual no gameta masculino mostrou algumas informações discordantes do consenso geral sobre suas propriedades. A este respeito, salientaram-se os relatos de VAN DUIJN (1960), que observou 1.500 espécimes humanos sem encontrar, porém, diferenças significativas com relação à forma e às dimensões das cabeças dos espermatozóides, o que foi por BISHOP (1960), ROTHSCHILD (1960) e, posteriormente, por BROER et alii (1976). Mais recentemente, McCOSHEN e colaboradores retomaram o tema, através da avaliação do Corpo F em conjunto com a análise morfométrica, associada à imagem bidimensional computadorizada, verificando uma correlação positiva entre a forma elipsoidal e as células F1 contrapondo-se às células F0 de forma mais arredondada (McCOSHEN et alii, 1994), relatos que aguardam confirmação da literatura.

A investigação de outras variáveis como um reflexo das diferenças entre os cromossomos sexuais foi igualmente surpreendente. Assim, não foram demonstradas associações entre as variações do pH e a capacidade de sobrevivência e migração espermáticas, quer nos ensaios simulados de laboratório (DIASIO & GLASS, 1971; DOWNING & BLACK, 1976; BROER et alii, 1976), quer nos testes pós-coito realizados *in vivo* (KAISER et alii, 1974). Embora estes últimos tenham evidenciado uma prevalência das células F1 na cérvix e cavidade uterinas, o autor constatou que o evento não estava associado às propriedades intrínsecas do espermatozóide, como viscosidade, morfologia, motilidade ou mesmo período pós-coito, mas sim a uma interação destas com os fatores cervicais.

Quanto à expressão de antígenos e cargas de superfície, YANAGIMASHI e colaboradores (1972) verificaram que os espermatozoides apresentavam uma carga negativa. Entretanto, alguns autores obtiveram a separação das células do ejaculado em duas populações (BATTHACHARYA, SHOME, GUNTHER, 1977; KANEKO et alii, 1983b; ENGELMANN et alii, 1988) de modo que, embora com evidente migração celular para o pólo catódico, os espermatozoides F1 revelaram-se mais rápidos na corrida eletroforética, propriedade considerada por ENGELMANN e colaboradores (1988) como decorrente da maior incidência de ácido siálico na superfície destes. A separação dos espermatozoides X e Y através de eletroforese foi recentemente obtida em murinos e confirmada através de PCR (reação em cadeia da polimerase) por ISHIJIMA e colaboradores (1992).

Numa variação dos procedimentos acima, a propriedade de migração diferenciada em coluna de troca iônica foi verificada com sucesso por LANG (1973), todavia sem confirmação por DOWNING & BLACK (1976). SARKAR (1984) verificou, por outro lado, graus variados de linearidade em fluxo laminar, apresentando as células F0 movimento mais direcionado do que as F1, nestas condições.

As tentativas de seleção sexual através da expressão dos antígenos de superfície HY têm sido objeto de estudo em animais de experimentação. Fêmeas de camundongos imunizadas contra este antígeno apresentaram um decréscimo da progênie masculina (BENNETT & BOYSE, 1973), mas a reprodutibilidade do método foi insatisfatória para outras espécies animais, como em coelhos (HANCOCK, 1978) e búfalos (PINKEL et alii, 1985). Estudos de avaliação sorológica nestes animais têm demonstrado que os antígenos HY estão localizados na membrana plasmática da cabeça do espermatozóide (KOO et alii, 1973), porém, segundo HOPPE & KOO (1984), não se expressariam no lote haplóide.

Com relação à capacidade diferenciada de adesão celular a substâncias diversas, o trabalho de ERICSON, LANGEVIN, NISHINO (1973) é, sem dúvida, o mais citado na literatura. Publicado na Revista Nature em dezembro de 1973, os autores descreveram um processo de capacitação e seleção sexual com base na migração espermática através de gradientes descontínuos de albumina sérica bovina (BSA), resultando num enriquecimento da ordem de 85% para o sexo masculino. Após a publicação do trabalho original, a técnica foi patenteada nos Estados Unidos pela Gametrics Limited, funcionando até o momento em esquema de franquia para clínicas de Reprodução Humana (CARSON, 1988; EDWARDS, 1988). Ainda que tenha sido um trabalho pioneiro a propor a seleção gamética *in vitro* segundo protocolos específicos, e por isso leitura obrigatória em abordagens correlatas, o êxito divulgado não ofereceu reprodutibilidade nos mais diversos laboratórios do mundo, sendo alvo de críticas severas, comentadas nos periódicos de circulação internacional (ROSS, ROBINSON, EVANS, 1975; BRANDRIFF et alii, 1986b; JAFFE et alii, 1991; FLAHERTY & MATTHEWS, 1994; KALAÇA & AKIN, 1995), em comparação com alguns poucos relatos favoráveis (DMOWSKI et alii, 1979; FULGHAM & ALEXANDER, 1990).

Em um desses comentários, BRANDRIFF e colaboradores (1986b) divulgaram o insucesso obtido com a técnica, ressaltando que uma das amostras havia sido processada em um dos centros da Gametrics Limited. Os argumentos do autor e de seu grupo referiram-se à qualidade da albumina sérica empregada, além da interferência do citrato de clomifene, utilizado como indutor de ovulação na maioria dos protocolos de estimulação ovariana, o que seria contra-indicado na seleção para o sexo masculino (BEERNINK & ERICSON, 1981; ERICSON, 1994). Curiosamente, a variável contestada refere-se ao método de avaliação das amostras e não ao método de seleção gamética empregado, de modo que as questões relativas à interferência das propriedades *peso, densidade e motilidade* adquirem um papel secundário nos comentários dos autores.

Em uma análise crítica a respeito do painel atual das técnicas de separação gamética, WINDSOR et alii (1993), corroborando os estudos de GLEDHILL (1983) e AMANN (1989), afirmaram que nenhuma delas apresenta reprodutibilidade sustentável, excetuando-se a separação por citometria de fluxo (FCM), que, diferindo dos métodos convencionais, estabelece a segregação espermática a partir do conteúdo de DNA de cada célula isoladamente.

A separação gamética através da FCM foi divulgada por JOHNSON, FLOOK, HAWK (1989), e os resultados satisfatórios foram confirmados em várias espécies animais, como ovelhas, suínos e alguns roedores (MORRELL et alii, 1988; JOHNSON, 1991; JOHNSON, 1992; CRAN et alii, 1993). As principais restrições quanto à sua aplicação em Reprodução Humana referem-se à qualidade insatisfatória do sêmen processado, bem como ao alto custo do método, uma vez que requer aparelhagem sofisticada e de difícil acesso a grande maioria dos centros de Reprodução Humana até mesmo dos países mais desenvolvidos, fatos que não têm limitado os grandes entusiastas da técnica, a ponto de JOHNSON et alii (1993) acenarem com

resultados mais satisfatórios quanto ao seu emprego na espécie humana. Seguindo o método do autor, LEVINSON et alii (1995) obtiveram o primeiro caso de gestação humana em curso, com análise de vilosidade coriônica confirmando o sexo feminino e a normalidade cromossômica do feto. Paralelamente, inicia-se o debate sobre a segurança do método, uma vez que o procedimento utiliza dois agentes potencialmente mutagênicos, o corante vital Hoechst 33342 ativado pela luz ultra-violeta (ASHWOOD-SMITH, 1995; MUNNÉ, 1995).

Finalmente, os recentes avanços da Genética Molecular possibilitaram o rastreamento dos cromossomos sexuais humanos através de sondas específicas, possibilitando a avaliação mais precisa destes nas diversas situações de diagnóstico e de pesquisa. Mais recentemente, a hibridização *in situ* tem sido empregada na pesquisa de cromossomos sexuais em biópsia embrionária (HANDYSIDE et alii, 1989; GUTTENBACH & SCHMID, 1990; VAN KOOIJ & VAN OOST, 1992; MUNNÉ et alii, 1994; WANG et alii, 1994), apresentando o inconveniente de ser um método de avaliação posterior à fecundação.

Por outro lado, a mais recente publicação de McKUSICK (1992), sobre herança mendeliana, registrou 3.307 fenótipos com padrão bem-definido, sendo 368 ligados ao cromossomo X. A relevância dos estudos em questão é justificada não apenas pela gravidade das doenças, mas também pela sua incidência, estimada por CARTER (1977) entre 5 por 10.000 nascimentos e responsável por aproximadamente 25% e 10% dos casos de retardo mental no sexo masculino e feminino, respectivamente (EMERY, 1983). Também é justificada pela menor dificuldade de detecção do padrão de herança e, conseqüentemente, atuação mais incisiva no aconselhamento genético. Como em nível de diagnóstico pré-natal os recursos estão limitados a uma pequena parcela destas doenças, a seleção do gênero efetua-se, via de regra, após o período de implantação, através do aborto seletivo. Considerando as seqüelas psicológicas

apresentadas pelos casais que fizeram esta opção, mesmo nas situações bem conduzidas (BLUMBERG, GOLBUS, HANSON, 1975; BREWER, 1978), assim como as dificuldades relativas à aceitação da doação de gametas (EVANS, DRUGAN, BOTTOMS, 1991) e da adoção de uma criança, pode-se inferir o que representaria oferecer ao casal a possibilidade de gerar um filho do sexo *permitido*, de modo a evitar o acometimento por doença grave.

A preocupação com essas situações tem se revelado nos atuais Comitês de ética em Reprodução Humana, como o da FIGO, recomendando o desenvolvimento das pesquisas neste domínio (ANEXO 1) e obtendo o endosso do Conselho Federal de Medicina em novembro de 1992 (ANEXO 2). Por outro lado, os avanços obtidos a partir dos recursos de Reprodução Assistida fomentaram a discussão acerca de temas polêmicos, como o aborto seletivo, o congelamento de embriões e gametas, a seleção do gênero, assim como a sanidade dos embriões obtidos através da fertilização *in vitro* (MRC, 1990; GEIER, 1991; VAN STEIRTEGHEM et alii, 1992).

Considerando a atualidade desses aspectos e a sua vinculação com os processos de capacitação espermática, pareceu-nos oportuno investigar se tais procedimentos atuariam como facilitadores da seleção sexual gamética, e se a viabilidade dos espermatozóides seria alterada após os mesmos. Para tanto, foram avaliados dois métodos empregados rotineiramente, Percoll e *swim up*, comparando-se as razões de sexo obtidas antes e após os tratamentos. As variáveis analisadas foram a razão de sexo gamética e a integridade da cromatina, verificadas através da presença do corpo F nos espermatozóides, e da resposta destes ao teste do alaranjado de acridina.

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Delineamento do Estudo e Constituição das Amostras

O ensaio experimental desenvolvido neste trabalho foi dividido em duas fases sucessivas, sendo a primeira programada para avaliar a razão de sexo e a integridade cromatínica em dois métodos convencionais de capacitação espermática, Percoll e *swim up*, utilizando amostras representativas das situações antes e após cada procedimento. Para a segunda fase, foram avaliadas as mesmas variáveis em amostras submetidas a processo de capacitação espermática modificado, que consistia na migração convencional em *swim up*, seguida de migração em meio de cultura com concentração aumentada de albumina sérica humana, num segundo momento.

Para compor a amostra da primeira fase, foram selecionados nove indivíduos com fertilidade comprovada e inscritos no Programa de Vasectomia desenvolvido pelo Hospital de Clínicas da UNICAMP (declaração assinada pelos mesmos no ANEXO 3), que se dispuseram a doar uma amostra de sêmen para fins de análise laboratorial e que apresentaram perfil seminal compatível com os valores de normalidade estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde no manual WHO (1987). Estes correspondem a um volume de ejaculado superior a 2ml, com liquêfação completa após 60 minutos de repouso a 37°C, motilidade e vitalidade espermática superiores a 50% e concentração celular acima de 20 milhões de espermatozóides por ml de ejaculado (ANEXO 4).

Como critérios de inclusão adicionais, utilizou-se a avaliação da morfologia espermática pela técnica de Papanicolaou e valores de normalidade superiores a 14%, conforme recomendado por KRUGER et alii (1986), além de um período de abstinência sexual entre dois e quatro dias. O perfil seminal desta amostra está relacionado na TABELA 18 do ANEXO 6.

O tamanho amostral do ensaio da segunda fase foi calculado através do teste t de Student para dados emparelhados (1924)⁴, considerando a manutenção das diferenças obtidas na etapa anterior. Constituíram a amostra cinco indivíduos com perfis seminais inseridos nos mesmos critérios de normalidade descritos na fase anterior e relacionados na TABELA 18 do ANEXO 6.

2.2. Coleta de Sêmen e Procedimentos Iniciais

O sêmen era coletado através de masturbação em frasco estéril e mantido em repouso a 37°C, durante 45 a 60 minutos, aguardando a liquificação completa do material. A seguir, pequenas alíquotas eram submetidas às análises de rotina para averiguação do volume, motilidade, vitalidade, concentração celular, pesquisa de leucócitos e morfologia, segundo os critérios do manual WHO (1987), relacionados no ANEXO 4.

Realizadas as análises convencionais, o sêmen restante era transferido para um tubo de ensaio, ao qual se acrescentava igual volume de meio de cultura HAM F10 (Sigma). A solução era cuidadosamente homogeneizada e submetida à centrifugação de 300g, à temperatura ambiente, durante dez minutos. Após descarte do sobrenadante,

⁴ FISHER, R.A. apud BEIGUELMAN, B. - A análise dos caracteres quantitativos. In: BEIGUELMAN, B. - Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações, ed. EDART-SP, 1977, p. 329-50.

acrécimo de 2ml de HAM F10 ao sedimento e homogeneização, separavam-se, com uma pipeta volumétrica, duas alíquotas de 1ml, que eram preparadas em paralelo para os processos de capacitação espermática, uma delas pelo método de *swim up* e outra pela migração em gradiente de Percoll.

