

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO



**GISELE DOS SANTOS PESSANHA DA CUNHA**

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE SEPARAÇÃO MAGNÉTICA CELULAR PARA  
SELEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES E IMPLEMENTAÇÃO NO CENTRO DE  
INFERTILIDADE E MEDICINA FETAL DO NORTE FLUMINENSE.**

RIO DE JANEIRO

2020

**GISELE DOS SANTOS PESSANHA DA CUNHA**

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE SEPARAÇÃO MAGNÉTICA CELULAR PARA  
SELEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES E IMPLEMENTAÇÃO NO CENTRO DE  
INFERTILIDADE E MEDICINA FETAL DO NORTE FLUMINENSE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação - stricto sensu - Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Formação para a Pesquisa Biomédica.

Orientador: Tânia Maria Ruffoni Ortiga  
Co-orientador: Francisco A. Colucci Coelho

RIO DE JANEIRO

2020

## FICHA CATALOGRÁFICA

Cunha, Gisele dos Santos Pessanha.

Avaliação da técnica de separação magnética celular para seleção de espermatozoides e implementação no Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do Norte Fluminense. / Gisele dos Santos Pessanha Cunha. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2020.

63 f.: il.; 30 cm.

Orientadores: Tania Maria Ruffoni Ortiga; Francisco A. Colluci Coelho.

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica, 2020.

Referências: f. 48-59.

1. Espermatozoides. 2. Sêmen. 3. Espermatogênese. 4. Separação Celular. 5. Separação Magnética. 6. Infertilidade Masculina. Formação para a Pesquisa Biomédica - Tese. I. Ortiga, Tania Maria Ruffoni. II. Coelho, Francisco A. Colluci. III. UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe do Setor de Referência da Biblioteca Central do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

"AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE SEPARAÇÃO MAGNÉTICA CELULAR PARA SELEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES E IMPLEMENTAÇÃO NO CENTRO DE INFERTILIDADE E MEDICINA FETAL DO NORTE FLUMINENSE".

**GISELE DOS SANTOS PESSANHA DA CUNHA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.**

APROVADA POR:

Rio de Janeiro, 25 de maio de 2020.



---

DR. RONALDO DA SILVA MOHANA BORGES (DOUTOR – UFRJ) (COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA)



---

DRA. TANIA MARIA RUFONNI ORTIGA (DOUTORA – UFRJ) – ORIENTADORA

Assinado de forma digital por: FRANCISCO AUGUSTO COLUCCI COELHO: 0839851715  
Dados: 2020.09.30 11:33:59 - 03'00'

---

DR. FRANCISCO AUGUSTO COLUCCI COELHO (DOUTOR – FAC. DE MEDICINA DE CAMPOS) – 2º ORIENTADOR



---

DRA. MARIANA BOECHAT DE ABREU (DOUTORA – UFRJ) – REVISORA



Elisa Melo Ferreira  
CRM-RJ 5225560-8

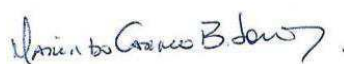
---

DRA. ELISA MELO FERREIRA (DOUTORA – FADIPA)



---

DRA. LUCIANA MOISÉS CAMILO (DOUTORA – UFRJ)



Maria do Carmo B. Souza  
Médica  
CRM-RJ 5225560-8

---

DRA. MARIA DO CARMO BORGES DE SOUZA (DOUTORA – UFRJ)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe por sempre acreditar em mim e por ter abdicado de sua vida em prol das realizações e da felicidade de seus filhos e ao meu irmão pelo seu carinho e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela dádiva da vida e por me dar saúde, força e sabedoria para superar as dificuldades, e por me permitir realizar tantos sonhos durante essa trajetória. Obrigada por me permitir errar, aprender e crescer, e por estar ao meu lado não permitindo que desistisse.

À minha mãe deixo um agradecimento especial, por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, dedicação, compreensão. Sinto-me orgulhosa e privilegiada por ser sua filha. E ao meu irmão que está sempre pronto a me apoiar em tudo nesta vida.

À Dra. Tânia Ortiga e ao Dr. Francisco Colucci pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação, por todo tempo despendido, pela paciência e por acreditarem em mim.

Agradeço aos Diretores do Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do NF, por me permitirem realizar a pesquisa no laboratório e pelo apoio financeiro durante todo o mestrado.

Agradeço também as minhas colegas de trabalho, em especial a Lilian, pelo incentivo e auxílio durante todo o mestrado.

As minhas amigas de turma do mestrado, seis guerreiras, obrigada pelo convívio, amizade e apoio durante essa caminhada.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

Assim como você não conhece o caminho do vento, nem como o corpo é formado no ventre de uma mulher, também não pode compreender as obras de Deus, o Criador de todas as coisas!

Eclesiastes 11:5

## RESUMO

CUNHA, Gisele dos Santos Pessanha. **Avaliação da técnica de separação magnética celular para seleção de espermatozoides e implementação no Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do Norte Fluminense**. Rio de Janeiro, 2020. Dissertação (Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

**Introdução:** As técnicas de reprodução assistida atualmente têm um papel importante na gestão de infertilidade. A possibilidade de selecionar espermatozoides com DNA danificado, para ser utilizado durante essas técnicas vem despertando grande interesse e preocupação da comunidade científica. Atualmente, vários métodos para selecionar espermatozoides de melhor qualidade são estudados. O uso da técnica de separação celular magnética-Anexina V (MACS) vem sendo estudado como um método não invasivo para reduzir os níveis elevados de espermatozoides com DNA danificado. **Objetivo:** Avaliar a técnica de separação magnética para selecionar espermatozoides e implementar seu uso na rotina do laboratório de Reprodução Humana Assistida do Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do NF. **Métodos:** Participaram deste estudo 40 pacientes do Serviço de Medicina Reprodutiva do Hospital Escola Álvaro Alvin/Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do Norte Fluminense, no período de maio de 2018 a janeiro de 2020. Os pacientes que cumpriram os critérios de inclusão do estudo foram divididos em 2 grupos de forma randomizada, sendo o grupo controle (G1) sem aplicação da técnica MACS e grupo (G2) utilizando a técnica MACS. **Resultados:** Observamos diminuição considerável na contagem de espermatozoides com DNA fragmentado no grupo G2, apresentando 38,5% de fragmentação inicial em oposição a 11,27% após o uso da técnica MACS ( $P < 0,05$ ). **Conclusão:** A técnica de separação magnética celular mostrou que, de fato, combinada com a técnica de processamento seminal swim-up é eficaz na redução do índice de fragmentação do DNA espermático e aplicável à prática clínica.

**Palavras-chave:** infertilidade masculina, espermatogênese, swim-up, separação celular magnética (MACS).



## ABSTRACT

CUNHA, Gisele dos Santos Pessanha. **Evaluation of the magnetic cell selection technique for sperm selection and implementation at the Norte Fluminense Infertility and Fetal Medicine Center.** Rio de Janeiro, 2020. Dissertation (Professional master's in training for biomedical research) - Biophysics Institute Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, 2020.

**Introduction:** Assisted reproduction techniques currently play an important role in infertility management. The possibility of selecting sperm, with damaged DNA, to be used during these techniques has aroused great interest and concern in the scientific community. Currently, several methods for selecting better quality sperm have been studied. The use of the Magnetic Cell Separation-Annexin V technique has been studied as a non-invasive method to reduce high levels of sperm with damaged DNA.

**Objective:** To evaluate the technique of magnetic separation to select sperm and implement its use in the routine of the Assisted Human Reproduction laboratory of Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do NF. **Methods:** 40 patients from the Reproductive Medicine Service of Hospital Escola Álvaro Alvin / Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do NF participated in this study, from May 2018 to January 2020. Patients were randomly divided into 2 groups, with the control group (G1) without applying the MACS technique and the experiment group (G2) using the technique. **Results:** We observed a considerable decrease in fragmentation in the G2 group, with 38.5% of initial fragmentation as opposed to 11.27% after the MACS technique ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The technique of magnetic cell separation showed that, in fact, combined with the seminal swim-up processing technique, it is effective in reducing the sperm DNA fragmentation index and applicable to clinical practice.

**Keywords:** male infertility, spermatogenesis, swim-up, magnetic cell separation (MACS).

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CI	– Contagem de Espermatozoides
CA	– Número de Espermatozoides Apoptóticos
CIM	– Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do Norte Fluminense
COMET	– Ensaio de Eletroforese em Gel Célula Única
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
dutp	– Nucleotídeos Deoxiuridina Trifosfatados
FITC	– Isocianato de Fluoresceína
FIV	– Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	– Hormônio Folículo Estimulante
HTF	– Fluído da tuba humana
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICSI	– Microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides
IMC	– Índice de massa corpórea
ISCA	– Infertilidade sem causa aparente
LH	– Hormônio luteinizante
MACS	– Separação Celular Magnética (do inglês, <i>magnetic-activated cell sorting</i> )
OMS	– Organização Mundial de Saúde
PS	– Fosfatidilserina (do inglês <i>Phosphatidylserine</i> )
RA	– Reprodução Assistida

RDC	– Resolução da diretoria colegiada
ROS	- Espécies Reativas de Oxigênio
SCSA	- Ensaio da Estrutura da Cromatina Espermiática
SDF	– Índice de Fragmentação do DNA Espermiático
TCLE	– Termo de consentimento livre e esclarecido
TRA	– Técnicas de reprodução assistida
VA	– Volume da Amostra
WHO	– Organização Mundial de Saúde

## LISTA DE FIGURAS

<b><u>Figura 1.</u></b> Esquema anatômico espermatozoide.....	17
<b><u>Figura2.</u></b> Espermatogênese.....	19
<b><u>Figura 3.</u></b> Esquema ligação anexina V e fosfatidilserina.....	25
<b><u>Figura 4.</u></b> Esquema Separação celular magnética (MACS).....	26
<b><u>Figura 5.</u></b> Esquema técnica centrifugação por gradiente de densidade.....	27
<b><u>Figura 6.</u></b> Esquema técnica swim-up.....	28
<b><u>Figura 7</u></b> Desenho do estudo.....	30
<b><u>Figura 8.</u></b> Lâmina de halosperm.....	32
<b><u>Figura 9.</u></b> <i>Boxplot</i> dos dados de concentração espermática.....	36
<b><u>Figura 10.</u></b> Porcentagem de participantes de cada grupo de estudo que relatou exposição aos diversos fatores ambientais e/ou hábitos de vida que afetam fragmentação do DNA espermático.....	38
<b><u>Figura 11.</u></b> Índice de fragmentação do DNA espermático do grupo 1 e do grupo 2 após a separação molecular magnética. **** Demonstra diferença altamente estatística. ( $p < 0.0001$ ).....	40

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Valor de P obtidos pelos testes para distribuição normal (D'Agostino & Pearson) e homogeneidade das variâncias (teste *F*).....35

**Tabela 2.** Perfil e parâmetros seminais dos participantes selecionados para o estudo.....37

**Tabela 3.** Fragmentação do DNA espermático (porcentagem) do grupo 2 antes e após a separação celular magnética.....39

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 Espermatozoide.....	16
1.2 Espermatogênese.....	17
1.3 DNA espermático.....	20
<u>1.3.1 Espécies Reativas de Oxigênio</u> .....	20
<u>1.3.2 Empacotamento da Cromatina Espermática</u> .....	20
<u>1.3.3 Apoptose</u> .....	21
1.4 Fragmentação do DNA espermático e infertilidade masculina.....	22
1.5 Fragmentação do DNA espermático e perda gestacional.....	23
1.6 Separação Celular Magnética (MACS AnexinaV).....	24
1.7 Técnicas de Preparação Espermática.....	26
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>3. OBJETIVO</b> .....	28
3.1 Objetivos Específicos .....	29
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
4.1 Desenho de Estudo.....	29
4.2 Avaliação da qualidade de vida dos participantes.....	31
4.3 Análise Seminal.....	31
4.4 Análise do Índice de Fragmentação do DNA espermático.....	31
4.5 Preparo do sêmen para separação celular magnética MACS- Anexina V.....	33
<u>4.5.1 Processamento Seminal: Swim-up</u> .....	33
<u>4.5.2 Cálculo espermatozoides apoptóticos</u> .....	33
<u>4.5.3 Preparo da coluna</u> .....	34
4.6 Análise Estatística.....	35
<b>5. RESULTADOS</b> .....	36
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	46
<b>8. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	46