A equivalência das frações quanto à concentração celular foi verificada em avaliações prévias através da contagem do número de espermatozóides de cada fração em câmara de Neubauer (TABELA 16 do ANEXO 5) e de análise estatística dos dados através do teste de dados emparelhados (TABELA 17 do ANEXO 5), obtendo-se valores de p que comprovaram a similaridade das amostras quanto a esta variável ($0,80 > p > 0,70$). O pequeno volume deixado no frasco original foi reservado para avaliação posterior e denominado a partir de então *amostra antes da capacitação*, ou *antes cap*.

2.3. Capacitação Espermática pelo Método de *Swim up* (Método de IRIANNI et alii, 1990, modificado)

Com a primeira alíquota separada, procedia-se à nova centrifugação de 300g à temperatura ambiente, durante dez minutos, seguida de retirada do sobrenadante e acréscimo, sobre o sedimento, de 1ml de meio HAM F10 contendo albumina sérica humana (Laboratório Behring), nas proporções de oito volumes de meio para três volumes de albumina. O frasco era deixado em repouso em estufa incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, durante 45 minutos. Os espermatozóides que migravam para o meio de cultura, formando a *nuvem de migração espermática*, eram recolhidos e reservados para avaliações posteriores, representando a *amostra depois do swim up*, ou simplesmente *swim up*.

2.4. Capacitação Espermática pelo Método de Migração em Gradiente de Percoll (*Método de PARD et alii, 1988, modificado*)

Paralelamente ao procedimento anterior, a segunda alíquota era depositada sobre uma coluna recém-preparada em tubo de ensaio de 8ml, formada por gradientes crescentes e sucessivos de 1ml de Percoll diluído em meio HAM F10 a 35%, 65% e 90%. Após centrifugação a 300g durante 15 minutos, desprezavam-se as camadas superiores e recolhiam-se apenas a de Percoll a 90% junto ao sedimento formado, constituindo a amostra *depois da capacitação em Percoll*, ou simplesmente *Percoll*.

2.5. Confeção dos Esfregaços

Finalizados os processos de capacitação espermática, as amostras correspondentes a cada situação eram processadas em conjunto, através de dupla lavagem das suspensões celulares em solução salina a 0,9%, de modo a obter sedimentos concentrados para a confeção dos esfregaços. Estes eram feitos a partir de gotas de 5 μ l sobre lâminas rigorosamente limpas, deixados para secar à temperatura ambiente e fixados em solução de Carnoy (metanol-ácido-acético 3:1) durante duas horas. Após a secagem, o material era armazenado em caixas fechadas e abrigadas contra entrada de luz, não excedendo o período máximo de 15 dias para o tratamento com as colorações específicas.

Como estruturação geral, cada amostra era representada por seis esfregaços, sendo dois utilizados na observação do Corpo F, dois no teste do alaranjado de acridina e dois arquivados como garantia contra eventuais danos durante a manipulação dos mesmos.

2.6. Métodos de Coloração

2.6.1. Técnica de Visualização do Corpo F

A visualização do Corpo F seguiu o método de ZECH e colaboradores (1976), modificado. Iniciava-se pela hidratação das lâminas em banhos sucessivos de álcoois nas concentrações de 100%, 95%, 75%, 50% e 30%, durante cinco minutos cada, sendo, a seguir, imersas em solução-tampão McIlvaine pH 5,5, durante dez minutos. A coloração pelo diidrocloreto de quinacrina (Sigma) a 0,5% (diluída em solução aquosa de etanol a 10%) exigia um período mínimo de 30 minutos de exposição ao corante, à temperatura ambiente, seguida de dois banhos sucessivos em tampão McIlvaine. As lâminas eram recobertas com lamínulas e mantidas em câmara úmida até o momento da leitura, realizada impreterivelmente até duas horas após a coloração. Caso esta não se evidenciasse neste período, a preparação retornava para o banho de corante até que apresentasse padrão satisfatório de fluorescência, quando observado aumento ao microscópio de fluorescência através de objetiva com aumento de 10 vezes, ou seja, pano de fundo negro com pontos moderadamente fluorescentes e homoganeamente distribuídos ao longo da lâmina. Nos casos de coloração excessiva, situação rara neste estudo, o material recebia banhos adicionais em tampão McIlvaine, até que estivesse em condições de ser avaliado.

Obtendo-se o padrão ideal de coloração, procedia-se imediatamente à leitura dos esfregaços em objetiva de imersão, em microscópio de fluorescência Zeiss, equipado com os filtros específicos BP 436, FT 460 e LP 470. O Corpo F era identificado segundo os critérios de BIBBINS e colaboradores (1988) como um ponto de fluorescência intensa dentro do núcleo, com margens bastante nítidas, forma esférica e situado, via de regra, na região mediana do espermatozóide. Em preparações altamente satisfatórias, mostrava-se inequívoco, parecendo configurar uma pequena depressão esférica no interior do espermatozóide e distinto de outros pontos

fluorescentes em razão da heterogeneidade na forma, tamanho e intensidade de fluorescência destes, além da disposição em plano diferente da célula em questão.

A contagem das células com e sem Corpo F iniciava-se no terço médio da lâmina, prosseguindo até totalizar 100 espermatozoides, identificando-os como F1, F2 e F0. Para cada amostra foram realizadas duas leituras, e os resultados foram registrados em tabelas na forma percentual de células F1 e F2.

As leituras foram feitas por um único observador e desconhecidas as amostras de origem, uma vez que as preparações eram colocadas ao acaso na prancha de suporte e avaliadas em sala totalmente escura. As preparações das amostras anteriores à capacitação com valores inferiores a 30% foram posteriormente retiradas do estudo, em razão da possibilidade de estarem vinculadas à falha técnica de difícil controle, como qualidade do vidro das lâminas e alteração estrutural do cromossomo Y. Conseqüentemente, as amostras de Percoll e *swim up* correspondentes foram igualmente descartadas.

2.6.2. Teste do Alaranjado de Acridina

A técnica empregada seguiu o método de TEJADA e colaboradores (1984). Os esfregaços eram imersos em solução de tampão citrato a 0,02M durante cinco minutos e corados em solução aquosa do alaranjado de acridina (AA) a 2,5% durante dez minutos, à temperatura ambiente. A seguir, eram lavados em nova solução de tampão citrato, recobertos com lamínulas e imediatamente observados em objetiva de imersão, à luz de microscópio de fluorescência Zeiss, com filtros específicos BP 450-490, FT 510 e LP 520. A identificação da positividade para o alaranjado de acridina baseava-se na coloração vermelha exibida pelas células com DNA desnaturado,

enquanto as íntegras apresentavam-se brilhantes, com coloração verde, amarelada ou uma combinação de ambas.

A leitura iniciava-se no terço médio da lâmina, prosseguindo até completar 200 células, não excedendo o período máximo de 40 segundos de observação em cada campo. Os dados foram registrados em tabelas na forma de percentuais de células AA positivas, ou seja, com DNA desnaturado.

A FIGURA 1 apresenta um esquema dos procedimentos mencionados até o momento.

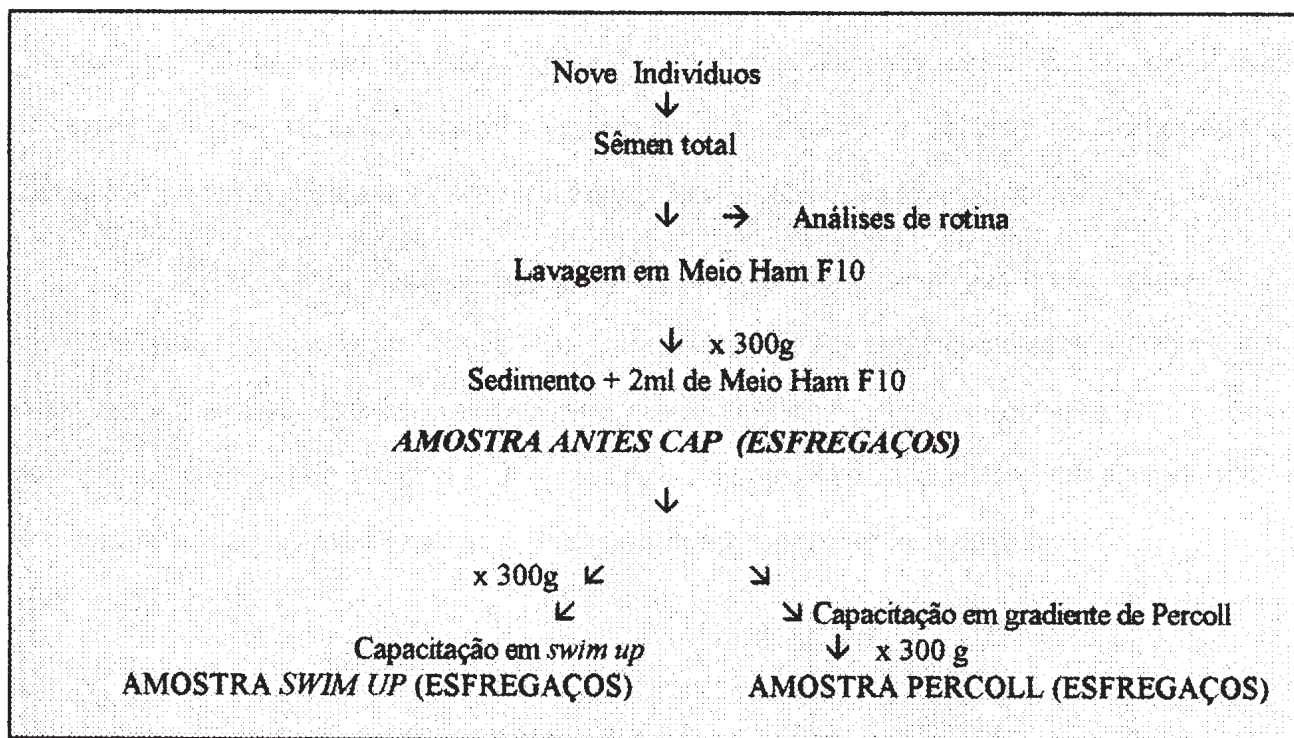


FIGURA 1 - PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA A CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA PELOS MÉTODOS DE PERCOLLE E DE *SWIM UP*

2. 7. Método de Capacitação Espermática Modificado

Conforme já mencionado, houve nesta etapa a incorporação de um segundo momento, logo após a exposição do material a um *swim up* clássico, ou seja, lavagem dupla em meio HAM F10, obtenção do sedimento e acréscimo de meio contendo albumina sérica humana (ASH) sobre o mesmo. Após repouso por 45 minutos em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, a nuvem de migração espermática era recolhida e depositada sobre meio de cultura contendo ASH em proporções mais elevadas, entre 40% e 45%. Deste modo, o sêmen capacitado era depositado sobre 2ml de meio mais denso e viscoso e deixado em repouso a 37°C durante 60 minutos.

Com a migração dos espermatozóides para o meio mais denso, as duas bandas formadas eram recolhidas em frascos separados e submetidas à centrifugação, seguida de obtenção do sedimento para avaliações da concentração celular, motilidade e confecção dos esfregaços para investigação do Corpo F e do teste do alaranjado de acridina. Os procedimentos realizados nesta fase estão esquematizados na FIGURA 2.

A verificação da exequibilidade da técnica, para posterior aplicação às diversas situações de Reprodução Assistida, foi realizada em experimentos posteriores, através da avaliação das concentrações e motilidade celulares em uma amostra de nove indivíduos com perfis seminais inseridos nos mesmos critérios anteriores e cujo sêmen foi submetido ao mesmo processo de capacitação espermática modificado.

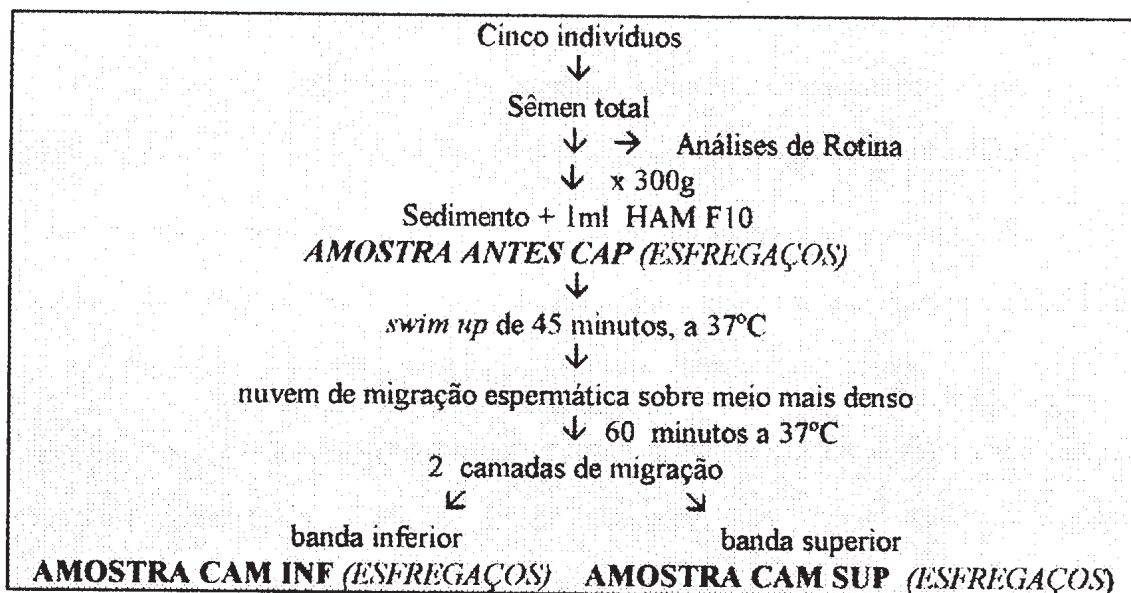


FIGURA 2. PROCEDIMENTOS EMPREGADOS DURANTE O PROCESSO DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA MODIFICADO

2.8. Análise Estatística

As comparações estatísticas entre as amostras foram feitas através do teste t de Student para dados emparelhados⁵, admitindo-se um nível de significância menor ou igual a 5%.

As variáveis submetidas à análise estatística foram os percentuais de positividade para o Corpo F (verificados através das células F1 e F2) e para o alaranjado de acridina (verificados através das células AA positivas, ou com DNA desnaturado). Foram comparados os valores anteriores ao tratamento com aqueles obtidos após as capacitações pelos métodos de migração em Percoll e em *swim up*.

⁵ FISHER, R.A. apud BEIGUELMAN, B. - A análise dos caracteres quantitativos. In: BEIGUELMAN, B., ed. - Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. EDART-SP, 1977, p. 329-50.

Os valores submetidos à análise estatística consistiram na média dos percentuais registrados entre duas lâminas representativas de cada situação.

O mesmo método estatístico foi empregado para o processo de capacitação espermática modificado, sendo comparadas as amostras prévias e posteriores ao tratamento, considerando cada camada como uma variável do mesmo.

Os valores de concentrações celulares obtidos na segunda fase não foram, evidentemente, submetidos à análise estatística, uma vez que se destinavam apenas à investigação da aplicabilidade do método em situações clínicas, considerando variáveis importantes como o número mínimo de espermatozoides viáveis e com movimentação direcionada, necessários à fecundação do ovócito.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Capacitação Espermática pelos Métodos de Migração em Percoll e de *Swim up*

Os percentuais médios de células F1 obtidos nas diferentes amostras foram registrados na TABELA 1, cujos valores oscilaram entre 36% e 50% nas amostras prévias à capacitação espermática (*antes cap*). Após os tratamentos, os percentuais oscilaram numa amplitude entre 23% e 50% para o método de Percoll e entre 12% e 39% para o *swim up* (TABELA 1).

TABELA 1

PERCENTUAIS MÉDIOS(*) DE CÉLULAS F1
APRESENTADOS PELAS DIFERENTES AMOSTRAS

AMOSTRA	ANTES CAP	PERCOLL	SWIM UP
13	36	29	34
15	39	40	12
16	50	42	34
17	40	49	25
18	50	42	31
19	42	40	33
20	53	50	39
21	60	50	31
22	43	23	35

(*) - Média entre duas lâminas

A comparação estatística aplicada às situações *antes e após Percoll* não indicou diferenças entre as mesmas ($0,20 > p > 0,10$), contrapondo-se ao método de *swim up*, que produziu uma diminuição significativa de células F1 ($p < 0,001$); conseqüentemente, as proporções de células F1 diferiram nos dois tratamentos ($p < 0,05$) (TABELA 2). Entretanto, a análise de variância aplicada às diferenças demonstrou que os valores das médias e de seus respectivos desvios não eram suficientemente distintos para caracterizar populações separadas, com relação ao Corpo F ($p = 0,12$) (TABELA 3).

TABELA 2

COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS MÉTODOS DE PERCOLL
E *SWIM UP* SEGUNDO O TESTE t PARA DADOS
EMPARELHADOS - para células F1

	<i>ANTES - PERCOLL</i>	<i>ANTES - SWIM UP</i>	<i>PERCOLL - SWIM UP</i>
X	4,67	17,11	12,11
S	8,0	9,25	13,29
t	1,75 ($0,20 > p > 0,10$)	5,55 ($p < 0,001$)	2,73 ($p < 0,05$)

X= média das diferenças S= desvio das diferenças

TABELA 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS DIFERENÇAS INTRAPARES APLICADA NA
COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PERCOLL E *SWIM UP* - para células F1

<i>Fonte de Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	$s^2(x)$	<i>F</i>	<i>p</i>
ENTRE OS TRATAMENTOS	450,66	2	225,33	2,24	0,12
RESÍDUO	2408,00	24	100,33		
TOTAL	2858,66	26			

SQ = Soma dos Quadrados das diferenças
 s^2 = Variância das diferenças

GL = Graus de liberdade
F = Coeficiente de variação

Os percentuais médios de células F2 oscilaram numa amplitude entre 0% e 9%, quer nas amostras prévias aos procedimentos, quer após a capacitação por quaisquer dos métodos empregados (TABELA 4). A comparação estatística entre os pares de dados, diante dos diferentes tratamentos, acusou valores de p entre 0,40 e 0,30 para o método de migração em Percoll e entre 0,20 e 0,10 para o método de *swim up* (TABELA 5).

TABELA 4

PERCENTUAIS MÉDIOS DE CÉLULAS F2 APRESENTADOS PELAS DIFERENTES AMOSTRAS

AMOSTRA	ANTES CAP	PERCOLL	SWIM UP
13	1	2	1
15	3	3	1
16	6	9	6
17	2	0	1
18	0	0	0
19	1	1	0
20	9	9	9
21	2	1	0
22	1	0	0

TABELA 5

COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS MÉTODOS DE PERCOLL E *SWIMUP* SEGUNDO O TESTE t PARA DADOS EMPARELHADOS - para células F2

	ANTES - PERCOLL	ANTES - SWIM UP
X	1,0	0,66
S	0,92	0,37
t	1,08 (0,40 > p > 0,30)	1,80 (0,20 > P > 0,10)

X = Média das Diferenças S = Desvios das diferenças t = coeficiente de variação

Quanto ao teste do alaranjado de acridina (AA), obteve-se um percentual médio de positividade, ou de espermatozoides com DNA desnaturado, numa amplitude entre 1% e 18%, quando prévios ao tratamento, valores que oscilaram entre 6% e 18% nas amostras Percoll, com um aparente declínio nas amostras correspondentes ao *swim up*, entre 1% e 13% (TABELA 6). A comparação dos pares de dados, após os processos de capacitação, não detectou significância estatística em quaisquer situações (TABELA 7).

TABELA 6

PERCENTUAIS MÉDIOS DE CÉLULAS AA POSITIVAS APRESENTADOS PELAS DIFERENTES AMOSTRAS, NO TESTE DO ALARANJADO DE ACRIDINA

AMOSTRA	ANTES CAP	PERCOLL	SWIM UP
13	16	16	5
15	9	9	3
16	16	11	9
17	18	11	1
18	10	17	9
19	6	6	12
20	10	11	3
21	1	18	13
22	12	18	7

TABELA 7

COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA SEGUNDO O TESTE t PARA DADOS EMPARELHADOS APLICADA AOS PROCEDIMENTOS DE PERCOLL E SWIM UP, PARA O TESTE DO ALARANJADO DE ACRIDINA

	ANTES-PERCOLL	ANTES-SWIM UP	PERCOLL-SWIM UP
X	-2,11	4,00	6,11
S	2,38	2,90	1,80
t	0,89 (0,40 > p > 0,30)	1,78 (0,40 > p > 0,30)	3,39 (0,02 > p > 0,01)

3.2. Método de Capacitação Espermática Modificado

A utilização de meio de cultura com proporções aumentadas de albumina sérica humana resultou na migração diferenciada dos espermatozóides capacitados e formação de duas camadas, denominadas bandas superior e inferior, respectivamente, e intercaladas por um largo menisco de meio de cultura (FIGURA 1 e esquema).

Os percentuais médios de células F1 apresentados pelas amostras prévias aos tratamentos mantiveram-se nos mesmos intervalos do ensaio anterior, com valores entre 37% e 53%. Após a capacitação pelo método modificado, os valores oscilaram entre 58% e 81% na banda superior, e 35% e 55% na banda inferior (TABELA 8).

TABELA 8

PERCENTUAIS MÉDIOS DE CÉLULAS F1 OBTIDOS APÓS PROCESSO DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA MODIFICADO

AMOSTRA	ANTES CAP	BANDA SUP	BANDA INF
23	38	67	39
24	37	81	35
25	44	58	40
26	48	66	42
27	53	65	55

A aplicação do teste estatístico às amostras mostrou uma distribuição não casual de células F1, com uma concentração destas na banda superior ($p < 0,02$), contrapondo-se a um percentual aproximadamente complementar, todavia não-significativo na inferior ($0,20 > p > 0,10$), conforme os dados da TABELA 9.

TABELA 9

COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE PERCENTUAIS DE CÉLULAS F1
OBTIDOS NAS BANDAS SUPERIOR E INFERIOR, APÓS PROCESSO DE
CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA MODIFICADO

	ANTES - SUP	ANTES - INF	SUP - INF
X	-23,6	1,8	25,4
S	13,27	2,99	13,61
t	-3,97 (p < 0,002)	1,35 (0,20 > p > 0,10)	4,17 (p < 0,02)

ANTES = ANTES DE CAPACITAÇÃO

SUP / INF = BANDAS SUPERIOR E INFERIOR, RESPECTIVAMENTE

A análise da variância aplicada às diferenças revelou que as médias e os desvios das camadas superior e inferior estavam suficientemente distintos para configurar duas populações ($p < 0,0001$), quanto ao comportamento de migração em meio de cultura com densidade e viscosidade aumentadas (TABELA 10).

TABELA 10

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS DIFERENÇAS INTRAPARES, APLICADA ÀS
BANDAS SUPERIOR E INFERIOR - PARA CÉLULAS F1

Fonte de Variação	SQ	GL	$s^2(x)$	F	p
ENTRE TRATAM	5907,60	2	2953,80	24,06	0,0001
RESÍDUO	1472,80	12	122,73		
TOTAL	380,40	14			

SUP INF = BANDAS SUPERIOR E INFERIOR, RESPECTIVAMENTE
SQ = SOMA DOS QUADRADOS DAS DIFERENÇAS

GL = GRAUS DE LIBERDADE
 s^2 = variância das diferenças

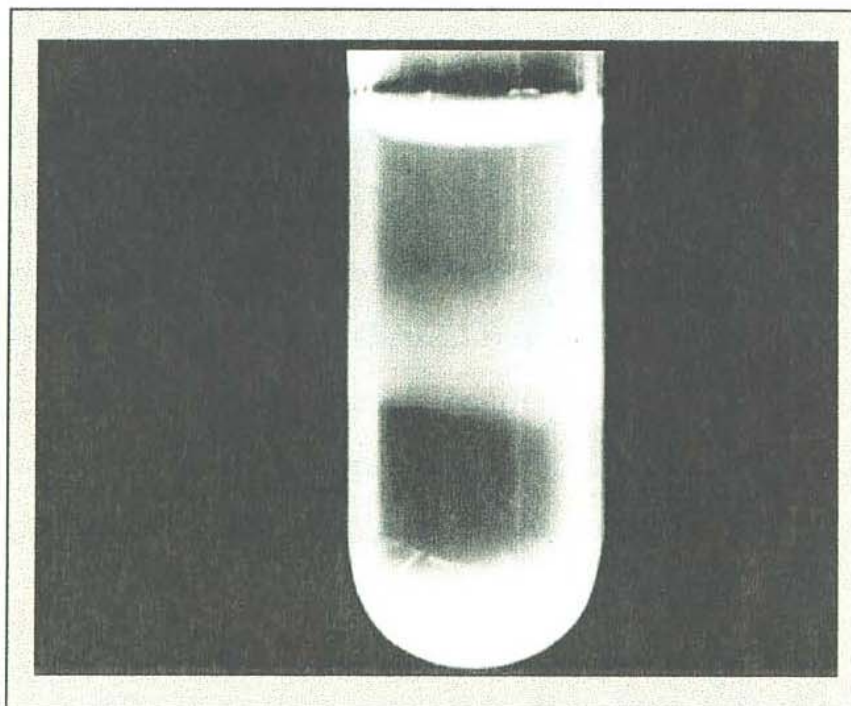
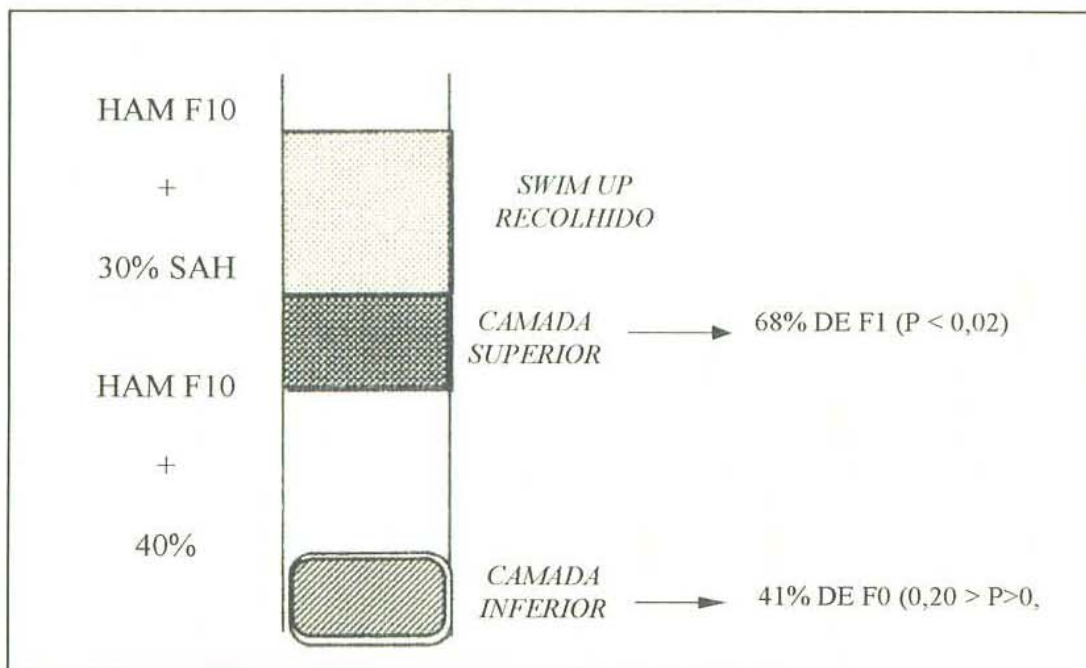


FIGURA 3 - MIGRAÇÃO DIFERENCIADA APÓS MÉTODO DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA MODIFICADO

ESQUEMA DA FIGURA 3



A aplicabilidade do método foi confirmada através dos resultados de concentrações celulares, acusando um índice de recuperação bastante satisfatório, desde que as concentrações iniciais garantissem os percentuais de perda naturalmente ocorridos durante o procedimento (TABELA 11). Reforçando este aspecto, o teste do alaranjado de acridina mostrou que não ocorreram aumentos significativos de células AA positivas nas bandas formadas, indicando a viabilidade do método quanto à manutenção da estrutura do DNA (TABELA 12 e TABELA 13).