<b>9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>.58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A infertilidade é um problema de saúde pública que acompanha, de maneira direta, o desenvolvimento social e econômico de uma sociedade. Esse fato pode ser comprovado nos relatórios do censo de 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) que demonstram nítida queda da fecundidade no Brasil (IBGE, 2010). Desde o nascimento do primeiro “bebê de proveta”, o desenvolvimento das técnicas de diagnóstico da infertilidade vem sendo aprimorado, principalmente as que dizem respeito à contribuição do fator masculino na infertilidade. O fato dos espermatozoides poderem ser facilmente estudados, em contraste com o óvulo, durante a fase de diagnóstico, contribui para o avanço rápido de métodos de diagnóstico e/ou tratamento das alterações que envolvem os espermatozoides. Esses estudos resultam em conhecimento e valorização da importância do fator masculino no processo reprodutivo assistido, antes concentrado na mulher. Essa nova abordagem é refletida na epidemiologia da infertilidade: antes, as causas femininas correspondiam à mais da metade das causas descritas, e as causas masculinas à mais ou menos um terço. Hoje, é consenso que ambas dividem, igualmente, a incidência dos problemas associados à infertilidade (RODRIGUEZ, 2010; SIMON, et al.2013).

As técnicas de reprodução assistida (TRA), que incluem a fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), atualmente são as mais usadas para tratamentos de infertilidade. As taxas de sucesso destas técnicas dependem de uma variedade de fatores incluindo a integridade estrutural e funcional dos gametas (SIMOPOULOU, et al, 2016).

O estudo do sêmen humano é realizado através do espermograma, utilizando parâmetros definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a motilidade, concentração e morfologia (EVENSON et al., 1999, WHO, 2010). Metodologias e técnicas atuais empregadas no campo da andrologia podem ser melhoradas pela adição de novos testes para avaliar e selecionar o sêmen (SPANO, 2003). Vários estudos apontam para o papel do estresse oxidativo no dano do DNA espermático e promoção de apoptose como eventos moleculares independentes ou interligados em homens inférteis, que estão associados a diversas manifestações clínicas e laboratoriais. A incidência de DNA espermático fragmentado no ejaculado humano



está documentado, em particular, nos homens com esperma de qualidade pobre (AGARWAL, 2003). Erros durante o processo de empacotamento da cromatina têm mostrado correlação com resultados reprodutivos negativos: diminuição da fertilidade dos casais após a relação sexual, taxa de fertilização baixa após FIV e ICSI, desenvolvimento de embriões com alterações genéticas e maior incidência de aborto (AGARWAL, 2003).

O risco de selecionar espermatozoides, com DNA danificado, para ser utilizado durante a ICSI vem despertando grande interesse e preocupação da comunidade científica. Essa preocupação se deve às consequências na qualidade dos embriões, nos resultados dos tratamentos de fertilização assistida e nos fetos resultantes (AGARWAL, et al. 2016).

Atualmente, vários métodos de seleção de espermatozoides de melhor qualidade para o uso nas TRA vêm sendo desenvolvidos. Esses métodos de são baseados em diversos fatores, como por exemplo, a utilização de técnicas baseadas na morfologia espermática. A injeção intracitoplasmática de espermatozoides selecionados morfologicamente (IMSI) é uma dessas técnicas e consiste em selecionar e capturar diretamente espermatozoides com baixo número de vacúolos e núcleo morfologicamente normal através de um microscópio com sistema de micromanipulação e um sistema de ampliação de 6300x (PETERSEN et al. 2019; BARTOOV et al. 2002).

Outro tipo de técnica baseada na seleção da membrana externa espermática vem sendo avaliada e utilizada na rotina de laboratórios de RA. Um dos métodos baseados nessa seleção está associado ao ácido hialurônico, um dos principais componentes da matriz extracelular, que envolve o complexo cumulus-oócito (COC) (DANDEKAR et al., 1992) e os espermatozoides que seguem uma espermatogênese e maturação adequada possuem locais de ligação ao ácido (CAYLI et al., 2003; HUSZAR et al., 2006). Diversos estudos com resultados variados mostraram o uso dessa seleção. Nasr-Esfahani e colaboradores em 2008, utilizando placas revestidas com ácido hialurônico observaram uma relação inversa significativa entre a porcentagem de espermatozoides ligados ao ácido e deficiência de protamina, fragmentação do DNA e morfologia anormal dos espermatozoides. Razavi et al. 2010 obtiveram resultados que mostravam que os

espermatozoides recuperados das placas revestidos com ácido possuem o mesmo nível de fragmentação de DNA que os não selecionados (Nasr-Esfahani et al. 2008).

Recentemente, o uso da técnica de separação celular magnética (MACS, do inglês, *magnetic-activated cell sorting*) método baseado na membrana externa, vem sendo estudado como um método não invasivo para reduzir os níveis elevados de espermatozoides em apoptose (GLANDER, 2005). MACS-Anexina V é um procedimento de separação magnética de células que consiste em esferas superparamagnéticas biodegradáveis que separam espermatozoides mortos e apoptóticos, uma vez aplicados sobre uma coluna são expostos a um forte campo magnético. Durante a separação magnética, a fração que é retida e identificada como anexina V positiva, enquanto a fração que corresponde aos espermatozoides não apoptóticos, que eluiu através da coluna é conhecida como anexina V negativa (MILTENY, 1990; GRUNEWALD & PAASCH, 2013).

Esta técnica permite a seleção de uma amostra enriquecida de espermatozoides não-apoptóticos que podem então ser usados para ICSI. A separação magnética dos espermatozoides oferece vantagens tais como: simplicidade de operação, especificidade e sensibilidade proporcionada pela utilização de reagentes imuno-específicos (TROYA & ZORRILLA, 2015).

MACS-Anexina V pode remover eficazmente espermatozoides apoptóticos, no entanto, existem outros componentes no ejaculado, tais como leucócitos e restos de plasma que devem ser removidos. Por conseguinte, existe uma necessidade de combinar com a MACS-Anexina V outras técnicas de preparação, tais como centrifugação em gradiente de densidade e swim-up (TROYA & ZORRILLA, 2015).

## 1.1 Espermatozoide

Os espermatozoides (figura 1), gametas masculinos, são células especializadas que possuem a capacidade de transmitir informação genética.

São anatomicamente constituídos por cabeça e cauda. A cabeça é constituída pelo núcleo e pela vesícula acrossômica, que contém as enzimas hidrolíticas necessárias para o processo de penetração no oócito e na zona

pelúcida, e pelo citoesqueleto. A cauda é constituída por quatro partes: peça de conexão, peça intermediária, local de concentração de mitocôndrias necessárias para produção de energia utilizada durante a corrida até o oócito, peça principal e peça terminal (BUCAR, 2014).

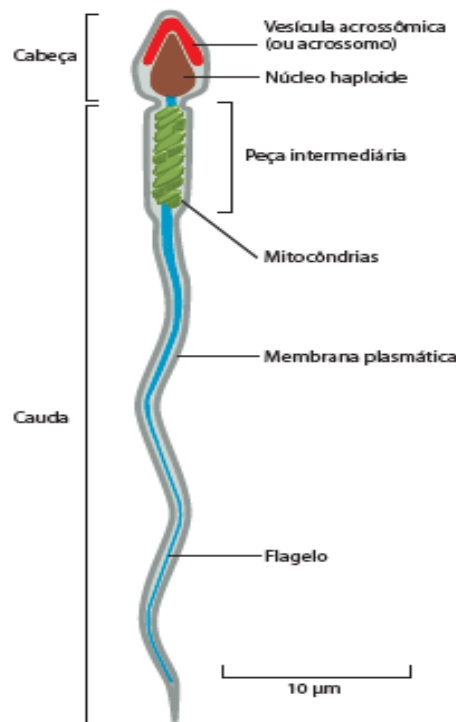


Figura 1: Esquema anatômico espermatozoide. Fonte: Alberts, 5ª edição.

## 1.2 ESPERMATOGÊNESE

A gametogênese masculina denominada espermatogênese, uma sequência de eventos onde há o desenvolvimento dos espermatozoides a partir das células germinativas primordiais, chamadas de espermatogonias, dentro dos túbulos seminíferos (CHOCU et al., 2012; XIAO et al., 2013). Seu início ocorre na puberdade e se dá de maneira continuada e repetida durante toda a vida do homem. Todo o processo, desde a maturação e diferenciação das espermatogonias até a espermiogênese, processo em que milhões de espermatozoides se diferenciam e alcançam maturidade, dura entre 72 e 74 dias (AIRES, 2012).

Os túbulos seminíferos são envolvidos por um tecido conjuntivo que abrigam as células de Leydig que têm como função secretar os hormônios sexuais testosterona e estradiol. Os túbulos seminíferos são associados às células de

Sertoli, essas estão unidas por junções do tipo ocludentes (WEINBAUER et al., 2010). A união das células de Sertoli forma a barreira hemato-testicular que funciona impedindo quer as células do sistema imunológico tenham contato com as células germinais diferenciadas, espermatozoides. (KOPERA et al., 2010). Essas mesmas células possuem outras funções como secretar fatores de crescimento e proteínas que irão estimular o processo de espermatogênese e fagocitar células apoptóticas (WEINBAUER et.al., 2010).

Durante a espermatogênese os espermatozoides que se diferenciam a partir das espermatogonias movimentam-se em direção ao lúmen do túbulo seminífero enquanto amadurecem, após uma série de mitoses seguidas de meiose I e II. Cada espermatogonia dará origem a 4 espermatozoides (AGARWAL, 2012).

O processo de espermatogênese (figura 2) ocorre em três fases: fase proliferativa; fase meiótica, e espermiogênica (CHOCU et al., 2012). Na fase proliferativa, as espermatogonias sofrem uma série de ciclos replicativos do DNA e mitoses. Primeiro, as espermatogônias entram na interfase, ocorrendo o crescimento celular e a síntese de DNA. A fase S é a mais significativa do processo de replicação antes de passar para a fase meiótica. Na fase S do ciclo celular no momento da replicação do DNA há a necessidade de proteger as células germinativas, para manutenção da sobrevivência da espécie, contra altas taxas de mutação (GUNES et al., 2015).

Na fase meiótica, os espermatócitos possuem genoma diplóide que é reduzido a espermátides haplóides. Na terceira fase as espermátides diferenciam-se em espermatozoides (GUNES et al., 2015).

Do ponto de vista endócrino, o processo de espermatogênese é dependente de um feedback negativo clássico que envolve interações no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (O'DONNELL et.al., 2006). O hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) são os principais reguladores do processo (O'DONNELL et.al., 2006). Esses hormônios são produzidos pela glândula adenohipófise e são liberados na corrente sanguínea, essa liberação ocorre em resposta a um estímulo produzido pelo hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) liberado pelo hipotálamo (O'DONNELL et al., 2006).