TABELA 11

CONCENTRAÇÕES DE ESPERMATOZÓIDES OBTIDAS EM DIFERENTES MOMENTOS, DURANTE O PROCESSO DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA MODIFICADO (EM MILHÕES /ml)

AMOSTRA NÚMERO	CONCENTR. POR ML	Nº ESPERM. EJACULADO	CONCENT. APÓS <i>SWIMUP</i>	APÓS CAPACIT. BANDA SUP.	MODIFICADA BANDA INF.
28	138	468	81	10	40
29	37	130	10	1	3
30	135	351	2	0	0,4
31	19	68	2	0,2	0,2
32	78	124	10	1	3
33	422	760	10	1	4
34	178	888	30	14	15
35	88	193	12	2	5
36	175	525	80	20	40

TABELA 12

PERCENTUAIS MÉDIOS DE CÉLULAS AA POSITIVAS OBTIDOS APÓS
PROCESSO DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA MODIFICADO

AMOSTRA	ANTES CAP.	BANDA SUP.	BANDA INF.
23	13	5	7
24	16	8	9
25	13	7	5
26	8	12	10
27	15	9	9

TABELA 13

COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE PERCENTUAIS DE CÉLULAS AA
POSITIVAS OBTIDOS NAS BANDAS SUPERIOR E INFERIOR, APÓS
PROCESSO DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA MODIFICADO

	ANTES - SUP	ANTES - INF	SUP - INF
X	4,80	5,00	-0,20
s	2,24	1,79	0,80
t	2,14 (0,10>p>0,05)	2,80 (0,05>p>0,02)	-0,25 (0,90>p>0,80)

ANTES = ANTES DE CAPACITAÇÃO

SUP / INF = BANDAS SUPERIOR E INFERIOR, RESPECTIVAMENTE

Quanto às células F2, verificadas neste procedimento, os percentuais médios oscilaram entre 0% e 11% nas amostras prévias aos tratamentos e com intervalos entre 0% e 8% após a capacitação espermática, em ambas camadas (TABELA 14).

TABELA 14

PERCENTUAIS MÉDIOS DE CÉLULAS F2 OBTIDOS APÓS PROCESSO DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA MODIFICADO

AMOSTRA	ANTES CAP	BANDA SUP	BANDA INF
23	0	0	0
24	2	5	3
25	4	2	3
26	11	8	8
27	0	0	0

A comparação estatística dos resultados acima mostrou que os percentuais de células F2 não se alteraram com o procedimento (TABELA 15).

TABELA 15

COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS PERCENTUAIS MÉDIOS DE CÉLULAS F2 OBTIDOS NAS CAMADAS, SUPERIOR E INFERIOR, APÓS PROCESSO DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA MODIFICADO

	ANTES-BAND SUP	ANTES-BAND INF	SUP-INF
X	0,40	0,60	-0,20
s	1.03	0,68	0,49
t	0,39 (0.80>P>0.70)	0,88 (0.50>P>0.40)	-0,41 (0.70>P>0.60)

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

A razão de sexo é definida como o número de indivíduos do sexo masculino para cada 100 do feminino, sendo denominada *secundária* quando se refere aos nascimentos e *primária* quando aborda a razão gamética (WINGATE, 1966; CHAUDHURI & SCHILL, 1987).

Na espécie humana, o sexo cromossômico é determinado pelo gameta masculino que, teoricamente, deveria contribuir com um número equivalente de espermatozóides portadores dos cromossomos X e Y e conseqüente equilíbrio da razão de sexo ao nascimento. Esta situação não tem sido confirmada pelos registros epidemiológicos, que acusam uma razão de sexo de 106 nas populações caucasóides do Canadá, Estados Unidos e Europa (CHAUDHURI & SCHILL, 1987; ZARUTSKIE et alii, 1989), repetindo-se a mesma tendência nas populações negróides e orientais, com taxas de 107 na Nigéria (RUBIN, 1967) e de 115 na Coréia (REHAN, 1982).

A estabilidade temporal desses valores nas variadas populações do globo fortaleceu a idéia de que o desvio favorável ao sexo masculino, ao nascimento, corresponderia a um evento não casual da espécie humana e objeto de estudo dos pesquisadores desde o início do século. Nesta abordagem, destacou-se o extenso e criterioso estudo retrospectivo realizado por RUSSEL (1936)⁵. Comparando os registros de nascimentos nos séculos XVII, XVIII e XIX, verificou que os países diretamente envolvidos na Primeira Guerra Mundial apresentavam elevação das taxas

⁵ RUSSEL, W.T. apud ZARUTSKIE et alii - The clinical relevance of sex selection techniques. *Fertil. Steril.*, 52:891-905.

de razão de sexo nos anos imediatamente seguintes ao Tratado de Versailles (de 103,5 a 103,9 para 104,5 a 105,1), contrastando com a manutenção das mesmas nos países não ligados ao conflito. RUSSEL concluiu que a elevação destes valores decorria do aumento no número de coitos, característico dos períodos pós-guerra, teoria posteriormente confirmada com os estudos sobre o segundo conflito mundial. A situação foi particularmente interessante nos Estados Unidos da América do Norte, cuja taxa mantinha-se inalterada em 105,7 até a década de 40, quando sofreu discretos, mas significativos aumentos, atingindo um pico de 106,1 em 1946. Este comportamento foi considerado por MAC MAHON & PUGH (1954)⁷ consequência do crescente envolvimento do país em ambos os conflitos e aumento da frequência de coitos após os mesmos.

A manutenção do desvio favorável ao sexo masculino foi verificada ainda nos estudos sobre abortos, quer espontâneos, quer naqueles provocados por razões socioeconômicas, com proporções de 123 e 106 meninos para cada 100 meninas, respectivamente (YAMAMOTO et alii, 1975; ANDREWS, DUNLOP, ROBERTS, 1984; CHAUDHURI & SCHILL, 1987). Por sua vez, os procedimentos de Reprodução Assistida parecem ter chegado a resultados similares, embora pouco valorizados nos levantamentos mais recentes. Assim, RUFAT e colaboradores (1994) referiram *uma sutil preponderância do sexo masculino* nos nascimentos entre 1987 e 1989, em 11 centros de Reprodução Humana da França. Das 1.637 gestações obtidas a partir de procedimentos variados, 864 correspondiam a crianças do sexo masculino, ou seja, uma razão de sexo de 112.

Os dados de literatura convergem, portanto, para a ocorrência de um fenômeno generalizado e estável, de modo que flutuações esporádicas seriam atribuídas

⁷ MAC MAHON, B. & PUGH, T.F. apud ROBERTS, A.M. - The origins of fluctuations in the human secondary sex ratio. *J. Biosoc. Sci.*, 10:169-82, 1978.

a alterações do ambiente. Neste contexto, têm sido bem documentados os papéis da origem etnogeográfica (EGWUATU, 1984; JAMES, 1985a) e da idade parental, associada ou não à paridade (SZILARD, 1960; ERICKSON, 1976; JAMES & ROSTRON, 1985), assim como da concentração hormonal no momento da concepção (SEIDEL et alii, 1990; JAMES, 1995). Mais recentemente, LOBEL, POMPONIO, MUTTER (1993) lembraram das possibilidades teóricas relativas à sobrevivência diferenciada dos fetos masculino e feminino no interior do útero, ou ainda da seleção gamética no momento da fecundação, promovendo desvios para um ou outro lado, em função de fatores ainda não esclarecidos.

Contrastando com a razão de sexo ao nascimento, os dados de literatura sobre a razão gamética na espécie humana indicam um pequeno desvio no sentido oposto, isto é, favorável ao sexo feminino. Conforme mencionado no QUADRO 2, existem poucos artigos acusando proporções idênticas entre os dois sexos (BRANDRIFF et alii, 1986a, 1986b; LOBEL et alii, 1993). Os resultados do nosso estudo corroboraram mais uma vez esta situação, onde tanto a amplitude como o percentual médio de células F1 estiveram inseridos nos valores divulgados pelos diversos autores que empregaram o mesmo método de avaliação, consolidando novamente o padrão de leitura obtido através da coloração pela quinacrina. Recentemente, GUTTENBACH & SCHMID (1990) confirmaram, através de criterioso estudo comparativo entre as técnicas de hibridização in situ, southern blot e bandas Q, a localização preferencial da cromatina Y na posição central do espermatozóide, confirmando as primeiras descrições de BARLOW & VOSA(1970), o que também foi observado em nosso estudo.

QUADRO 2

RAZÃO DE SEXO ENCONTRADA NO SÊMEN HUMANO, SEGUNDO DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

AUTOR , ANO	MÉTODO DE AVALIAÇÃO	MÉDIA ESP. Y (*)
BROER et alii, 1976	Corpo F	43%
DOWNING & BLACK, 1976	Corpo F	49%
GOODALL & ROBERTS, 1976	Corpo F	43%
BHATTACHARYA et alii, 1977	Corpo F	48%
DAVID et alii, 1977	Corpo F	41%
DMOWSKI et alii, 1979	Corpo F	49%
BIBBINS et alii, 1988	Corpo F	49%
OSATHANONDH et alii, 1988	Corpo F	47%
CLAASSENS et alii, 1990	Corpo F	46%
ENGELMANN et alii, 1989	Corpo F	46%
BIBBINS et alii, 1992	Corpo F	46%
McCOSHEN et alii, 1994	Corpo F	49%
RUDAK et alii, 1978	Citogenético	43%
MARTIN et alii, 1983	Citogenético	46%
BRANDRIFF et alii, 1986 a	Citogenético	50%
MARTIN et alii, 1985 b	Citogenético	48%
BRANDRIFF et alii, 1986 b	Citogenético	50%
KAMIGUSHI & MIKANO, 1986	Citogenético	47%
MARTIN & RADEMAKER, 1987	Citogenético	47%
BECKETT et alii, 1989	<i>Southern blott</i>	45%
MARTIN & RADEMAKER, 1992	Citogenético	45%
LOBEL et alii, 1993	PCR	50%
HAN et alii, 1993	PCR e FISH	47%
WANG et alii, 1994	FISH	48%

(*) = Média de espermatozoides portadores do cromossomo Y, cujos valores foram aproximados para números inteiros

PCR = Reação da polimerase em cadeia

FISH = Fluorescência com hibridização *in situ*

Na elaboração do ensaio sobre os efeitos da capacitação espermática sobre a razão de sexo, especulou-se, a princípio, sobre a interferência da concentração celular nos procedimentos, uma vez que a amostra inicial seria dividida em duas alíquotas que, embora de igual volume, poderiam conter diferenças significativas quanto ao número

de células. A partir da evidência estatística acerca da similaridade destas frações (TABELA 16 e TABELA 17 do ANEXO 5), pode-se deduzir que as eventuais alterações seriam, de fato, decorrentes da técnica empregada. Deste modo, verificou-se que o método de Percoll não induziu a alteração nos percentuais de células F1, enquanto que a técnica de *swim up* de 45 minutos promoveu uma diminuição significativa destas. A seleção favorável para o sexo feminino resultou no percentual médio de enriquecimento em torno de 15% (TABELA 1 e TABELA 2), dados não encontrados na literatura.

Ainda que poucos autores tenham se detido na técnica de *swim up* para a seleção de gênero, LOBEL et alii (1993), assim como HAN et alii (1993), observaram que o método não resultou em enriquecimento para qualquer dos sexos, contudo ENGELMANN, PARSCH, SCHILL (1989), assim como CLAASSENS et alii, 1990, verificaram um pequeno e significativo desvio, todavia para o sexo masculino. Considerando as pequenas adaptações introduzidas a cada nova técnica, em cada laboratório, é possível que os procedimentos envolvidos, aparentemente similares, contenham importantes diferenças relativas às lavagens prévias do sêmen fresco, tempo de centrifugação e incubação do material, composição dos meios de cultivo, bem como origem e concentração do complemento adicionado ao meio. Em função dos resultados obtidos em nosso estudo, caberia questionar ainda quais propriedades seriam efetivamente participantes do processo de migração espermática, uma vez que, pelo menos com relação à migração ascendente, as formas femininas mostraram-se mais eficientes, num período de incubação de 45 minutos.

Com relação ao método de migração em Percoll, as variações técnicas relatadas nos artigos são ainda maiores, o que talvez justifique os dados contraditórios da literatura. Analisando quatro métodos de capacitação com relação à seleção do gênero, ENGELMANN e colaboradores (1989) encontraram um pequeno mas

significativo favorecimento do sexo masculino em todas as preparações estudadas, inclusive nas capacitações por Percoll (QUADRO 3). O mesmo procedimento resultou em alteração não mensurável, segundo VAN KOIJ & VAN OOST (1992), ou numa relação favorecida para o sexo feminino (KANEKO et alii, 1983a; IIZUKA et alii, 1987).

Considerando que a fração de células inviáveis não constituiu um parâmetro importante nos ensaios mencionados, é possível que, em algumas situações, a razão gamética tenha sido mascarada pelo número de células aparentemente íntegras, mas com DNA desnaturado, presentes nos esfregaços. Em nosso laboratório, temos observado que a técnica de Percoll fornece uma amostra menos límpida, com maior quantidade de restos celulares, espermatozóides imóveis e leucócitos, quando comparadas a outros procedimentos. Embora as taxas de fecundação não sejam aparentemente afetadas por esta característica, a leitura das preparações em geral poderia contemplar células não viáveis, com o DNA já desnaturado, uma vez que a fluorescência pela quinacrina, assim como as análises morfológicas usuais, não distinguem esta situação.

A avaliação do teste do alaranjado de acridina realizada no presente estudo não detectou variações significativas para ambos métodos empregados (TABELA 6 e TABELA 7), todavia algumas preparações apresentavam maior contingente de células desnaturadas após tratamento, como no caso da amostra 21 da TABELA 6, refletindo uma resistência individual aos processos de centrifugação, incubação em estufa e tempo de abstinência sexual, principalmente. Com a retirada deste indivíduo da amostra, as diferenças intrapares adquiriram significância estatística, reforçando a idéia sobre a interferência da variabilidade individual no processamento dos dados. Daí a necessidade de aplicação do teste na avaliação de um dos aspectos da *viabilidade celular*, relativo à integridade do material nuclear do espermatozóide.

O teste do alaranjado de acridina foi introduzido na década de 80 por TEJADA e colaboradores (1984) e, a partir de então, tem sido empregado na avaliação de indivíduos com infertilidade idiopática com padrão seminal aparentemente normal, mas com um percentual aumentado de células AA positivas, ou seja, com a integridade cromatínica alterada (IBRAHIM, MOUSSA, PEDERSEN, 1988; AUGER et alii, 1990; LIU & BAKER, 1992). HIGHLAND e colaboradores (1991) salientaram ainda que não existe correlação satisfatória entre os valores de espermatozóides AA positivos e a motilidade, sugerindo que se trata de propriedades funcionais independentes, o que justificaria o emprego rotineiro da técnica. Considerando os resultados obtidos neste estudo, pode-se inferir que os processos de capacitação de Percoll e de *swim up* podem induzir à seleção de células AA, quer positiva ou negativamente, o que reforça a necessidade de testes prévios aos procedimentos de Reprodução Assistida, para a avaliação deste parâmetro.

Voltando à questão da seleção do gênero, verifica-se que o questionamento acerca da eficácia dos métodos em questão vincula-se ao método de avaliação das preparações, principalmente quando coradas pela quinacrina. Segundo alguns autores, esta coloração não identificaria os falsos-positivos relativos à fluorescência inespecífica, nem tampouco os falsos-negativos decorrentes de alterações estruturais na região de heterocromatina do cromossomo Y, além de abranger uma subjetividade variável na leitura das preparações (THOMSEN & NIEBUHR, 1986; GUTTENBACH & SCHMID, 1990; LOBEL et alii, 1993). Estas variáveis são, no entanto, passíveis de controle, através de protocolos elaborados com testemunhos anteriores e posteriores aos tratamentos. Nestas condições, não haveria motivo para aceitar como uma eventual falha técnica poderia privilegiar um dos tempos do procedimento, vindo a se alterar significativamente no seguinte. Mesmo nas aberrações estruturais do cromossomo Y, a observação de lâminas com ausência de fluorescência específica ou com um número reduzido de Corpos F poderia constituir um critério de exclusão importante, sem,

contudo, comprometer o restante de uma amostra homogênea e criteriosamente escolhida. Esta situação foi observada em um indivíduo da amostra, apresentando ausência total de Corpo F nas preparações, sendo, por isso, retirado da casuística (sujeito nº 14 da TABELA 18).

Para verificar a interferência de algumas variáveis na avaliação do Corpo F, DAVID e colaboradores (1977) processaram amostras de sêmen pelo método de capacitação em gradiente de albumina, segundo ERICSON e colaboradores (1973), submetendo a leitura das preparações a diferentes observadores. Como a concentração celular tornava-se muito evidente nas alíquotas antes e após tratamento, realizaram, em paralelo, diluições variadas das amostras, simulando estas frações. Durante os cinco meses de experimentação, a contagem da cromatina Y aumentou progressivamente de 35% para 45%, enquanto que a diferença entre os observadores diminuiu consideravelmente. Os autores concluíram que, embora a contagem do Corpo F representasse uma operação subjetiva, esta se afirmava aos poucos com a crescente experiência do observador, de modo que os valores em torno de 67% obtidos nas frações finais foram considerados como confiáveis, e amparados em condições de controle.

Considerando as condições de rotina de nosso laboratório, permitimo-nos acrescentar que a coloração pela quinacrina processava-se como uma reação irreversível de "tudo ou nada", de modo que, quando positiva, resultava em uma imagem nítida e inequívoca do Corpo F, bastando alguns ajustes adicionais, como lavagem dos esfregaços ou um período maior de atuação do corante. Por outro lado, quando o Corpo F não era evidenciado de início, mesmo com padrão de fluorescência celular satisfatório, as preparações do dia eram consideradas perdidas, não havendo ajustes técnicos capazes de reverter a situação.

QUADRO 3

RAZÃO DE SEXO PRIMÁRIA OBTIDA APÓS DIFERENTES PROCESSOS DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E QUANTIFICADA ATRAVÉS DE DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

AUTOR, ANO	PERC. ESP. Y ANTES CAP(*)	MÉTODO	ALIAÇÃO	PERC. ESP. Y (
ERICSON et alii, 1973	49%	Gradiente Albumina	Corpo F	84%
GOODALL & ROBERTS, 1976	43%	Gradiente Albumina	Corpo F	46%
BHATTACHARYA et alii, 1977	48%	Gradiente Albumina	Corpo F	60%
DMOWISKI et alii, 1979	45%	Gradiente Albumina	Corpo F	70%
DAVID et alii, 1977	41%	Gradiente Albumina	Corpo F	67%
BRANDRIFF et alii, 1986b	50%	Gradiente Albumina	Citogenético	43%
WANG et alii, 1994	48%	Gradiente Albumina	FISH	47%
IIZUKA et alii, 1987	47%	Gradiente Percoll	Corpo F	28%
VANKOOIJ & VANOOST, 1992	50%	Gradiente Percoll	<i>Southern blot</i>	50%
ENGELMANN et alii, 1989	45%	Gradiente Percoll	Corpo F	50%
	45%	<i>Swim up</i>	Corpo F	50%
LOBEL et alii, 1993	50%	<i>Swim up</i>	PCR	52%
HAN et alii, 1993	47%	<i>Swim up</i>	PCR e FISH	47%
OSATHANONDH et alii, 1988	47%	Gradiente Gema Ovo	Corpo F	74%
BECKETT et alii, 1989	30%	Gradiente Sephadex	Corpo F	33%
	46%		Citogenético	45%
	45%		<i>Southern blot</i>	37%

(*) - Os valores foram aproximados para números inteiros.
PCR = Reação em cadeia da polimerase

FISH = Fluorescência com hibridização *in situ*

Com relação às células com dois corpos fluorescentes, ou F2, pôde-se verificar que estas representavam uma característica individual, estando ausentes em alguns e sendo mais freqüentes em outros, sem que fossem afetadas pelos processos de capacitação empregados (TABELA 4 E TABELA 5).

A presença de células F2 nos gametas humanos foi divulgada inicialmente por PEARSON et alii (1970), quando verificaram que os espermatozóides de indivíduos 46, XYY apresentavam dois pontos fluorescentes nos núcleos de suas células. Como as células F2 estavam geralmente presentes no sêmen de indivíduos normais, numa variação entre 2% e 4%, alguns autores passaram a considerá-lo como a expressão numérica da dissomia do cromossomo Y presente no gameta masculino (SUMNER et alii, 1971; PAWLOWITZKY & PEARSON, 1972).

Partindo do conceito acima, BIBBINS e colaboradores (1992) estudaram uma amostra de indivíduos hipoférteis com varicocele, comparando-os com um grupo controle. Constatando um aumento de células F2 nos primeiros, deduziram que a moléstia levaria a um aumento da temperatura intra-escrotal, propiciando um aumento de alterações cromossômicas, e entre elas as não disjunções do cromossomo Y. Embora teoricamente possível, esta abordagem ainda é única na literatura e não é concordante com os achados citogenéticos que reportam desde a ausência total de um complemento 24,YY, num total de 1.000 espermatozóides analisados (MARTIN et alii, 1983), até a presença de três casos entre 6.800 cariótipos de espermatozóides, segundo PELLESTOR (1991). De outra forma, as análises realizadas através de fluorescência e hibridização *in situ* (FISH) específica para os cromossomos sexuais humanos, têm revelado uma freqüência de 1,74% de aneuploidias ligadas aos cromossomos sexuais, sendo 0,53% representadas pelas formas YY e XXYY (LOBEL et alii, 1993). Com a utilização do mesmo método, GUTTENBACH & SCHMID (1990) e WANG et alii (1994) verificaram uma incidência entre 0,27% e 0,29% de dissomia Y no sêmen a

fresco, compatível com os achados de VAN KOIJ & VAN OOST (1992) que obtiveram, através de *southern blot*, 0,28% de gametas YY antes da capacitação em gradiente de albumina, com um decréscimo não-significativo após o processo. Considerando a frequência de indivíduos 47, XYY na população, estimada em 1 para cada 1.000 recém-nascidos (GUTTENBACH & SCHMID, 1990), os dados obtidos com as técnicas de FISH e de Corpo F parecem estar mais próximos da expressão desta dissomia no espermatozóide humano. Uma das razões da disparidade dos dados com relação aos achados citogenéticos, seria o pequeno número de indivíduos analisados, além da possível inabilidade de fertilização dos óvulos de hamster pelos espermatozoides portadores do complemento 24,YY. Considerando que técnica citogenética dependente deste fator, provavelmente os valores nesses casos estariam subestimados. Todavia, como estes dados são incipientes, e por isso ainda controvertidos, parece relevante lembrar o comentário de DAVID et alii (1977), sugerindo que, *sendo ou não as células F2 representativas da dissomia YY, pelo menos diferem fisiologicamente das células F1.*

A partir dos dados obtidos com a capacitação através de *swim up*, resultando numa diminuição significativa de células F1, idealizou-se um experimento onde as amostras seriam submetidas a um segundo tempo de migração, objetivando concentrar ainda mais os gametas F0. Partindo de duas propostas iniciais, experimentos prévios evidenciaram que submeter o sêmen já capacitado a um segundo *swim up* resultava em uma suspensão homoganeamente distribuída no meio de cultura; por outro lado, a deposição do sêmen capacitado sobre um meio de cultivo mais denso e viscoso (HAM F10 com albumina sérica humana a 40%) resultava na formação de duas camadas de migração distintas (FIGURA 3). Concentrações inferiores de ASH resultavam em uma suspensão homogênea, enquanto que superiores implicavam na impossibilidade de migração dos gametas neste meio. Os resultados de Corpo F indicaram uma prevalência

significativa de células F1 na camada superior, com um percentual aproximadamente complementar na inferior (TABELA 8).

Como se trata de novo método, não existem dados a partir de técnica similar. Entre os artigos relacionados no QUADRO 3, os dados obtidos após capacitação, através de técnicas de gradiente de albumina, referem desde a ineficácia do método para a seleção sexual (GOODALL & ROBERTS, 1976; BRANDRIFF et alii, 1986b; WANG et alii, 1994)) até desvios para formas masculinas, em proporções variadas (DAVID et alii, 1977; BATTHACHARYA et alii, 1977; DOMOWISKY et alii, 1979). Nestes casos, a variabilidade técnica também é ampla quanto ao número de gradientes, bem como o volume e a concentração de albumina dos mesmos.

A existência de diferenças fenotípicas nos espermatozoides, decorrentes das proporções entre os cromossomos sexuais, permanece como assunto controvertido. De modo geral, acredita-se em uma diferença embasada nas variáveis peso, densidade e motilidade interferindo diretamente sobre o processo de migração espermática. Apesar desta dedução ser verdadeira para alguns mamíferos, o conceito não se aplica a um grande número de espécies, incluindo a humana. MORUZZI (1979) pôde confirmar isso num importante estudo abrangendo 524 espécies de mamíferos, onde avaliou projeções de imagens dos cromossomos sexuais, comparando-as com as análises dos complexos sinaptonêmicos de biópsias testiculares. Concluiu que a eficácia dos processos de seleção sexual estava vinculada à diferença de proporções entre os cromossomos X e Y e que estas deveriam ser superiores a 6,2%. A amostra original foi reduzida para um número de 24 espécies, incluindo-se algumas de roedores e morcegos, além de um único primata, sendo o restante compreendido por animais selvagens. A diferença de 2,7% encontrada nos espermatozoides humanos justificaria a inaptidão da espécie para os processos de seleção, segundo os critérios do autor.

Seguindo-se a essas evidências, a confirmação de que apenas 18% da massa do espermatozóide é constituída por DNA, sendo o restante preenchido por água e lípidos (SUMNER & ROBINSON, 1976), e verificando-se ainda que a morfologia espermática é alterada ao longo de seu amadurecimento e interação com proteínas do citoesqueleto, a obtenção de amostras altamente purificadas parece uma aspiração distante, senão altamente improvável, pelo menos considerando as poucas variáveis a que se tem acesso no momento.

Em nosso experimento, pudemos averiguar que a participação do peso, densidade e motilidade não ocorria de modo tão simplificado, uma vez que, na banda superior, havia uma predominância de formas masculinas que, nesta situação, demonstravam menor habilidade para a migração descendente em meio mais denso.

Considerando a análise do Corpo F confiável e detendo-nos na análise estatística, poderíamos sugerir uma seleção aceitável para o sexo masculino, com uma chance aproximada de 2:1 favorável a estes, a ser extraída da banda superior, obtida no processo de capacitação espermática modificado. Esta apresentaria a vantagem adicional de constituir uma amostra mais pura com relação à integridade da cromatina, conforme mostra a TABELA 13.

Para o sexo feminino seria aparentemente indiferente utilizar a banda inferior ou o *swim up* de 45 minutos. Entretanto, a julgar pelas concentrações obtidas no método modificado e pelos dados apresentados na TABELA 10, parece tecnicamente possível aspirar e descartar a camada rica em espermatozoides F1, homogeneizando-se as demais para obter uma suspensão celular mais rica em F0 e com menor índice de contaminação por células masculinas, o que representaria uma vantagem em relação ao método tradicional.