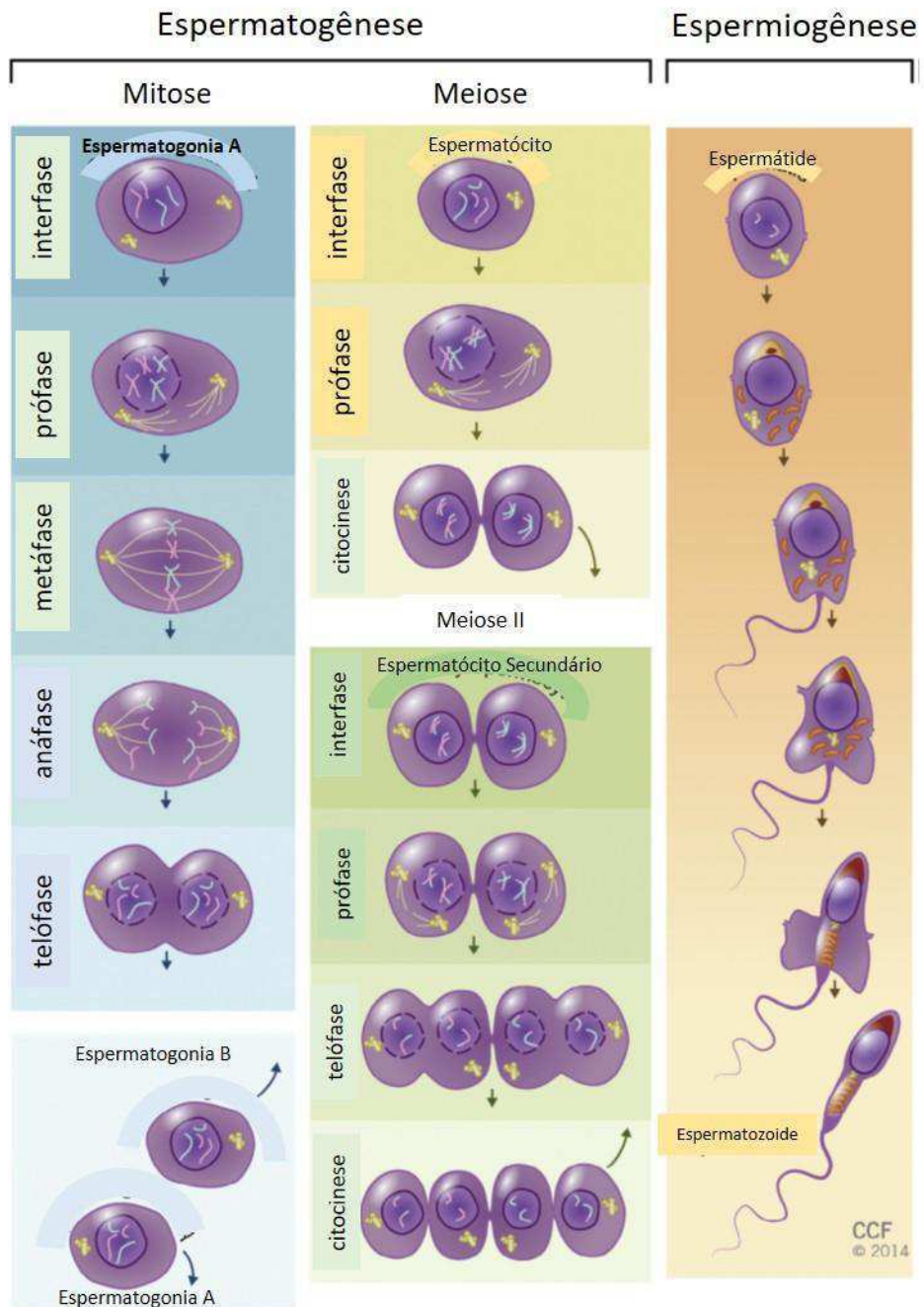


Figura 2: Espermatogênese. Fonte: Adaptado de Cleveland Clinic Center for Medical Art & Photography © 2014. All Rights Reserved.

### 1.3 Danos no DNA espermático

Para produção de espermatozoides móveis normais é primordial que o DNA espermático esteja íntegro (de ROOIJ & RUSSELL, 2000; MAHMOUD, 2012; MÉNÉZO et al., 2010). Para identificar a origem dos danos ao DNA, diversos estudos foram propostos. Através desses identificou-se três teorias principais, onde o dano pode ser causado por fatores como: espécies reativas de oxigênio, empacotamento anormal da cromatina e o processo de apoptose acarretam danos ao DNA espermático (AGARWAL et al., 2012, 2014A, 2014B, 2014C).

#### 1.3.1 Espécies Reativas de Oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas altamente reativas que contêm oxigênio (AITKEN et al., 1998). As ROS podem ser causadas por fontes exógenas como: exposição a raios X, luz ultravioleta, tabagismo, herbicidas, abuso de álcool, estresse crônico, e poluição do ar e por fontes endógenas como: processo de respiração celular e sistemas enzimáticos (MÉNÉZO et al., 2010). Concentrações altas de ROS ocasionam além de dano no DNA, a perda de motilidade espermática e diminuição do potencial de fertilização (AITKEN et al., 1992; TAMBURRINO et al., 2012). Diferentes estudos evidenciaram que entre 20 a 88% dos homens considerados subférteis apresentaram alta concentração de ROS no sêmen (AGARWAL et al., 2014a, 2014b).

#### 1.3.2 Empacotamento da Cromatina Espermática

O empacotamento da cromatina espermática é um procedimento crítico e necessário para organizar na pequena cabeça do espermatozoide uma grande quantidade de DNA. Considerado um mecanismo regulador que exige modificações que necessitam da substituição de 90-95% de histonas por protaminas tornando o espermatozoide eficaz para realizar o processo de fertilização que requer diversos eventos fisiológicos, tais como, a corrida ao longo de todo o sistema reprodutor feminino, a ligação a zona pelúcida e a penetração no oócito (TORREGROSA et al., 2006).

As protaminas são proteínas ricas em arginina localizadas no núcleo e produzidas durante os estágios avançados da espermatogênese. O processo de protaminação da cromatina espermática atua facilitando a compactação do núcleo para que aconteça a motilidade dos espermatozoides e protege o genoma espermático contra a oxidação e moléculas do sistema reprodutivo feminino (TORREGROSA et al., 2006).

O dano ao DNA espermático tem demonstrado ser uma causa importante de infertilidade, pois está diretamente relacionado à transmissão de alterações genéticas para prole. Entre as principais causas de dano no DNA espermático estão anomalias na condensação da cromatina relacionadas com o processo de maturação do espermatozoide, rupturas na cadeia dupla do DNA, anomalias cromossômicas tais como aneuploidias e reordenação (RODRIGUEZ et al., 2010).

### 1.3.3 Apoptose

A apoptose, definida como morte celular que ocorre de forma programada e controlada geneticamente, é essencial para o desenvolvimento do processo de espermatogênese (GUNES et al., 2015). Nesse processo a apoptose atua de duas formas: limitando o crescimento da população de células germinativas e proporcionando a quantidade ideal de células de Sertoli (AITKEN & BAKER, 2013). Apesar da morte celular programada ser um mecanismo fisiológico que objetiva eliminar as células excessivas durante a proliferação e/ou eliminar células potencialmente nocivas, algumas vezes alguns espermatozoides que estão destinados a esse processo conseguem escapar e chegar ao ejaculado, esse processo é denominado apoptose abortiva (AITKEN & BAKER, 2013, SAKKAS et al, 1999a).

Uma população contendo espermatozoides remanescentes de uma apoptose abortiva e que apresentam morfologia anormal, função bioquímica irregular ou danos no DNA, podem contribuir com DNA danificado para as próximas gerações devido ao aumento da utilização da técnica ICSI (GUNES et al, 2015).

#### 1.4 Fragmentação do DNA espermático e a infertilidade masculina.

A fragmentação do DNA espermático é um dano que pode ocorrer tanto no DNA nuclear quanto no mitocondrial. Esse dano pode ocorrer durante todas as fases do desenvolvimento do espermatozoide e são ocasionados pelos mecanismos de apoptose abortiva; mal empacotamento da cromatina; fragmentação induzida por ROS, exposição a tóxicos ambientais e radio/quimioterapia (SAKKAS & ALVAREZ, 2010).

Os espermatozoides que apresentam morfologia e motilidade normais podem possuir o DNA espermático danificado. Este fato explica o porquê um alto número de mulheres apresentarem problema para conceber apesar de não apresentarem qualquer causa de infertilidade. (AITKEN et al., 2014).

Atualmente a fragmentação do DNA espermático vem sendo estudada como marcador de infertilidade masculina. Homens considerados inférteis apresentam níveis de fragmentação do DNA espermático mais elevado do que aqueles considerados férteis (CHOHAN et al., 2006).

Para analisar a integridade do DNA espermático são utilizados testes que detectam o nível de fragmentação da cadeia de DNA. Dentre os testes utilizados estão: o teste eletroforese em gel célula única (COMET) ou o teste TUNEL; o teste ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA) que avalia a estrutura da cromatina dos espermatozoides e o teste cromomicina A3 (CMA3) que avalia os níveis de protaminação e compactação da cromatina dos espermatozoides.

O teste TUNEL é baseado na incorporação de nucleotídeos deoxiuridina trifosfatados (dUTP), marcados com isocianato de fluoresceína (FITC), nas extremidades 3'OH das cadeias de DNA fragmentadas, numa reação enzimática mediada pela enzima transferase deoxinucleotidil terminal (GAVRIELI et al., 1992). Através da citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência os nucleotídeos que foram incorporados emitem um sinal fluorescente, essa emissão indica que há fragmentação do DNA, caso ocorra, a ausência da emissão fluorescente indica que o espermatozoide não está fragmentado. Quanto mais intenso o sinal de fluorescência emitido maior será o grau de fragmentação. Dentre as vantagens apresentadas por essa técnica está o fato de permitir a detecção ao mesmo tempo de cortes nas cadeias simples e duplas do DNA (SHAMSI et al., 2008; ZINI &



SIGMAN, 2009).

O teste COMET quantifica e analisa individualmente a resposta de cada célula em relação aos danos do DNA, essa análise é realizada de forma sensível e rápida. Essa técnica possui algumas desvantagens como a presença residual de RNA nas amostras e a descondensação incompleta da cromatina que pode interferir na revelação dos cortes (SHAMSI et al., 2008).

O teste SCSA é baseado na indução da desnaturação ácida do DNA seguida de coloração metacromática com laranja de acridina. Esse é um método simples, porém dispendioso (SHAMSI et al., 2008).

O teste CMA3 é baseado na utilização de um fluorocromo permitindo a identificação de anomalias no empacotamento da cromatina dos espermatozoides (BUCAR, 2014).

Estudos com esses testes demonstraram que danos no DNA espermático afetam os resultados reprodutivos, com isso se tornou necessário melhorar as taxas de sucesso nas técnicas de reprodução assistida e foram criados métodos não invasivos de seleção espermática sem danos no DNA (HENKEL, 2012).

## 1.5 Fragmentação do DNA espermático e perda gestacional.

A ocorrência de um aborto antes de 12 semanas de gestação define a perda gestacional precoce. As aneuploidias embrionárias estão entre as causas mais comuns do aborto, no entanto estimasse que 50% das perdas gestacionais espontâneas continuam sem explicação (ESQUERRÉ-LAMARE et al. 2018).