Com os recursos de Genética Molecular disponíveis no momento, a validação da seleção do gênero *in vitro* deverá ocorrer a médio prazo, com o

aprimoramento de métodos mais eficazes de avaliação quantitativa. Nestes casos, a técnica de FISH constitui, até o momento, a alternativa mais recomendada, uma vez que permite a avaliação individual de cada célula, com a vantagem de, através da marcação dupla, detectar aneuploidias XY e XXYY. Paralelamente, parece-nos que esforços em processos de seleção mais efetivos deveriam contemplar outras propriedades, além das mais convencionais, como peso, densidade, motilidade e cargas de superfície. Refletindo ainda sobre as afirmações de MOORE & GLEDHILL (1988), de que os estudos de gênero na espécie humana empregam um delineamento de estudo estatístico inadequado, as deduções a partir das razões de sexo ao nascimento necessitariam de uma avaliação mais ampla e controlada.

A razão de sexo primária seria, então, uma opção mais facilmente controlada, embora não se possa avaliar as conseqüências ao longo da gestação. Assim, LOBEL e colaboradores (1993) mencionaram que existem evidências sobre a seleção pós-gamética na qual os embriões até a oitava e décima semana de gestação seriam predominantemente femininos, invertendo-se a relação após este período.

A julgar pelos dados obtidos, o método ora proposto constitui numa alternativa perfeitamente exeqüível, de baixo custo e com reprodutibilidade satisfatória, razões suficientes para seu emprego em situações especiais de Reprodução Assistida, nas quais a escolha do sexo representa o fator mais importante. Finalmente, fica o questionamento sobre quais recursos a natureza dispõe para atuar em limites tão estreitos de variabilidade. Manipulá-los sem o devido conhecimento seria, no mínimo, temerário.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

O ensaio experimental desenvolvido neste estudo possibilitou o estabelecimento das seguintes conclusões:

- . A razão de sexo nas amostras prévias à capacitação espermática oscilou entre 36% e 50%, dados concordantes com a literatura.
- . A técnica de *swim up* promoveu um enriquecimento para as formas femininas, sugerindo a maior habilidade destas no processo de migração ascendente.
- . A técnica de migração em Percoll não promoveu a seleção *in vitro* para qualquer dos sexos.
- . A integridade da cromatina pode se alterar significativamente em decorrência dos processos de capacitação espermática de *swim up*, embora exista variabilidade individual importante.
- . A técnica de migração espermática em dois tempos promove a formação de duas camadas distintas, apresentando a superior um enriquecimento de formas masculinas.
- . A integridade da cromatina pode se alterar significativamente com o processo acima, resultando em preparações celulares mais purificadas quanto a esse parâmetro e sendo, portanto, aplicável às situações de reprodução assistida.

ANEXOS

ANEXO 1

RECOMENDAÇÕES SOBRE TEMAS DE ÉTICA EM OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA FEITAS PELO COMITÊ PARA ESTUDOS DOS ASPECTOS DA REPRODUÇÃO HUMANA DA FIGO - SOBRE A SELEÇÃO DO SEXO

A SELEÇÃO DO SEXO

O Comitê declara que a discriminação sexual, profundamente enraizada, prevalece ainda em muitas sociedades e que o aborto seletivo de fetos femininos tem emergido como uma nova manifestação desta injustiça social.

1.* A maioria dos membros considera que o princípio ético da proteção do fraco, como o princípio ético da justiça são violados pelo aborto seletivo de sexo (de meninos ou meninas). Estes membros acreditam que nenhum feto pode ser sacrificado devido, exclusivamente, ao seu sexo.

2.* Outros membros consideram que o princípio ético de autonomia da mulher é violado pela interdição do aborto como seleção de sexo.

3.*Técnicas para seleção de sexo antes da concepção, ainda imperfeitas, provavelmente serão desenvolvidas em um futuro próximo. As pesquisas neste domínio devem prosseguir devido ao seu benefício potencial.

4.*A utilização da seleção preconcepcional do sexo, para evitar transtornos genéticos ligados ao mesmo, constitui uma indicação perfeitamente justificada em bases médicas.

5.*A seleção preconcepcional do sexo pode ser justificada em fundamentos sociais em alguns casos com a finalidade de permitir a crianças de ambos os sexos gozar amor e cuidados de seus pais. Para que esta indicação social seja realmente justificável, não pode se chocar com outros valores sociais existentes onde seja praticada.

7.*A seleção preconcepcional de sexo não deve jamais ser utilizada como um meio de discriminação sexual contra qualquer dos sexos, em particular o feminino.

ANEXO 2

Resolução CFM n* 1358/92, sobre a seleção de sexo

19/11/1992

O Conselho Federal de Medicina, no uso de suas atribuições,

RESOLVE:

Art. 1* - Adotar as NORMAS ÉTICAS PARA A UTILIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA, anexas à presente Resolução, como dispositivo deontológico a ser seguido pelos médicos.

I- PRINCÍPIOS GERAIS

4 - As técnicas de RA não devem ser aplicadas com a intenção de selecionar o sexo ou qualquer outra característica biológica do futuro filho, exceto quando se tratar de evitar doenças ligadas ao sexo do filho que venha a nascer.

ANEXO 3

DECLARAÇÃO ASSINADA PELOS SUJEITOS A SEREM SUBMETIDOS À CIRURGIA DE VASECTOMIA

HOSPITAL DE CLÍNICAS - UNICAMP

DECLARAÇÃO

Eu, _____, RG _____,
_____(idade), _____(estadocivil), residente _____
_____(endereço completo), DECLARO,
EM MINHA Sã CONSCIÊNCIA E DE LIVRE E ESPONTãNEA VONTADE, QUE DESEJO SER
SUBMETIDO à CIRURGIA DE VASECTOMIA.

Campinas, ___ de _____ de 199 __.

Declarante

Ciente de acordo

ANEXO 4

TABELA 16

VALORES NORMAIS DAS VARIÁVEIS RELATIVAS AO SÊMEN, SEGUNDO O
MANUAL WHO, 1987

Volume	igual ou superior a 2,0ml
Aspecto	branco opalescente
Viscosidade	2cm ou inferior
Liquificação	completa até 60 minutos à temperatura ambiente
pH	7,2 a 7,8
Concentração	20,0 milhões/ml ou superior
Total no ejaculado	40,0 milhões espermatozóides, ou superior
Motilidade	50% ou superior com formas A e B (progressão anterógrada) 25% ou superior de formas A (progressão linear rápida)
Morfologia (*)	50% ou mais com morfologia normal
Viabilidade	50% ou mais de formas vivas
Leucócitos	inferiores a 1 milhão/ml

(*) - A avaliação deste parâmetro encontra-se em substituição pelo critério de KRUGGER et alii (1986), admitindo-se como normais um percentual igual ou superior a 14% de células sem quaisquer alterações morfológicas

ANEXO 5

TABELA 16

CONCENTRAÇÕES CELULARES (EM MILHÕES/ML) OBTIDAS
APÓS FRACIONAMENTO DAS AMOSTRAS EM DUAS ALÍQUOTAS
DE IGUAL VOLUME

<i>AMOSTRA</i>	<i>TA1</i>	<i>TA2</i>	<i>MÉDIA</i>	<i>TB1</i>	<i>TB2</i>	<i>MÉDIA</i>
1	70	87	78,5	67	90	78,5
2	49	40	44,5	58	53	55,5
3	01	03	2,0	01	02	2,0
4	157	166	161,5	131	153	142,0
5	57	60	58,5	59	68	63,5
6	37	28	32,5	47	42	44,5
7	149	148	148,5	149	133	141,0
8	185	205	195,0	189	133	191,5
9	10	06	8,0	08	07	7,5
10	61	51	56,0	67	71	69,0
11	123	119	121,0	130	119	118,0
13	37	38	37,5	38	43	40,5

TA1/2 = AMOSTRAS 1 E 2 DO TUBO A CORRESPONDENDO À ALÍQUOTA DESTINADA À CAPACIDADE EM PERCOLL

TB1/2 = AMOSTRAS 1 E 2 DO TUBO B, CORRESPONDENDO À ALÍQUOTA DESTINADA À CAPACIDADE EM SWIM UP

TABELA 17

COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS ALÍQUOTAS A B (TA E TB)

<i>AMOSTRAS</i>	<i>X</i>	<i>S</i>	<i>M</i>
TA	78,63	63,14	t= 0,3062
TB	77,42	53,31	p= 0,7752

ANEXO 6

TABELA 18

DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS SEGUNDO OS
PARÂMETROS DE ESPERMOGRAMA

AMOSTRA UTILIZADA NA COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE PERCOLL E
SWIM UP

AMOSTRA	VOLUME	pH	LIQUEF.	CONCEN TRAÇÃO	CONC. EJAC.	% A/B	% VITALIDADE	MORF.NL
13	3,2	8,0	normal	198	632	50	82	39
14	2,6	8,0	normal	30	78	50	58	53
15	2,3	8,0	normal	143	328	60	73	59
16	3,4	8,0	normal	43	145	60	67	35
17	5,0	8,0	normal	22	108	50	70	32
18	3,5	7,5	normal	260	910	70	78	75
19	5,0	8,0	normal	118	588	50	75	61
20	4,2	8,5	normal	90	378	60	70	30
21	3,4	7,0	normal	123	417	50	70	26
22	2,5	8,0	normal	380	950	70	80	23

AMOSTRA UTILIZADA NO MÉTODO DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICO
MODIFICADO

AMOSTRA	VOLUME	pH	LIQUEF.	CONCEN TRAÇÃO	CONC. EJAC.	% A/B	% VITALIDADE	MORF.NL
23	2,9	8,5	normal	370	1073	60	75	46
24	1,7	8,0	normal	18	31	68	50	30
25	4,2	8,0	normal	148	620	60	72	26
26	4,3	8,0	normal	165	710	50	70	30
27	2,7	8,0	normal	105	284	60	85	30

ANEXO 7

CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA PELO MÉTODO DE *SWIM UP*, SEGUNDO O MÉTODO DE IRIANNI et alii (1990), MODIFICADO

A - Soluções: Meio de Cultura HAM F10 (Sigma), contendo 30000UI de streptomicina e penicilina

Albumina sérica humana (ASH, Behring)

Meio HAM F10 acrescido de ASH (proporção: 8:3) - Meio enriquecido

B - Preparo do Sêmen:

- . Acrescentar ao sêmen liquefeito, volume equivalente de Meio HAM F10.
- . Homogeneizar a suspensão e centrifugar a 300g, durante 10 minutos.
- . Retirar o sobrenadante, acrescentar Meio enriquecido .
- . Homogeneizar a suspensão e acrescentar, lentamente, 1ml de meio enriquecido.
- . Incubar em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂, durante 45 minutos.
- . Recolher a nuvem de migração formada e avaliar a concentração e motilidade.

ANEXO 8

CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA ATRAVÉS DE MIGRAÇÃO EM GRADIENTE DE PERCOLL, SEGUNDO O MÉTODO DE PARD et alii (1988), MODIFICADO

A - Meios de Cultura e Soluções Estéreis:

Meio HAM F10, 10 x concentrado (Sigma), com antibióticos - Meio 10x concentrado -

Meio HAM F10 (Sigma), contendo 30000 UI de streptomicina e penicilina.

Meio HAM F10 (Sigma), contendo antibióticos, acrescido de ASH (Behring) (proporção: 8:3) - Meio enriquecido.

Bicarbonato de Sódio a 7,5% (Merck).

Percoll (Merck)

B - Preparo da Solução-mãe de Percoll:

. 6ml de Meio 10x concentrado

. 75ml de Percoll

. Homogeneizar a solução e titular com bicarbonato a 7,5% , de modo a atingir o pH7,2-7,3.

. Ajustar a osmolaridade da solução para 278mOsm (270-280).

C - Preparo do gradiente de Percoll:

- . Percoll a 90%: 1ml de Meio HAM F10
9ml de solução-mãe de Percoll
 - . Percoll a 65%: 3,5ml de Meio HAM F10
6,5ml de solução-mãe de Percoll
 - . Percoll a 35%: 6,5ml de Meio HAM F10
3,5ml de solução-mãe de Percoll
- . Pipetar lentamente , com seringa descartável, as soluções de Percoll, em um tubo de ensaio de 8ml, na seguinte ordem, a partir do fundo do tubo:
- . 1ml de Percoll a 90%
 - . 1ml de Percoll a 65%
 - . 1ml de Percoll a 35%

D - Preparo do Sêmen:

- . Acrescentar ao sêmen liquefeito igual volume de Meio HAM F10.
- . Homogeneizar a suspensão e centrifugar a 300g, durante 10 minutos.
- . Descartar o sobrenadante e acrescentar 1ml de Meio enriquecido.
- . Homogeneizar a suspensão e acrescentar , lentamente, sobre o gradiente de Percoll recém-preparado.
- . Centrifugar a 300g, durante 15 minutos.
- . Descartar os dois gradientes superiores e homogeneizar o restante com o sedimento obtido.

- . Centrifugar a 300g, durante 10 minutos.
- . Remover todo o Percoll e acrescentar 1ml de Meio enriquecido (*).
- . Proceder às análises de rotina para estimar a concentração celular e a motilidade espermática.