As falhas na capacidade de concepção natural e os abortos recorrentes podem ter relação com aumento no dano do DNA espermático (CARRELL et al. 2003; SPANO et al.2000). Estudos demonstram que o tipo de dano no DNA espermático será determinante para causar o aborto. Danos sutis conseguem ser reparados pelos oócitos após a fertilização, porém se o oócito não for capaz de corrigir esse dano, irá acarretar danos no desenvolvimento embrionário, falha de implantação e aborto espontâneo (MCQUEEN et al.2019).

Alguns estudos sugerem que o aumento nos danos do DNA espermático estão

relacionados ao chamado efeito paterno tardio que irá ocorrer durante a ativação da expressão genética masculina e com isso pode originar um aborto espontâneo (TESARI et al. 2004).

## 1.6 Separação Celular Magnética (MACS)

A técnica separação celular magnética (MACS) é um método desenvolvido para selecionar espermatozoides livres de dano no DNA espermático. É baseada na detecção, através da proteína anexina V, da fosfatidilserina (PS, do inglês *Phosphatidylserine*) no folheto externo da membrana citoplasmática do espermatozoide. Essa afinidade entre a PS e anexina v permitiu o desenvolvimento dessa técnica que separa os espermatozoides viáveis daqueles que estão em apoptose (GRUNEWALD & PAASCH, 2013).

A fosfatidilserina é um fosfolípido de membrana presente em membranas citoplasmáticas. A membrana plasmática é composta por uma bicamada de fosfolípidos dispostos de forma assimétrica. A variedade dos fosfolípidos na membrana confere sua característica de fluidez. Quando a PS é exposta, a superfície da membrana irá atuar como sinal de reconhecimento dos macrófagos que estão expressando receptores de PS, e dessa forma, promove a eliminação das células em apoptose (SAID et al., 2008).

A exposição da PS pode acontecer a baixos níveis e de forma reversível sob condições de estresse, não significando apoptose. A exposição da PS pode ser utilizada para avaliar células que estejam em risco de morte celular (NADALINI, 2014).

A Anexina V é uma proteína ligante natural. Essas proteínas são caracterizadas por terem capacidade de se ligarem à superfície de fosfolípidos de carga negativa de forma reversível e dependente de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (BARROSO et al., 2000). A Anexina V está localizada intracelularmente, no citosol. Pode ser expressa em diversos tipos celulares como: cardiomiócitos, endotélio vascular, eritrócitos, trombócitos, linfócitos, células gliais, astrócitos, oligodendrócitos, células de Schwann, hepatócitos, células da mucosa brônquica, condrócitos e osteoblastos (PAASCH et al., 2003).

Na prática, a técnica MACS baseia-se em incubar os espermatozoides em uma suspensão de microsferas super paramagnéticas (microbeads) ligadas à proteína anexina-V. No período de incubação, as microsferas irão se ligar aos espermatozoides com PS externalizadas (figura 3).

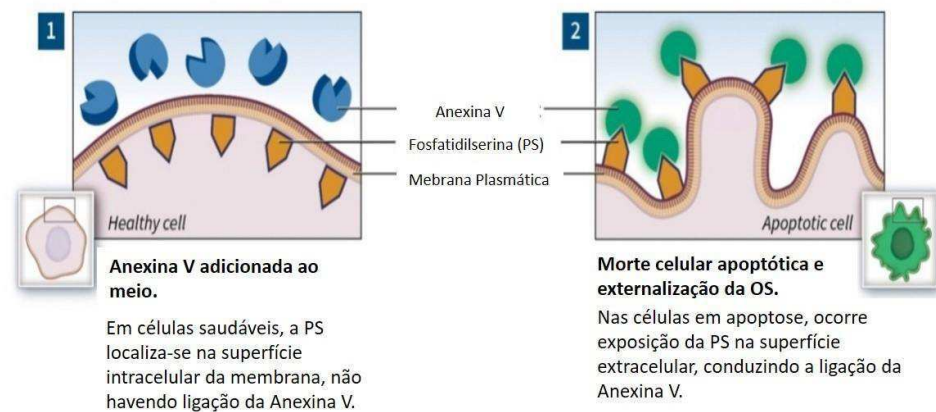


Figura 3: Esquema ligação anexina V e fosfatidilserina. Fonte: Adaptado de IncuCyte®

Após o tempo de incubação, a suspensão de espermatozoides é passada por uma coluna acoplada a um imã (figura 4). Após passarem pela coluna, são originadas duas populações de espermatozoides, que são denominadas fração positiva, e que contêm os espermatozoides retidos na coluna, ou seja, os espermatozoides com DNA danificado e a fração negativa contendo espermatozoides com DNA intacto que passam pela coluna (GRUNEWALD & PAASCH, 2013).

Em TRA a técnica MACS vem sendo utilizada associada às técnicas clássicas de preparação espermática: centrifugação por gradientes de densidade e *swim-up* (SAID et al. 2006).

A primeira gravidez clínica utilizando a técnica MACS foi documentada em 2008, em um estudo que analisou as taxas de fertilização, clivagem, gravidez e implantação. Os espermatozoides demonstraram melhora nas características morfológicas, porém não avaliou o índice de fragmentação do DNA antes e depois da separação magnética (DIRICAN et al.2008). Apesar do resultado da gravidez clínica, surgiram preocupações em relação ao uso da técnica juntamente com as técnicas de fertilização, diversos estudos foram realizados para

sanar as preocupações, em um desses estudos foi utilizada a microscopia eletrônica de transmissão, demonstrando que a fração que seria utilizada para fertilização não continha as microesferas aderidas a membrana plasmática dos espermatozoides (PAASCH et al. 2003).

O uso da técnica MACS com as técnicas de preparação espermática antes da ICSI, se mostra benéfico para homens considerados inférteis, resultando em melhores taxas de sucesso (SAID et al.2008). Alguns estudos mostram que o potencial de penetração do espermatozoide é melhorado após a utilização da técnica MACS, indicando que a mesma possui benefícios quando utilizado na TRA (SUN et al. 1997; HOST et al. 2000; BUNGUM et al. 2004). Diversos autores relatam uma melhora na taxa de fertilização, na qualidade embrionária e na taxa de gestação (GIL, et al.2013; ROMANY et al.2010; GRUNEWALD et al. 2009; AZIZ et al.2007).

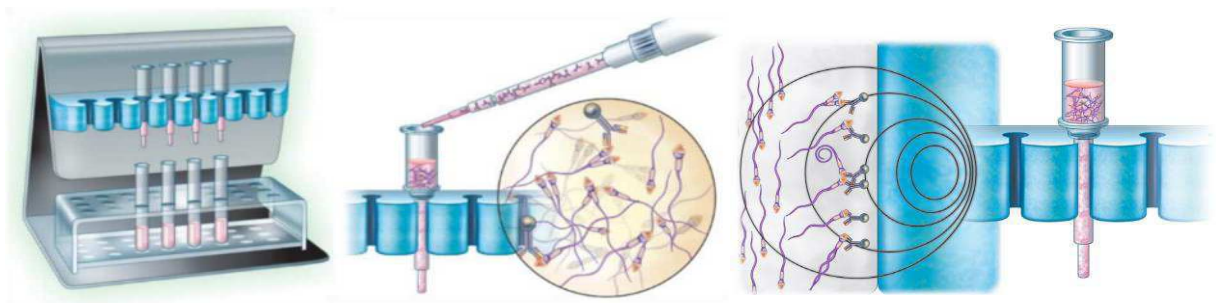


Figura 4: Esquema Separação celular magnética (MACS). Fonte: Tahir Beydola.

## 1.7 Técnicas de Preparação Espermática

As técnicas de preparação espermática são utilizadas para selecionar os espermatozoides que se apresentam morfolologicamente normais e com alta motilidade (WHO, 2010).

A técnica de centrifugação por gradientes de densidade (figura 5) pode ser realizada tanto com gradientes contínuos como descontínuos. Essa técnica consiste

na colocação do ejaculado no topo dos gradientes e submetê-lo à centrifugação, durante a centrifugação, os espermatozoides com alta motilidade se movem ativamente em direção ao sedimento, e aqueles com baixa motilidade ou imóveis não conseguem passar pelas barreiras entre os gradientes resultando em um pellet rico em espermatozoides altamente móveis (GORUS & PIPELEERS, 1981).

A técnica de *Swim-up* é baseada no movimento ativo dos espermatozoides através do meio de cultura. Após o período de incubação, os espermatozoides que conseguem migrar ativamente até a superfície são os que possuem melhor morfologia e motilidade (WHO, 2010).

Volpes e colaboradores em 2016 avaliaram as melhores técnicas de preparação seminal e observaram que a técnica swim-up mostra uma menor taxa de fragmentação do DNA espermático quando comparada à técnica de gradiente de densidade. No gradiente de densidade, a seleção é baseada no peso molecular das células e com isso não garante uma boa seleção em relação à taxa de fragmentação (VOLPES et al., 2016).

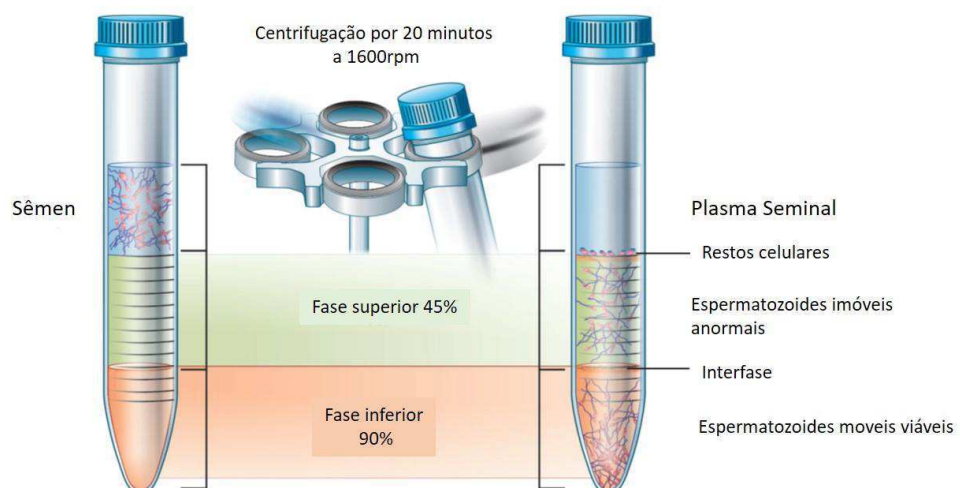


Figura 5: Esquema técnica centrifugação por gradiente de densidade. Fonte: Adaptado de Tahir Beydola.

Ghaleno e colaboradores em 2014 afirmaram em seu estudo que a fragmentação do DNA nas amostras seminais processadas por gradiente de centrifugação foi maior quando comparada à swim-up (GHALENO et al., 2014).