(*) Esta etapa foi suprimida do estudo realizado, uma vez que a confecção dos esfregaços e leitura do corpo F e das células AA exigia nova centrifugação do material. Desse modo, as amostras *swim up* e Percoll foram submetidas ao mesmo número de centrifugações, durante os experimentos

SUMMARY

7. SUMMARY

The objective of the study was to investigate the possibility of two methods of sperm capacitation to facilitate *in vitro* sexual selection. A comparative evaluation of the sex ratios was observed before and after sperm capacitation through *swim up* and migration on Percoll gradient. The evaluation of sex ratios was performed with the visualization of "F" bodies on glass slides of each situation. Staining was done with quinacrine dihydrochloride and examined with fluorescence microscopy. The "t" test was utilized to evaluate the differences between sperm capacitation methods. The results indicate a favorable selection of female sex through *swim up*. To enhance the differences observed some of the samples were submitted to a second sperm capacitation. This was carried out by a classic *swim up* followed by sperm migration on tissue culture medium with increasing serum human albumin to form two migration layers. This second method resulted in greater prevalence of male sex forms in the upper layer. The results suggest a favorable selection of female sex using *swim up* and to male sex with two step migration method of sperm capacitation. Roughly estimated satisfactory, they found viable, economical and simple to conduct alternatives to be offered to couples carriers of sex-linked inherited diseases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AMANN, R.P. - Treatment of sperm to predetermine sex. **Theriogenology**, **31**:49-60, 1989.
- ANDREWS, T.; DUNLOP, W.; ROBERTS, D.F. - Cytogenetic studies in spontaneous abortuses. **Hum. Genet.**, **66**:77-84, 1984.
- ASHWOOD-SMITH, M.J. - Safety of human sperm selection by flow cytometry. **Human Reprod.**, **9**: 757, 1995.
- AUGER, J.; MESBAH, M.; HUBER, C.; DADOUNE, J.P. - Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. **Int. J. Androl.**, **13**:452-62, 1990.
- BARLOW, P. & VOSA, C.G. - The Y chromosome in human spermatozoa. **Nature (Lond.)**, **226**:961-2, 1970.
- BATZOFIN, J.H. - XY sperm separation for sex selection. **Urol. Clin. North Am.**, **14**:609-18, 1987.

* HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses. São Paulo, BIREME, 1991. 45p.

- BECKETT, T.A.; MARTIN, R.H.; HOAR, D.I. - Assessment of the sephadex technique for selection of X-bearing human sperm by analysis of sperm chromosomes, deoxyribonucleic acid and Y-bodies. **Fertil. Steril.**, **52**:829-35, 1989.
- BEERNINK, F.J. & ERICSON, R.J. - Male sex preselection - through sperm isolation. **Fertil. Steril.**, **36**:421, 1981.
- BEERNINK, F.J. & ERICSON, R.J. - Male sex preselection through sperm isolation. **Fertil. Steril.**, **38**:493-5, 1982.
- BENNETT, D. & BOYSE, E.A. - Sex ratio in progenie in mice inseminated with sperm treated with HY antiserum. **Nature (Lond.)**, **246**:308-9, 1973.
- BHATTACHARYA, B.C.; SHOME, P.; GUNTHER, A.H. - Successful separation of X and Y spermatozoa in human and bull semen. **Int. J. Fertil.**, **22**:30-5, 1977.
- BIBBINS JR., P.E.; LIPSHULTZ, L.I.; WARD JR., J.B.; LEGATOR, M.S. - Fluorescent body distribution in spermatozoa in the male with exclusively female offspring. **Fertil. Steril.**, **49**:670-5, 1988.
- BIBBINS JR., P.E.; HOKANSON, J.A.; WARD JR., J.B.; LEGATOR, M.S.; LIPSHULTZ, L.I. - Incidence of sperm with two fluorescent bodies in men with impaired fertility. **Fertil. Steril.**, **57**:402-8, 1992.
- BISHOP, D.W. - X- and Y- spermatozoa. **Nature (Lond)**, **187**:255-6, 1960.
- BLUMBERG, B.D.; GOLBUS, M.S.; HANSON, K.H. - The psychological sequelae of abortion performed for a genetic indication. **Am. J. Obstet. Gynaecol.**, **122**:799-808, 1975.
- BRANDRIFF, B.F.; GORDON, L.A.; HAENDEL, S.; ASHWORTH, L.K.; CARRANO, A.V. - The chromosomal constitution of human sperm selected for motility. **Fertil. Steril.**, **46**:686-90, 1986a.

- BRANDRIFF, B.F.; GORDON, L.A.; HAENDEL, S.; SINGER, S.; MOORE, D.H.; GLEDHILL, B.L. - Sex chromosome ratios determined by karyotypic analysis in albumin-isolated human sperm. **Fertil. Steril.**, **46**:678-85, 1986b.
- BREWER, C. - Induced abortion after feeling fetal movements: its causes and emotional consequences. **J. Biosoc. Sci.**, **10**:203-8, 1978.
- BROER, K.H.; WINKHAUS, I.; SOMBROEK, H.; KAISER, R. - Frequency of Y-chromatin bearing spermatozoa in intracervical and intrauterine postcoital tests. **Int. J. Fertil.**, **21**:181-5, 1976.
- CARSON, S.A. - Sex selection: the ultimate in family planning. **Fertil. Steril.**, **50**:16-9, 1988.
- CARTER, C.O. - Genetic counseling and prenatal diagnosis for conditions other than chromosomal anomalies. In: BOUÉ, A., ed. - **Prenatal diagnosis**. Paris, INSERM, 1976. p. 17-22.
- CHAUDHURI, J.P. & SCHILL, W.-B. - A possibility of unbiased sex preselection in humans by enrichment of X and Y chromosome bearing spermatozoa. **Andrologia**, **19**:157-60, 1987.
- CLAASENS, W.; STANDER, F.S.H.; KRUGER, T.F.; MENKVELD, R.; LOMBARD, C.J. - Wash and swim up method of spermatozoa preparation and sex selection. In: ACOSTA, A.A.; SWANSON, J.J.; ACKERMAN, S.B.; KRUGER, T.F.; VAN ZYL, J.A.; MENKVELD, R., eds. - **Human spermatozoa in assisted reproduction**. Baltimore, WILLIAMS & WILKINS, 1990, p.144-8.
- CRAN, D.G.; JOHNSON, L.A.; MILLER, N.G.A.; COCHRANE, D.; POLGE, C. - Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm an *in vitro* fertilization. **Vet. Rec.**, **132**:40-1, 1993.
- DAVID, G.; JEULIN, C.; BOYCE, A.; SCHWARTZ, D. - Motility and percentage of Y- and YY-bearing spermatozoa in human semen samples after passage through bovine serum albumin. **J. Reprod. Fertil.**, **50**:377-9, 1977.

- DIASIO, R.B. & GLASS, R.H. - Effects of pH on the migration of X and Y sperm. **Fertil. Steril.**, **22**:203, 1971.
- DMOWSKI, W.P.; GAYNOR, L.; RAO, R.; LAWRENCE, M.; SCOMMEGNA, A. - Use of albumin gradients for X and Y sperm separation and clinical experience with male sex preselection. **Fertil. Steril.**, **31**:52-7, 1979.
- DOWNING, D. & BLACK, D.L. - Equality in survival of X and Y chromosome-bearing human spermatozoa. **Fertil. Steril.**, **27**:1191-3, 1976.
- EDWARDS, K.S. - Reproduction technology - A guide to what's available in Ohio. **Ohio Medicine**, **March**:183-93, 1988.
- EGWUATU, V.E. - The sex ratio of Igbo births. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, **22**:399, 1984.
- ENGELMANN, N.U.; RASSRIGG, F.; SCHATZ, H.; SCHILL, W.B. - Separation of human X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis. **Gamete Res.**, **19**:151-9, 1988.
- ENGELMANN, N.U.; PARSCH, E.-M.; SCHILL, W.B. - Modern techniques of sperm preparation - Do they influence the sex of offspring? **Andrologia**, **21**:523-8, 1989.
- ERICKSON, J.D. - The secondary sex ratio in the United States, 1969-1971: association with race, parental age, birth order, paternal education and legitimacy. **Ann. Hum. Genet.**, **40**:205, 1976.
- ERICSON, R.J.; LANGEVIN, C.N.; NISHINO, M. - Isolation of fractions rich in human Y sperm. **Nature**, **246**:421-4, 1973.
- ERICSON, R.J. - Validity of X and Y sperm separation techniques? **Fertil. Steril.**, **62**:1286-7, 1994. [letter]

- EVANS, M.I.; DRUGAN, A.; BOTTOMS, S.F. - Attitudes on the ethics of abortion, sex selection, and selective pregnancy termination among health care professionals, ethicists, and clergy likely to encounter such situations. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **164**:1092-9, 1991.
- FLAHERTY, S.P. & MATTHEWS, C.D. - Reply of the authors. **Fertil. Steril.**, **61**:1181-2, 1994. [letter]
- FRANCE, J.T.; GRAHAM, F.M.; GOSLING, L.; HAIR, P.I. - A prospective study of the preselection of the sex of offspring by timing intercourse relative to ovulation. **Fertil. Steril.**, **4**:894-900, 1984.
- FULGHAM, D.L. & ALEXANDER, N.J. - Manipulation of semen for sex preselection. In: ACOSTA, A.A.; SWANSON, J.J.; ACKERMAN, S.B.; KRUGER, T.F.; VAN ZYL, J.A.; MENKVELD, R., eds. - **Human spermatozoa in assisted reproduction**. Baltimore, WILLIAMS & WILKINS, 1990. p. 233-8.
- GEIER, M.R.; YOUNG, J.L.; KESSLER, D. - Too much or too little science in sex selection techniques? **Fertil. Steril.**, **5**:1111-2, 1990. [letter]
- GLASS, R.H. - Sex preselection. **Obstet. Gynecol.**, **49**:122-6, 1976.
- GLEDHILL, B.L.; LAKE, S.; STEINMERTZ, L.L.; GRAY, J.W.; CRAWFORD, J.R.; DEAN, P.N.; VAN DILLA, M.A. - Flow microfluorimetric analysis of sperm DNA content: effect of cell shape on the fluorescence distribution. **J. Cell Physiol.**, **87**:367-76, 1976.
- GLEDHILL, B.L. - Control of mammalian sex ratio by sexing sperm. **Fertil. Steril.**, **40**:572-4, 1983.
- GOODALL, H. & ROBERTS, A.M. - Differences in motility of human X and Y bearing spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, **48**:433-6, 1976.
- GRAY, R.H. - Natural family planning and sex selection: fact or fiction ? **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **165**:1982-4, 1991.

- GUERRERO, R. - Association of the type and time of insemination within the menstrual cycle with the human sex ratio at birth. **N. Engl. J. Med.**, **291**:1056-9, 1974.
- GUTTENBACH, M. & SCHMID, M. - Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive *in situ* hybridization. **Am. J. Hum. Genet.**, **46**:553-8, 1990.
- HAN, T.L.; FLAHERTY, S.P.; FORD, J.H.; MATTHEWS, C.D. - Detection of X- and Y-bearing human spermatozoa after motile sperm isolation by swim up. **Fertil. Steril.**, **60**:1046-51, 1993.
- HANCOCK, R.J.T. - Comparison of effects of normal rabbit sera and anti-cock sperm sera on rabbit sperm, including comparison of effects on the sex ratio. **Biol. Reprod.**, **18**:510-5, 1978.
- HANDYSIDE, A.H.; PATTINSON, J.K.; PENKETH, R.J.A.; DELHANTY, J.D.A.; WINSTON, RML; TUDDENHAM, E.G.D. - Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. **Lancet**, **18**:347-9, 1989.
- HARLAP, S.M.B. - Gender of infants conceived on different days of the menstrual cycle. **N. Engl. J. Med.**, **300**:1445-8, 1979.
- HEWITT, J. - Preconceptional sex selection. **Brit. J. Hosp. Med**, **37**:149-55, 1987.
- HIGHLAND, H.N.; RAO, M.V.; CHINYOY, N.J.; SHAH, V.C. - Analysis of the functional and nuclear integrity of human spermatozoa. **Int. J. Fertil**, **36**:43-7, 1991.
- HOPPE, P.C. & KOO, G.C. - Reacting mouse sperm with monoclonal H-Y antibodies does not influence sex ratio of eggs fertilized *in vitro*. **J. Reprod. Immunol.**, **6**:1, 1984.
- IBRAHIM, M.E.; MOUSSA, M.A.A.; PEDERSEN, H. - Sperm chromatin heterogeneity as an infertility factor. **Arch. Androl.**, **21**:129-33, 1988.

- IIZUKA, R.; KANEKO, S.; AOKI, R.; KOBAYASHI, T. - Sexing of human sperm by discontinuous Percoll density gradient and its clinical application. **Hum. Reprod.**, **2**:573-5, 1987.
- IRIANNI, F.; ACOSTA, A.A.; OEHNINGER, S.; ACOSTA, M.R. - Evaluation and preparation of spermatozoa for intrauterine insemination. In: ACOSTA, A.A.; SWANSON, J.J.; ACKERMAN, S.B.; KRUGER, T.F.; VAN ZYL, J.A.; MENKVELD, R., eds. - **Human spermatozoa in assisted reproduction**. Baltimore, WILLIAMS & WILKINS, 1990. p. 225-33.
- ISHIJIMA, S.A.; OKUNO, M.; ODAGIRI, H.; MOHRI, T.; MOHRI, H. - Separation of X- and Y- bearing murine sperm by free flow eletrophoresis: evaluation of separation using PCR. **Zool. Sci.**, **9**:601-6, 1992.
- JAFFE, S.B.; JEWELWICZ, R.; WAHL, E.; KHATAMEE, M.A. - A controlled study for gender selection. **Fertil. Steril.**, **56**:254-8, 1991.
- JAMES, W.H. & ROSTRON, J. - Parental age, parity and sex ratio in births in England and Wales, 1968-1977. **J. Biosoc. Sci.**, **17**:47, 1985.
- JAMES, W.H. - The sex ratio of oriental births. **Ann. Hum. Biol.**, **12**:485, 1985a.
- JAMES, W.H. - The sex ratio of infants born after hormonal induction of ovulation. **Brit. J. Obstet. Gynaecol.**, **92**:299-301, 1985b.
- JAMES, W.H. - Sex ratio of offspring and the cause of placental pathology. **Human Reprod.**, **10**: 1403-6, 1995.
- JOHNSON, L.A.; FLOOK, J.P.; HAWK, H.W. - Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. **Biol. Rep.**, **41**:199-203, 1989.
- JOHNSON, L.A. - Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow X- and Y- bearing sperm. **Reprod. Dom. Am.**, **26**:309-14, 1991.