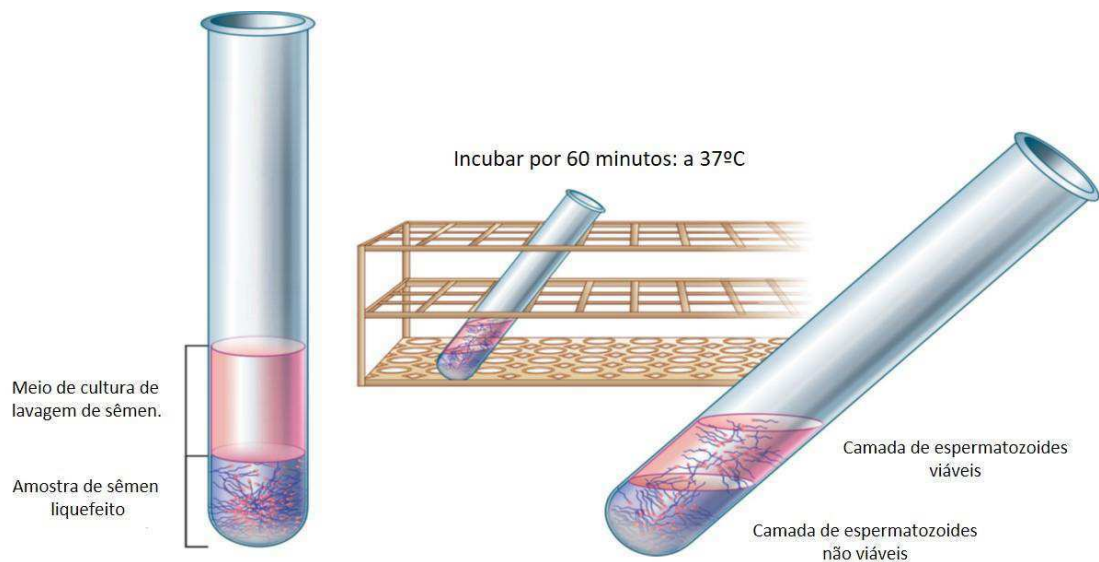


Figura 6: Esquema técnica swim-up. Fonte: Tahir Beydola

## 2. JUSTIFICATIVA

MACS - Anexina V é considerada como um sistema de separação flexível, rápido e simples para a separação de células. Além disso, os espermatozoides exibem manifestações de apoptose reduzidas, incluindo fragmentação de DNA. Neste contexto, a MACS- Anexina V pode ser considerada como uma técnica de seleção única, que complementa os protocolos convencionais de preparação seminal.

## 3. OBJETIVO

Avaliar se a técnica de separação magnética para selecionar espermatozoides aumenta a qualidade dos espermatozoides obtidos.

### 3.1 Objetivos Específicos

- Confirmar a eficácia da técnica de separação celular magnética.
- Eliminar e/ou minimizar a possibilidade de fertilização com espermatozoides danificados.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Desenho do estudo

Participaram deste estudo pacientes do Serviço de Medicina Reprodutiva do Hospital Escola Álvaro Alvin/Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do Norte Fluminense, no período de maio de 2018 a janeiro de 2020. A aprovação pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (anexo 1), ocorreu no dia 29 de abril de 2018 de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, número CAAE: 78044017.5.0000.5524.

Os pacientes que buscaram pelo tratamento de reprodução assistida foram avaliados pelo médico que solicitou o exame de análise do índice de fragmentação espermática. Esse exame é solicitado quando o paciente tem histórico de doença que altere a fragmentação, exposição laboral, como por exemplo, pacientes que trabalham expostos a agentes químicos, calor excessivo entre outros fatores. No momento em que compareceu para realizar o exame o estudo foi explicado e proposta a participação.

Os critérios de inclusão foram apresentar índice de fragmentação de DNA espermático acima de 20%, aceitar assinar o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) (anexo 2). Foram excluídos do estudo os que não cumpriram os critérios de inclusão.

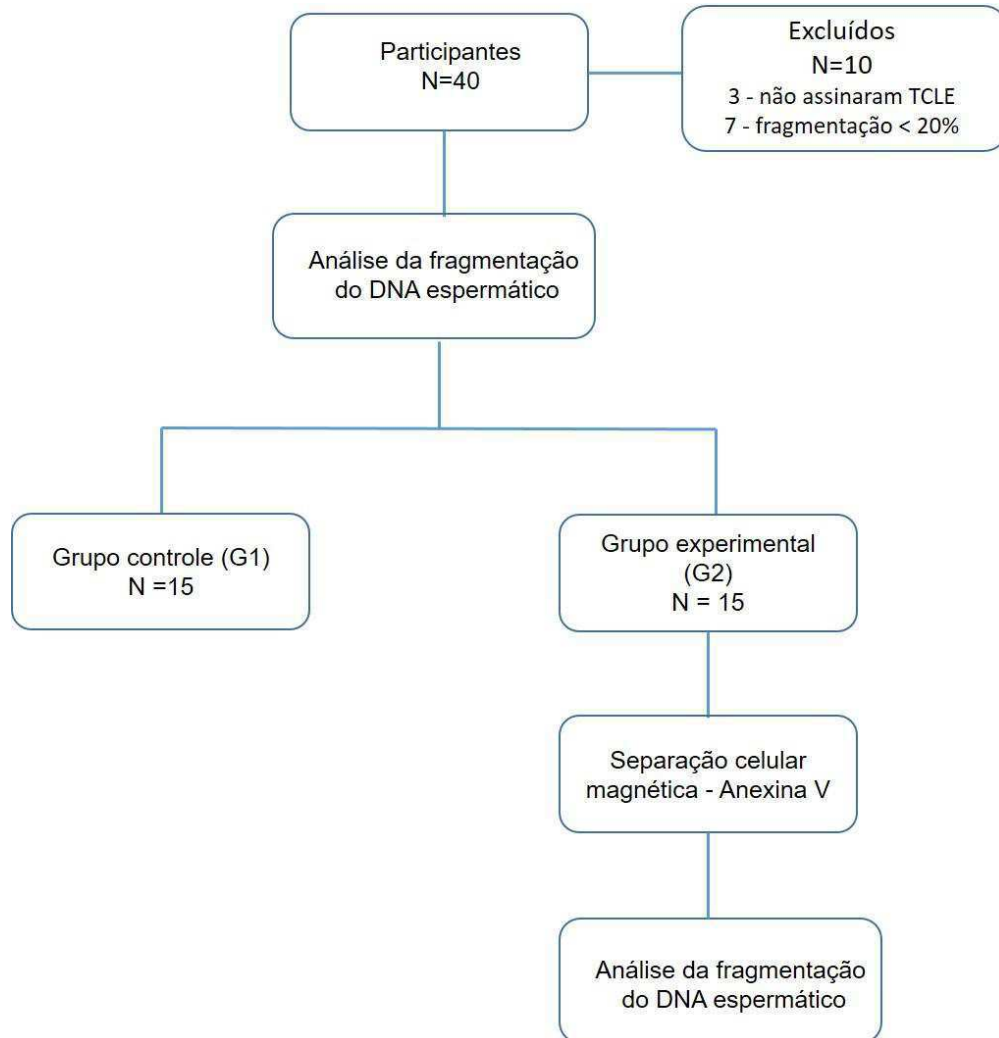


Figura 7: Desenho do estudo.

Durante o período de desenvolvimento do estudo, 40 pacientes foram recrutados, desses somente 30 atenderam os critérios de inclusão. Foram excluídos do estudo sete pacientes que apresentaram índice de fragmentação do DNA abaixo de 20% e três que não aceitaram assinar o termo de consentimento livre e esclarecido e foram excluídos do estudo. Os 30 pacientes que cumpriram os critérios de inclusão foram divididos aleatoriamente por sorteio em dois grupos: grupo 1 (G1) controle, composto por 15 participantes onde foi realizado somente o teste para diagnosticar a fragmentação do DNA espermático e grupo 2 (G2), formado por 15 participantes onde após o teste para diagnosticar a fragmentação do DNA espermático foi aplicada à técnica MACS-Anexina V e feita uma segunda análise do índice de fragmentação do DNA espermático para aferir novamente a taxa de fragmentação (figura 7).



## 4.2 Avaliação da qualidade de vida dos participantes

Para analisar a qualidade de vida dos participantes e se os mesmos eram expostos a algum fator ambiental e/ou laboral, foi solicitado que respondessem a um questionário (Anexo 3). O questionário foi aplicado no dia que os participantes fizeram os exames diagnósticos de análise seminal. As perguntas estavam relacionadas a fatores que podem influenciar na fertilidade masculina, tanto na qualidade espermática como na fragmentação do DNA espermática. Dentre os fatores encontra-se: idade, comorbidades, hábitos de qualidade de vida (alimentação saudável, prática de atividade física, ingestão de bebida alcoólica, uso de drogas ilícitas, fumo), exposição a algum fator laboral, uso de medicamentos.

## 4.3 Análise Seminal

Os parâmetros seminais foram analisados conforme Manual OMS, 2010. O sêmen foi coletado, em frasco universal para coleta estéril previamente identificado com os dados do paciente, através de masturbação, estando o paciente em período de abstinência sexual de 2 a 7 dias como recomendado pelo Manual da OMS, 2010. Após a coleta, o sêmen foi colocado em banho maria (Evelab B.M EV: 015) por um período de 15 a 60 minutos para que fosse atingida sua liquefação, após esse período foi realizada uma análise macroscópica, foi avaliada a concentração, através da câmara de Makler, motilidade e morfologia, pH e cor.

## 4.4 Análise do índice de fragmentação do DNA espermático.

Para a análise do índice de fragmentação do DNA espermático (SDF) foi utilizada a técnica de dispersão da cromatina do DNA espermático (SCD), quando o DNA está intacto, sem fragmentação, são produzidos nucleóides com largos halos das alças do DNA dispersa, quando o DNA está fragmentado, os nucleóides não apresentam o halo disperso ou o halo é mínimo (figura 8). Essa técnica foi aplicada utilizando o Kit Halosperm G2 para detecção de fragmentação de DNA (Halotech®).

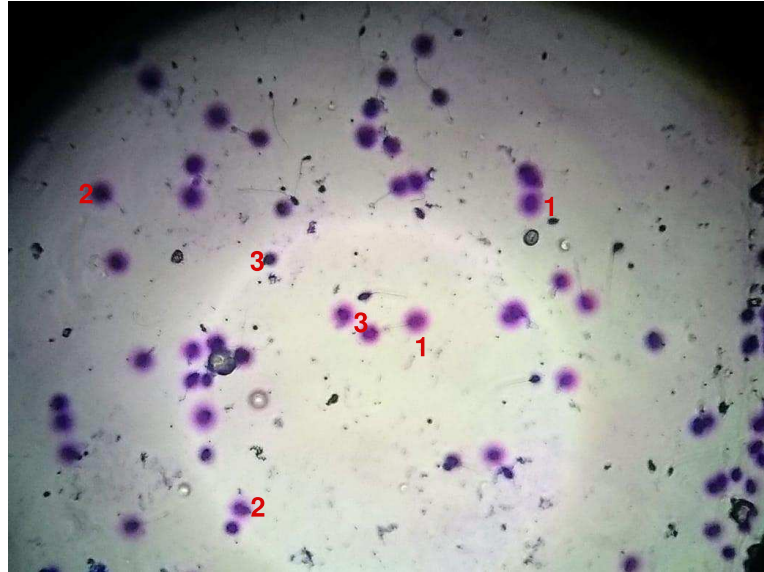


Figura 8: Lâmina de halosperm. Aumento de 200x. 1- Halos grandes representam espermatozoides com DNA íntegro, 2 - halos pequenos representam espermatozoides com DNA fragmentado, 3 – ausência de halo representa espermatozoides com DNA degradado. Fonte: Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do NF.

Um tubo eppendorf® contendo 100µl de agarose foi colocado a temperatura de 95-100°C por 5 minutos, após esse tempo o tubo foi transferido para banho maria mantido a 37°C e deixado por 5 minutos. Foram adicionados 50 µl do sêmen no eppendorf® e misturado gentilmente. Uma gota de 8 µl da mistura de sêmen com agarose foi depositada no centro do poço da lâmina pré- tratada do kit e coberto com uma lamínula de vidro para formação de um microgel. A lâmina foi colocada em uma superfície previamente resfriada e colocada dentro do refrigerador a 4°C por 5 minutos. As etapas seguintes foram realizadas a temperatura ambiente (22°C).

Após os 5 minutos, a lamínula foi retirada e adicionada pelo tempo de 7 minutos à solução desnaturante. Após esse tempo, a lâmina foi vertida em um papel toalha para retirada da solução desnaturante e acrescentada à solução de lise, para remover proteínas nucleares, e incubado por 20 minutos. Em seguida, a solução foi retirada e a lâmina foi coberta com água destilada por 5 minutos, para lavagem. A etapa seguinte foi à desidratação da amostra, a lâmina foi coberta com álcool 70% por 2 minutos, seguido de álcool 100% por mais 2 minutos, em seguida, foi descartado o álcool e a lâmina foi colocada para secagem à temperatura ambiente. Após a secagem, a lâmina passou pela etapa de coloração, foi adicionada a solução

de coloração eosina, por 7 minutos. Descartada essa solução, foi colocada a coloração tiazina, por 7 minutos, a lâmina foi deixada à temperatura ambiente para secagem por 1 hora. Após esse período, realizou-se a análise através da contagem de 500 espermatozoides.

O índice de fragmentação foi calculado dividindo o número de espermatozoides com DNA fragmentado pelo número total de espermatozoides contados e multiplicado por 100 para expressar o valor em porcentagem.

$$\text{SDF (\%)} = 100 \times \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides com DNA fragmentado}}{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides contados}}$$

#### 4.5 Preparo do sêmen para Separação molecular magnética (MACS-Anexina V)

##### 4.5.1 Processamento Seminal: Swim-up

Após análise macroscópica do sêmen e a contagem da concentração espermática, uma alíquota foi separada para análise do índice de fragmentação do DNA espermático e o volume restante foi submetido à técnica de swim-up para capacitação dos espermatozoides. O volume foi colocado em um tubo vacutainer e foi colocado o mesmo volume de meio de cultivo HTFm (Irvine Scientific®) formando uma proporção 1:1, o tubo foi centrifugado por 20 minutos a 150g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado 500µl de meio de cultivo HTFm (Irvine Scientific®), o tubo foi colocado em banho Maria a 37°C por 40 minutos para ocorrer a migração dos espermatozoides. Após esse tempo, foi feita uma contagem dos espermatozoides do sobrenadante.

##### 4.5.2 Cálculo de espermatozoides apoptóticos

Com a contagem dos espermatozoides (CI) realizada no sêmen preparado após swim-up, foi calculado o número de espermatozoides apoptóticos (CA) a partir do resultado prévio da fragmentação do DNA espermático, multiplicando CI pela porcentagem de espermatozoides apoptóticos (AP%).

$$\text{CA} = \text{CI} \times \text{AP}\%$$

Sabendo o CA, foi calculado o volume de amostra (VA) de ressuspensão de espermatozoides que foi utilizado para passar na coluna.

$$VA = 10^7 / CA \times 1000$$

#### 4.5.3 Preparo da coluna

As micropérolas fornecidas com o Kit de reagentes foram incubadas a 37°C. Foi preparada uma alíquota de 5 ml do tampão de ligação (Miltenyi®).

Após o processamento seminal (swim-up) 1ml de tampão de ligação 1x (Miltenyi®) foi adicionado na alíquota de espermatozoides (VA) e centrifugado por 5 minutos a 500g, após, o sobrenadante foi descartado com cuidado para deixar o pellet intacto e adicionado 100 µl das micropérolas (Miltenyi®). Essa mistura foi transferida para um poço de uma placa de 96 poços (Falcon®) e incubado por 20 minutos em agitação constante (aparelho Shaker de movimento circular a 100 rpm) a temperatura ambiente, 2 minutos antes de terminar o tempo de incubação, a coluna MS (Miltenyi®) foi preparada e hidratada com 500 µl de tampão de ligação 1x (Miltenyi®).

Terminada a agitação da amostra foi adicionado 500µl de tampão de ligação 1x (Miltenyi®) essa mistura foi colocada na coluna e eluiu pela força da gravidade, e coletada em um tubo contendo 500µl de tampão de ligação 1x (Miltenyi®). Foram feitas duas lavagens na coluna com 500µl de tampão de ligação 1x (Miltenyi®).

Terminada a passagem na coluna, a amostra coletada foi centrifugada a 500g por 5 minutos sendo o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensão em 1 ml de meio HTFm (Irvine Scientific®).

Em seguida, foi feita uma nova avaliação do índice de fragmentação do DNA espermático nas amostras para observar se ocorreu a diminuição do índice de fragmentação.

#### 4.6 Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste *t* não pareado após constatadas as pressuposições de distribuição normal (teste de D'Agostino & Pearson) e de homogeneidade das variâncias (teste *F*) (tabela 1). O teste de distribuição normal dos dados de concentração espermática foi significativo, o que foi corrigido depois de retirar um dado discrepante identificado pelo gráfico de *boxplot* (Figura 9).

Os dados das variáveis Grupo 2 e os dados da comparação entre G1 e G2 após separação, não atenderam à pressuposição de homogeneidade das variâncias. Os dados da variável Grupo 2 foram submetidos ao teste de Wilkerson pareado e os dados da comparação entre G1 e G2 após separação foram analisados pelo teste *t* não pareado com correção de Welch. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos para todos os testes. As análises foram realizadas utilizando o software Graphpad Prims® versão 6.01 para Windows.

Tabela 1. Valor de P obtidos pelos testes para distribuição normal (D'Agostino & Pearson) e homogeneidade das variâncias (teste *F*).

Variáveis analisadas	Teste de D'Agostino & Pearson	Teste F
Idade dos pacientes	NS	NS
IMC	NS	NS
Morfologia	NS	NS
Concentração Espermática	NS*	NS
Motilidade	NS	NS
Fragmentação	NS	NS
Grupo 2	NS	***
Comparação Grupo1 e Grupo 2 após separação	NS	****

Significância 5%. \*Não significativo depois de retirado um dado discrepante. \*\*\*Valor de significância 0.0001. \*\*\*\* valor de significância <0.0001.

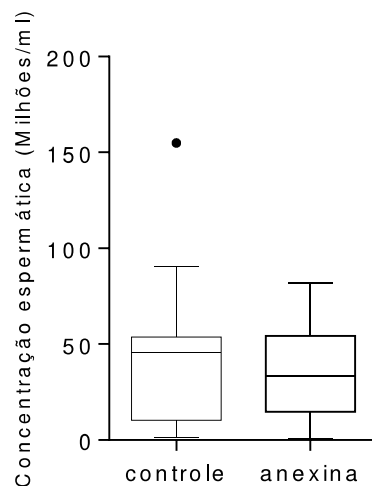


Figura 9. *Boxplot* dos dados de concentração espermática.

## 5 RESULTADOS

O perfil e os parâmetros seminais dos participantes são mostrados na Tabela 2. A idade média dos participantes da pesquisa foi de 35,4 anos no grupo 1 e 36,6 anos no grupo 2. Os valores médios do índice de massa corporal (IMC) foi de 28,2 no grupo 1 e 26,0 no grupo 2. Nessas variáveis analisadas não foi encontrada diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

A fragmentação do DNA apresentou valores semelhantes em ambos os grupos 36,2 % (grupo 1) e 38,5 (grupo 2) ( $p > 0,05$ ). Para análise da morfologia, foi utilizado o Critério estrito de Tygerberg (kruger), que considera como valor dentro da normalidade 4% de um total de pelo menos 100 espermatozoides analisados quanto ao formato e tamanho de cabeça, anomalias na peça intermediária e tamanho e disposição da cauda, não foi encontrada diferença estatística entre os valores analisados no grupo 1 (39,3) e no grupo 2 (45,8). Quanto à motilidade foi averiguada a motilidade progressiva, para esse parâmetro foram avaliados espermatozoides com progressiva linear rápida (A) e progressiva linear lenta (B), foi obtida uma equiparidade nos valores desse parâmetro em ambos os grupos, 37,7 no grupo 1 e 38,0 no grupo 2. O grupo 1 apresentou um maior valor, porém sem diferença estatística, de concentração espermática em milhões por ml 46,1 vs 34,6 no grupo 2 ( $p > 0,05$ ).

Tabela 2. Perfil e parâmetros seminais dos participantes selecionados para o estudo.

<b>Parâmetros seminais</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Valor de P</b>
Idade média (anos)	35,4 ±0,8 (33.5-37.3)	36,6 ±1,4 (33.6-39.7)	0,48 <sup>d</sup>
IMC	28,2±1,3 (25.2-31.2)	26,0±0,9 (24.0-28.0)	0,20 <sup>d</sup>
Fragmentação (%)	36,2±2,9 (30.0-42.5)	38,5±2,6 (32.8-44.2)	0,57 <sup>d</sup>
Morfologia (%) <sup>(a)</sup>	39,2±3,0 (32.8-45.7)	45,8±4,1(37.0-54.6)	0,21 <sup>c</sup>
Concentração (10 <sup>6</sup> /ml)	46,1±10,5(21.7-55.0)	34,6±6,6(20.2-48.9)	0,36 <sup>c</sup>
Motilidade progressiva (%) <sup>(b)</sup>	37,7±5,4(26.0-49.4)	38,0±4,7(27.9-48.0)	0,97 <sup>c</sup>

Os valores encontram-se expressos em média ± desvio padrão e entre parênteses o intervalo de confiança 95%. Para avaliar a significância estatística foi utilizado  $p < 0,05$ . <sup>a</sup>morfologia analisada de acordo com Critério estrito de Tygerberg (Kruger); <sup>b</sup>motilidade grau A (progressiva linear rápida) e B (progressiva linear lenta); <sup>c</sup> one-way-ANOVA; <sup>d</sup> Teste *t*.

Foi avaliado se o participante era exposto a algum fator ambiental ou hábito da qualidade de vida que afetasse o nível de fragmentação do DNA espermático (figura 10). Em ambos os grupos, os participantes relataram consumo de álcool, sendo 40% dos participantes do grupo 1 e 27% do grupo 2, esse consumo ocorreu de 1 a 2 vezes por semana. Quanto ao uso de drogas ilícitas e cigarros, nenhum dos participantes fez uso. Nos dois grupos, os participantes relataram fazer uso de alimentação saudável, 60% no grupo 1 e 53% no grupo 2. Dentre as atividades físicas exercidas, em ambos os grupos foi observada a prática de musculação com frequência de 5 vezes na semana, seguida de corrida de 2 a 3 vezes na semana, alguns relataram a combinação de atividades física como futebol, corrida e musculação, sendo no grupo 1 um maior número de participantes (67%) praticantes de exercícios físicos. Avaliando os fatores de exposição laboral no grupo 1 houve maior porcentagem de participantes que trabalhavam com embarque e exposição a calor (27%), agente químico (47%) quando comparado ao grupo 2 onde 13% embarcaram, 20% foram expostos ao calor e 27 % a agente químico. Dos participantes do grupo 1, 33 % foram acometidos por caxumba e 7% foram

acometidos por varicocele enquanto no grupo 2, 27 % tiveram caxumba e 20% varicocele.