- JOHNSON, L.A. - Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. **J. Animal Sci. (suppl)**, 1992. 40p.
- JOHNSON, L.A.; WELCH, G.R.; KEYVANFAR, K.; DORFMANN, A.; FUGGER, E.F.; SCHUMANN, J.D. - Gender preselection in humans ? Flow cytometric separation of X and Y sperm for the prevention of X linked diseases. **Hum. Reprod.**, **8**:1733-9, 1993.
- KAISER, K.; BROEER, K.H.; CITOLER, P.; LEISTER, B. - Penetration of spermatozoa with Y chromosome in cervical mucus by an *in vitro* test. **Geburtshilfe Frauenheild**, **34**:426, 1974.
- KALAÇA, C. & AKIN, A. - The issue of sex selection in Turkey. **Human Reprod.**, **10**: 1631-2, 1995.
- KAMIGUSHI, Y. & MIKANO, K. - An improved, efficient method for analysing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. **Am. J. Genet.**, **38**:724, 1986.
- KANEKO, R.; YAMAGUCHI, J.; KOBAYASHI, T.; IIZUKA, R. - Separation of human X- and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. **Fertil. Steril.**, **40**:661-5, 1983a.
- KANEKO, R.; YAMIGUSHI, N.; KOBAYASHI, T.; IIZUKA, R. - Separation of human X- and Y-bearing sperm using free-flow electrophoresis. **Proc. Jpn. Acad.**, **59**:276-9, 1983b.
- KHATAMEE, M.A.; LEINBERGER-SICA, A.; MATOS, P. - Sex preselection in New York city: who chooses which sex and why. **Int. J. Fertil.**, **34**:353-4, 1989.
- KOO, G.C.; STACKPOLE, C.W.; BOYSE, E.A.; HAMARLING, V.; DARDIS, M.P. - Topographical location of HY antigen on mouse spermatozoa by immunoelectron - microscopy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **70**:1502, 1973.

- KOVACS, G.T. & WALDRON, K. - Sex preselection - a review. **Aust. Fam. Physician**, **16**:608-13, 1987.
- KRUGER, T.F.; MENKVELD, R.; STANDER, F.S.H.; LOMBARD, C.J.; VAN DER MERWE, J.P.; VAN ZYL, J.A.; SMITH, K. - Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. **Ferti. Steril.**, **46**: 1118-23, 1986.
- LANG, J.L. - Alteration of sex ratio at conception. **Chemtech.**, **3**:190-2, 1973.
- LIU, D.Y. & BAKER, H.M.G. - Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates *in vitro*. **Fertil. Steril.**, **58**:1178-84, 1992.
- LEVINSON, G.; KEYVANFAR, K.; WU, J.C.; FUGGER, E.R.; FIELDS, R.A.; HARTON, G.L.; PALMER, F.T.; SISSON, M.E.; STARR, K.M.; DENNISON-LAGOS, L.; CALVO, L.; SHERINS, R.J.; BICK, D.; SCHULMAN, J.D.; BLACK, S.H. - DNA-based X-enriched sperm separation as an adjuvant to preimplantation genetic testing for the prevention of X-linked disease. **Human Reprod.**, **10**: 979-82, 1995.
- LOBEL, S.M.; POMPONIO, R.J.; MUTTER, G.L. - The sex ratio of normal and manipulated human sperm quantitated by the polymerase chain reaction. **Fertil. Steril.**, **59**:387-92, 1993.
- LUBS, HA - X-linked mental retardation and the marker X. In: EMERY, AEH & RIMOIN, DL eds - **Medical and Practice of Medical Genetics**. Churchill Livingstone, London, New York, 1983, p 216-23.
- LYSTER, W.R. - Three patterns of seasonality in America births. **Am. J. Obstet. Gynaecol.**, **110**:1025, 1971.
- MARTIN, R.H.; BALKAN, W.; BURNS, K; RADEMAKER, A.W.; LIN, C.C.; RUDD, N.L. - The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa. **Hum. Genet.**, **63**:305-9, 1983.

- MARTIN, R.H. & RADEMAKER, A.W. - A study of paternal age and sex ratio in sperm chromosome complements. **Hum. Hered.**, 42:333-6, 1992.
- MARTIN, R.H. & RADEMAKER, A.W. - The effect of age on the frequency of sperm chromosomal abnormalities in normal men. **Am. J. Hum. Genet.**, 41:484-92, 1987.
- McCOSHEN, J.A.; CHEN, J.; WODZICKI, A.; TAYLOR, P.; FERNANDES, P.A. - Y body association with morphologic heterogeneity of human sperm. **Int. J. Fertil.**, 39:114-9, 1994.
- McKUSICK, V.A. - X-linked phenotypes. In: McKUSICK, V.A., ed. - **Mendelian inheritance in man - Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes**. Johns Hopkins University Press, Baltimore - London. 3rd edition, 1992. p.1867-1981.
- MOORE, D.H. & GLEDHILL, B.L. - How large should my study be so that I can detect an altered sex ratio ? **Fertil. Steril.**, 50:21-5, 1988.
- MORRELL, J.M.; KEELER, K.D.; NOAKES, D.E.; MACKENZIE, N.M.; DRESSER, D.M. - Sexing of sperm by flow cytometry. **Veter. Rec.**, 122:322-4, 1988.
- MORUZZI, J.F. - Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, 57:319-23, 1979.
- MRC - Working party on children conceived by *in vitro* fertilization - Births in Great Britain resulting from assisted conception, 1978-1987. **B.M.J.**, 300:1229-33, 1990.
- MUNNÉ, S.; ROSENWAKS, Z.; TANG, Y.X.; COHEN, J.; GRIFO, J. - Sex determination of human embryos using the polymerase chain reaction and confirmation by fluorescence in situ hybridization. **Fertil. Steril.**, 61:111-7, 1994.
- MUNNÉ, S. - Flow cytometry separation of X and Y spermatozoa could be detrimental for human embryos. **Human Reprod.**, 9: 758, 1995.

- OSATHANONDH, V.; CHINSOMBOON, S.; NUTTHARIT, P.; SUDSAM, A. - Isolation of fractions rich in Y sperm by means of differential motility using hen's egg yolk as the medium: A preliminary report. **J. Med. Assoc. Thai.**, 71 (suppl):34-7, 1988.
- PARD, M.; BARNI, P.N.; BANCELLS, M.; COROLEN, B.; BRUXADERAS, C.; POLMEROL JR., J.M.; SABATA, J. - Spermatozoa selection in discontinuous Percoll gradients for use in artificial insemination. **Fertil. Steril.**, 49:505-7, 1988.
- PAWLOWITZKY, I.H. & PEARSON, P.L. - Chromosomal aneuploidy in human spermatozoa. **Humangenetik**, 16:119-22, 1972.
- PEARSON, P.L.; BOBROW, M.; VOSA, C.G. - Technique for identifying Y chromosomes human interphase nuclei. **Nature (London)**, 226:78-80, 1970.
- PEARSON, P.L. - The use of new staining techniques for human chromosome identification. **J. Med. Genet.**, 9:264, 1972.
- PELLESTOR, F. - Fréquences et distributions de l'aneuploïdie dans les gamètes humains: différences en fonction du sexe. **Ann. Génét.**, 34:70-5, 1991.
- PINKEL, D.; GARNER, D.L.; GLEDHILL, B.L.; VAN DILLA, M.A.; STEPHESON, D.; JOHNSON, L.A. - Flow cytometric determination of the proportion of X and Y chromosome bearing spermatozoa in samples of purportedly separated bull sperm. **J. Anim. Sci.**, 60:1303-7, 1985.
- REHAN, N.E. - Sex ratio of live born Hansa infants. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, 89:136, 1982.
- RHODE, W.; PORSTMANN, T.; DORNER, G. - Migration of Y bearing spermatozoa in cervical mucus. **J. Reprod. Fertil.**, 33:157, 1973.
- ROSS, A.; ROBINSON, J.A.; EVANS, H.J. - Failure to confirm separation of X- and Y- bearing human spermatozoa using BSA gradients. **Nature (London)**, 253:354-5, 1975.

- ROTHSCHILD, L. - X- and Y- spermatozoa. **Nature (Lond)**, **187**:253-4, 1960.
- RUBIN, E. - The sex ratio at birth. **Am. Stat.**, **21**:45, 1967.
- RUDAK, E.; JACOBS, P.A.; YANAGIMASHI, R. - Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. **Nature**, **274**:911, 1978.
- RUFAT, P.; DEHAN, M.; OLIVENNES, F.; FRYDMAN, R.; DE MOUZON, J. - Task force report on the outcome of pregnancies and children conceived by *in vitro* fertilization (France:1987-1989). **Fertil. Steril.**, **61**:324-31, 1994.
- SARKAR, S. - Motility, expression of surface antigen, and X and Y human sperm separation in *in vitro* fertilization medium. **Fertil. Steril.**, **42**:899-905, 1984.
- SEIDELL, J.C.; CIGOLINI, M.; CHARZEWSKA, N.; SEIBEL, S.H.G. - Androgenicity in relation to body distribution. **J. Clin. Epidemiol.**, **43**: 21-34, 1990.
- SHETTLES, L.B. - Nuclear structure of human spermatozoa. **Nature (London)**, **188**:918-9, 1960.
- SHETTLES, L.B. - Human spermatozoa shape in relation to sex ratios. **Fertil. Steril.**, **12**:502-8, 1961.
- SHETTLES, L.B. - Factors influencing sex ratios. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, **8**:643-7, 1970.
- SHETTLES, L.B. - Separation of X and Y spermatozoa. **J. Urol.**, **116**:462-4, 1976.
- SIMCOCK, B.W. - Sons and daughters - a sex preselection study. **Med. J. Aust.**, **142**:541, 1985.
- STOKOWSKY, J. & LORRAINS, J. - Preconceptual selection of fetal sex. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, **18**:440, 1980.

- SUMNER, A.T.; ROBINSON, J.A.; EVANS, H.J. - Distinguishing between X,Y and YY-bearing human spermatozoa by fluorescence and DNA content. **Nature (New Biol.)**, **229**:231-3, 1971.
- SUMNER, A.T. & ROBINSON, J.A. - A difference in dry mass between the heads of X- and Y-bearing human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, **48**:9-15, 1976.
- SZILARD, L. - Dependence of the sex ratio at birth on the age of the father. **Nature**, **185**:649, 1960.
- TEJADA, R.I.; MITCHELL, M.S.; NORMAN, A. - A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertil. Steril.**, **42**:87-91, 1984.
- THOMSEN, J.L. & NIEBUHR, E. - The frequency of false-positive and false-negative results in the detection of Y-chromosomes in interphase nuclei. **Hum. Genet.**, **73**:27-30, 1986.
- VAN DUIJN, C. - Nuclear structure of human spermatozoa. **Nature (Lond)**, **188**:916-8, 1960.
- VAN KOOIJ, R.J. & VAN OOST, B.A. - Determination of sex ratio of spermatozoa with a deoxyribonucleic acid-probe and quinacrine staining: a comparison. **Fertil. Steril.**, **58**:384-6, 1992.
- VAN STEIRTEGHEM, A.C.; PADOS, G.; DEVROEY, P.; BONDUELLE, M.; VAN ASSCHE, E.V.; LIEBAERS, I. - Oocyte donation for genetic indications. **Reprod. Fertil. Dev.**, **4**:681-8, 1992.
- VEIT, C.R. & JEWELWICZ, R. - Gender preselection: facts and myths. **Fertil. Steril.**, **49**:937-40, 1988.
- VOSA, C.G. - Heterochromatin recognition with fluorochromes. **Chromosoma (Berl.)**, **30**:366-72, 1970.

- WANG, H.-X.; FLAHERTY, S.P.; SWANN, N.J.; MATTHEWS, C.D. - Assessment of the separation of X- and Y-bearing sperm on albumin gradients using double-label fluorescence in situ hybridization. **Fertil. Steril.**, 61:720-6, 1994.
- WERTZ, D.C. & FLETCHER, J.C. - Ethics and medical genetics in the United States: A national survey. **Am. J. Med. Gen.**, 29:815-27, 1988.
- WILLIANSO, N.E.; LEAN, T.H.; VENGADASALAM, D. - Evaluation of an unsuccessful sex preselection clinic in Singapore. **J. Biosoc. Sci.**, 10:375-88, 1978.
- WINDSOR, D.P.; EVANS, G.; WHITE, I.G. - Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: a review. **Reprod. Fertil. Dev.**, 5:155-71, 1993.
- WINGATE, M.B. - The sex ratio of mid-trimester abortions. **J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth**, 73: 296-8, 1966.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. A prospective multicentre study of the ovulation method of natural family planning IV. The outcome of pregnancy. **Fertil. Steril.**, 41:593-8, 1984.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 1987. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 2nd Ed., Great Britain. Cambridge University Press.
- YAMAMOTO, M.R.; FUJIMORI, T.; ITO, K.; KANIMURA, K.; WATONABE, G.I. - Chromosomes studies in 500 induced abortions. **Hum. Genet.**, 29:9-14, 1975.
- YANAGIMASHI, R.; NODA, D.; FUJIMOTO, M.; NICHOLSON, G.L. - The distribution of negative surface charges on mammalian spermatozoa. **Am. J. Anat.**, 135:497-520, 1972.

ZARUTSKIE, P.; MULLER, C.H.; MAGONE, M.; SOULES, M.R. - The clinical relevance of sex selection techniques. **Fertil. Steril.**, **52**:891-905, 1989.

ZECH, L. - Investigation of metaphase chromosomes with DNA-binding fluorochromes. **Exp. Cell Res.**, **58**:463, 1969.