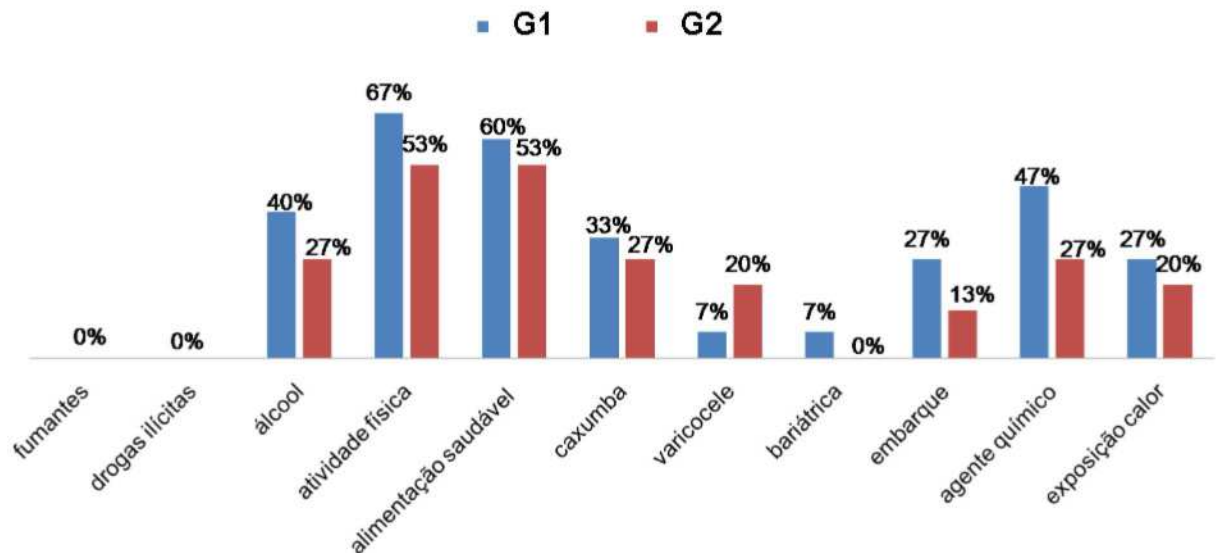


Figura 10: Porcentagem de participantes de cada grupo de estudo que relatou exposição aos diversos fatores ambientais e/ou hábitos de vida que afetam fragmentação do DNA espermático.

Na tabela 3 são apresentados os valores do índice de fragmentação do DNA espermático dos participantes do grupo 2 antes e após a separação molecular magnética. Pode-se observar uma diminuição considerável da fragmentação. Comparando os valores médios do índice de fragmentação antes da separação molecular (38,53) averiguasse que após a separação molecular (11,27) todas as amostras tiveram o índice de fragmentação do DNA espermático abaixo do valor limite de 20%, havendo uma diferença estatística significativa (Tabela 3).



Tabela 3. Fragmentação do DNA espermático (porcentagem) do grupo 2 antes e após a separação celular magnética.

<b>PACIENTES GRUPO 2</b>	<b>Fragmentação antes separação molecular magnética</b>	<b>Fragmentação após separação molecular magnética</b>	<b>Valor de P</b>
1	58%	6%	
2	31%	10%	
3	36%	12%	
4	49%	13%	
5	26%	14%	
6	50%	16%	
7	28%	12%	
8	33%	9%	
9	32%	15%	
10	32%	13%	
11	46%	10%	
12	26%	9%	
13	36%	4%	
14	44%	13%	
15	51%	13%	
<b>Média fragmentação</b>	<b>38,53 ± 2,6</b>	<b>11,27 ± 0,8</b>	<b>&lt;0,0001</b>

Os valores encontram-se expressos em média ± desvio padrão.

Na figura 11 são demonstrados os valores de porcentagem do índice de fragmentação do DNA espermático dos participantes do grupo 1 e do grupo 2 após a separação celular magnética. Pode-se observar que ocorreu uma diminuição considerável da fragmentação havendo uma diferença estatística altamente significativa ( $p < 0,0001$ ).

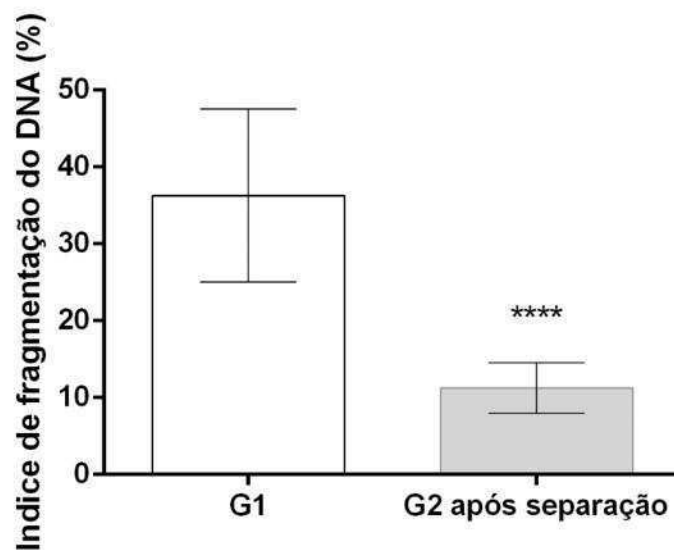


Figura 11: Índice de fragmentação do DNA espermático do grupo 1 e do grupo 2 após a separação molecular magnética. \*\*\*\* Demonstra diferença altamente estatística. ( $p < 0.0001$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Atualmente, cerca de 50% dos casos de infertilidade são atribuídos a fatores masculinos (LOPES et al., 2019). Com o desenvolvimento tecnológico, na área da reprodução assistida, tem se tornado possível superar a incapacidade dos espermatozoides em fertilizar os oócitos, sendo necessária menor quantidade dos mesmos para levar a gravidez por FIV ou ICSI, sendo fundamental selecionar espermatozoides saudáveis (LOPES et al., 2019).

Na fertilização natural, dos milhões de espermatozoides liberados no ejaculado, somente uma centena chegará até o oócito (HINO et al., 2016). Durante essa caminhada, os espermatozoides são selecionados e os capacitados e com características morfológicas e genéticas adequadas para o processo de fertilização conseguirão concluir a caminhada (PÉREZ-CEREZALES et al., 2017). Já para uso nos tratamentos de reprodução assistida, diversos estudos demonstram que não há uma metodologia eficaz para selecionar os espermatozoides. Esse fato é relevante, pois, as técnicas de fertilização ignoram a seleção espermática in vivo, utilizando apenas fatores subjetivos de morfologia. Com isso, há um risco aumentado de fertilizar os oócitos com espermatozoides defeituosos, levando a falha no tratamento

(FERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2008).

Nos últimos anos, os TRA vêm sendo cada dia mais utilizados, e avaliar a fertilidade tanto feminina quanto a masculina se faz necessário. Para avaliação da infertilidade masculina, a análise do sêmen é o teste mais importante, mas não fornece informações sobre todas as funções do espermatozoide, nem é suficiente para prever o potencial de fertilidade masculina e a probabilidade de sucesso do tratamento (GUZICK, et al. 2001). Além disso, os padrões para valores normais na análise de sêmen não refletem os valores médios, mas são determinados utilizando os 5% inferiores como um ponto de corte. Em outras palavras, é o padrão mínimo para a gravidez. De fato, 15% dos pacientes com infertilidade masculina apresentam resultados normais na análise do sêmen (AGARWAL et al.2005).

Apesar do aumento na procura pelas TRA, as taxas de gravidez e de bebê em casa, que são os resultados esperados, permanecem baixas. Atribuí-se a essas baixas taxas, não somente a falta de pesquisas em terapias a nível molecular para infertilidade masculina (HFEA, 2008; De MOUZON et al., 2010), como também o envelhecimento da população e diversas mudanças no estilo de vida, que resultam no contínuo aumento da infertilidade (DUPAS & CHRISTINE-MAITRE, 2008; POVEY & STOCKS, 2010).

Atualmente, diversas pesquisas apontam a qualidade espermática e as altas porcentagens de espermatozoides com DNA danificado como dois dos fatores críticos para os resultados reduzidos nos TRA. Nos casais que tratam a infertilidade é observado que, se o homem tem um alto índice de fragmentação do DNA espermático, um dos principais objetivos do tratamento será diminuir esse índice, seja por modificações no estilo de vida, tratamento com antioxidantes ou uso de técnicas acessórias (KIM, 2018). Esses objetivos são necessários, pois, o DNA espermático íntegro é essencial para que as informações genéticas sejam transmitidas de forma precisa. A integridade da cromatina é o parâmetro mais estudado rotineiramente dentre as características. Os danos na cromatina espermática afetam o desenvolvimento embrionário e estão relacionados com aborto e defeitos no nascimento (BALASURIYA et al, 2011; BUNGUM et al. 2011; EBNER et al., 2011; FREOUR et al., 2010). Essa integridade pode ser prejudicada por diversos fatores dentre eles as espécies reativas de oxigênio (ROS) (SAKKAS &

ALVAREZ, 2010).

As ROS afetam não somente a integridade da cromatina, mas também a barreira hemato-testicular e a membrana plasmática do espermatozoide (HA et. al, 2011). Algumas comorbidades e/ou fatores ambientais, laborais e hábitos de estilo de vida influenciam nos níveis de ROS e consequentemente nos níveis de fragmentação do DNA espermático (SABETI, et. al, 2016).

Nos resultados do presente estudo, foi avaliado se os participantes eram expostos a algum fator ambiental, laboral, hábitos de vida ou alguma comorbidade que poderiam afetar os níveis de ROS, podendo ser considerado fator causal das alterações nos níveis de SDF. Em ambos os grupos estudados, mais de 50% dos participantes relataram que praticavam atividade física e faziam uso de uma alimentação saudável o que é primordial para diminuição dos ROS. Porém, em ambos os grupos, foi observado que o índice de massa corporal dos participantes estava na faixa do sobrepeso. O peso elevado e a obesidade são causadores de infertilidade masculina, pois desregulam as vias endócrinas e aumentam os níveis seminais de ROS (KASHOU, et. al, 2012). Além do IMC elevado, os participantes também eram expostos a outros fatores que prejudicam desde a espermatogênese ao aumento dos níveis de ROS, causando danos na cromatina.

Dentre outros fatores na qual os pacientes avaliados foram expostos estão, por exemplo, fatores laborais, exposição ao calor e a agentes químicos. Sabe-se que dentre as práticas laborais, existem substâncias que podem influenciar a saúde através da inalação, contato dérmico, entre outros e afetam negativamente a fertilidade. (CHALUPKA & CHALUPKA, 2010). Slevan et al. (2000) e Rubes et al. (2005) avaliaram os efeitos da poluição do ar na fertilidade masculina e observaram que os homens expostos a algum tipo de poluição, como, por exemplo, agentes químicos, apresentam maior porcentagem de anormalidades espermáticas e aumento na fragmentação do DNA. Em algumas profissões, como as profissões *offshore* (embarque), os homens são expostos a metais pesados tais como chumbo, mercúrio, alumínio entre outros e também expostos ao calor. Chalupka & Chalupka (2010) e Sikka & Wang (2008) relataram que a exposição a metais pesada afeta o eixo hipotálamo-hipófise causando alterações na qualidade espermática e pode interromper a espermatogênese. Outros causadores de danos espermáticos são as

comorbidades como varicocele e caxumba. No grupo experimento (G2) 20% participantes apresentaram varicocele sugerindo ser a causa dos níveis altos de fragmentação. Atualmente 15% a 20% dos homens com problemas de fertilidade são diagnosticados com varicocele (FRENCH, et. al, 2008). Pasqualotto et al. (2008) observaram que homens com varicocele possuem níveis elevados de ROS no sêmen e menor capacidade antioxidante total.

O consumo de álcool é um exemplo de hábito de vida que influencia a fertilidade. Dentre os participantes do estudo, foi observado que 40 % do G1 e 27 % do G2 fazem uso de álcool de 1 a 2 vezes por semana, apesar de ser considerado uso moderado, a quantidade de álcool ingerida não foi quantificada. Já é sabido que uso de álcool em idade reprodutiva reduz os níveis de antioxidantes e interfere no mecanismo de defesa antioxidante prejudicando o metabolismo e gerando radicais livres reativos e tóxicos (SAALU,2010). Anderson e colaboradores descrevem que o álcool aumenta os níveis de ROS, reduz a concentração espermática, afeta a morfologia e motilidade progressiva (ANDERSON et al, 2010). Ao afetar a qualidade espermática, o álcool, indiretamente, também reduz as taxas de sucesso da FIV e aumenta o índice de aborto (MELDRUM et al, 2016; NICOLAU, et. al, 2014).

Com o risco aumentado, devido à exposição, aos diversos fatores prejudiciais a qualidade espermática e integridade da cromatina, a análise da fragmentação do DNA espermático tem se tornado essencial para avaliar a infertilidade masculina. Os diversos testes de fragmentação do DNA espermático medem a qualidade do espermatozoide como um transportador de DNA e, portanto, se torna mais significativo do que os parâmetros avaliados nas análises seminais tais como espermograma (IRVINE et al. 2000).

Além das avaliações diagnósticas da infertilidade masculina, também, se fazem necessárias a utilização de técnicas que auxiliem a selecionar espermatozoides de melhor qualidade para serem utilizados durante as técnicas de fertilização in vitro. É essencial a utilização de técnicas integradas e não somente os métodos de processamento seminal que fazem uma mimetização da capacitação espermática natural. Dentre os diversos métodos de processamento seminal, utilizados atualmente, não há consenso sobre o mais adequado. Os métodos mais utilizados são: o gradiente de concentração de densidade e o swim-up, que são

baseados na migração ou separação dos espermatozoides selecionados pela morfologia e motilidade espermática. Nos diversos protocolos de estudos que avaliam a integridade do DNA espermático após a utilização dessas técnicas, observasse uma maior tendência da utilização do gradiente de concentração de densidade, porém não há evidências que essa seja a melhor técnica (OSEGUERA-LÓPEZ et al.2019). Estudos demonstram que a técnica do swim-up permite isolar espermatozoides móveis e com morfologia normal e é mais eficiente em recuperar espermatozoides com cromatina mais íntegra (OEHNINGER et al., 1990; LACHAUD et al., 2004). Zini et al. (2001) relataram, que espermatozoides processados pela técnica swim-up possuíam menor taxa de desnaturação do DNA quando comparados com espermatozoides processados pela técnica de gradiente de concentração de densidade. Spano e colaboradores e Younglai e colaboradores demonstraram que swim-up pode melhorar alguns dos parâmetros relacionados ao ensaio da estrutura da cromatina e não induz danos no DNA do esperma (SPANO et al. 1999 e YOUNGLAI et al., 2001). Os resultados, encontrados por esses autores, corroboram com a escolha da técnica swim-up como a técnica de processamento seminal utilizada no presente estudo.

A fertilização baseada somente nas técnicas de processamento seminal não elimina a possibilidade de utilizar espermatozoides imaturos ou com DNA danificado. Podendo ser considerado como a causa das baixas porcentagens do desenvolvimento embrionário e das altas taxas de falha de implantação. Ademais, homens com problemas de fertilidade podem apresentar morfologia normal, porém, com fragmentação do DNA (AVENDAÑO & OEHNINGER, 2011). Com o objetivo de garantir a qualidade dos espermatozoides utilizados nos TRA, vem sendo utilizado juntamente com as técnicas de processamento seminal métodos de seleção baseados na morfologia espermática e nas características da membrana externa (OSEGUERA-LÓPEZ et al.2019). O uso do método de seleção magnética, usando microesferas conjugadas com proteína anexina V, é capaz de separar espermatozoides com translocação de PS para a membrana, especificamente aqueles espermatozoides com membranas danificadas, que é uma manifestação de dano no DNA espermático (TROYA & ZORRILLA, 2015).

Diversos estudos demonstram sua eficácia na redução dos níveis de fragmentação do DNA espermático (HERRERO et. al,2012; LOSADA et. al, 2012).

Entretanto, alguns questionamentos são levantados, sobre sua eficácia, devido à presença de uma pequena porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado, após passarem pela separação. A presença dessa fração de espermatozoides com DNA danificado, pode ser explicado, pelo fato de ocorrer variações nos marcadores apoptóticos (MARTINEZ et al. 2018). A técnica MACS seleciona espermatozoides, baseada no processo de translocação da fosfatidilserina na membrana plasmática, sendo esse processo um marcador precoce de apoptose, porém não é o único marcador de apoptose, relacionado a fragmentação do DNA (SAKKAS e ALVAREZ, 2010). Fraczek e colaboradores em 2015, observaram em seu estudo, que os marcadores apoptóticos, como a anexina V, quando associados a espermatozoides, com DNA fragmentado, podem ou não, ter sua expressão ativada quando passam pela coluna magnética, isso, também, auxiliaria na explicação da existência da pequena população de espermatozoides com dano no DNA, após a separação.

Os resultados do presente estudo demonstraram que a técnica de separação magnética MACS ANEXINA V foi capaz de reduzir a proporção do índice de fragmentação do DNA espermático, na tabela 2 é possível observar comparativamente a redução que ocorreu na amostra seminal dos 15 participantes do grupo experimento. Nossos resultados demonstram que ocorreu uma diminuição média de 38,5 % antes do uso da técnica para 11,2 após a separação. Após a separação, todas as amostras, de espermatozoides, apresentaram o índice de fragmentação entre 6 % e 16%, aumentando a possibilidade de selecionar espermatozoides saudáveis para serem utilizados na fertilização. MACS anexina V tem sido considerado um sistema rápido e simples para separação de espermatozoides com dano na cromatina. Uma característica de suma importância da técnica é ser um método relativamente barato que pode ser aplicado de modo fácil em laboratórios de reprodução humana assistida (SAID et al. 2008).

A combinação de MACS com swim-up é capaz de entregar espermatozoides com uma melhor qualidade de viabilidade, morfologia e apresentam uma melhor qualidade na cromatina. Com base nos resultados do presente estudo, MACS pode ser considerado uma técnica de separação que complementa os protocolos convencionais de preparação de espermatozoides.

## 7 CONCLUSÃO

A técnica de separação magnética celular – MACS ANEXINA V combinada com a técnica de processamento seminal swim-up é um método eficaz na redução do índice de fragmentação do DNA espermático.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

A técnica de separação magnética celular – MACS ANEXINA V está sendo implantada na rotina do Serviço de Medicina Reprodutiva do Hospital Escola Álvaro Alvin/Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do Norte Fluminense. Com a implantação da técnica, iniciaremos uma nova etapa do estudo, com o objetivo de analisar se haverá melhora da taxa de fertilização, nos casos onde a principal causa de infertilidade seja o fator masculino, ocasionado pelo alto índice de fragmentação do DNA espermático.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, A., Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Hum. Reprod. Update** 9, 331–345, 2003.

Agarwal A, Allamaneni S. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. **Minerva Ginecol** 56:235– 45.2004.

Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. **Fertil Steril**.84:850-3, 2005.

Agarwal, A., Tsarev, I., Erenpreiss, J., Sharma, R. **Sperm chromatin assessment**. In: Textbook of Assisted Reproductive Techniques, 4<sup>a</sup> ed. Informa Healthcare, 2012.

Agarwal, A., Mulgund, A., Sharma, R., Sabanegh, E., Mechanisms of oligozoospermia: an oxidative stress perspective. **Syst. Biol. Reprod. Med.** 60, 206–216, 2014a.



Agarwal, A., Sharma, R.K., Sharma, R., Assidi, M., Abuzenadah, A.M., Alshahrani, S., Durairajanayagam, D., Sabanegh, E. Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men. **Reprod. Biol. Endocrinol.** 12, 33, 2014b.

Agarwal, A., Tvrda, E., Sharma, R., Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility. **Reprod. Biol. Endocrinol.** 12, 45, 2014c.

Agarwal, A., Cho, C, e Esteves, S. C. Should we evaluate and treat sperm DNA fragmentation? **Co-obgyn.** Volume 28, Number 3, 2016.

Aires, M. M. **Fisiologia/ Margarida de Mello Aires.** 4.ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2012.

Aitken, R.J., Buckingham, D., West, K., Wu, F.C., Zikopoulos, K., Richardson, D.W., Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. **J. Reprod. Fertil.** 94, 451–462, 1992.

Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J.P., Milne, P., Jennings,Z., Irvine, D.S., Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biol. Reprod.** 59, 1037–1046, 1998.

Aitken, R.J., Baker, M.A., Oxidative stress, spermatozoa and leukocytic infiltration: relationships forged by the opposing forces of microbial invasion and the search for perfection. **J. Reprod. Immunol.** 100, 11–19, 2013.

Aitken, R.J., Smith, T.B., Jobling, M.S., Baker, M.A., De Iuliis, G.N., Oxidative stress and male reproductive health. **Asian J. Androl.** 16, 31–38, 2014.

Amiri I, Ghorbani M, Hesmati S. Comparison of the DNA fragmentation and the sperm parameters after processing by the density gradient and the swim up methods. **J Clin Diagn Res.** 6(9): 1451–3, 2012.

Avendaño C, Oehninger S. DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era? **J Androl.** 32: 356-63,2011.

Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. **Hum Reprod.** 22(5):1413–9. 2007.

Balasuriya, A., Speyer, A.B., Serhal, P., Doshi, A., Harper, J.C. Sperm chromatin dispersion test in the assessment of DNA fragmentation and aneuploidy in human spermatozoa. **Reprod. Biomed. Online,** 22, 428–436,2011.

Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. **Hum Reprod**; 15:1338–1344, 2000.

Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., Kogosowski, A., Menezes, Y., and Barak, Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. **J. Androl.** 23, 1–8, 2002.

Bucar, S.V. **Estudo da Fragmentação do DNA em Espermatozoides Humanos após Separação por MACS.** 60p. Dissertação de mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento. Universidade de Lisboa, 2014.

Bungum, M., Bungum, L., Giwercman, A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. **Asian J. Androl.** 13, 69–75.2011.

Carrell D, Liu L, Peterson C, Jones K, Hatasaka H, Erickson L, et al. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. **Arch Androl.**;49:49-55.2003.

Cayli, S., Jakab, A., Ovari, L., Delpiano, E., Celik-Ozenci, C., Sakkas, D. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. **Reprod. Biomed. Online** 7, 462–468. 2003.

Chalupka, S., Chalupka, A.N. The impact of environmental and occupational exposures on reproductive health. **JOGNN.** 39:84–102, 2010.

Chocu, S., Calvel, P., Rolland, A.D., Pineau, C. Spermatogenesis in mammals: proteomic insights. **Syst. Biol. Reprod. Med.** 58, 179–190, 2012.

Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. **J Androl**; 27:53-9, 2006.

Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López- Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J. Evaluación del daño en el DNA espermático. **ActasUroEsp**; 31:120-31, 2007.

Dana B. McQueen, M.D., M.A.S., John Zhang, Ph.D., and Jared C. Robins, M.D. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. **Fertility and Sterility** Vol. 112, No. 1, July 2019

Dandekar, P., Aggeler, J., and Talbot, P. Structure, distribution and composition of the extracellular matrix of human oocytes and cumulus masses. **Hum. Reprod.** 7, 391–398.1992.

De Mouzon, J., Goossens, V., Bhattacharya, S., Castilla, J.A., Ferraretti, A.P., Korsak, V., Kupka, M., Nygren, K.G., Nyboe Andersen, A. Consortium The European IVF-monitoring (EIM). Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. **Hum. Reprod.** 25, 1851–1862, 2010.

De Rooij, D.G., Russell, L.D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **J. Androl.** 21, 776–798, 2000.

Dirican, E.K., Ozgu'n, O.D., Akarsu, S. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. **J. Assist. Reprod. Genet.** 25, 375–381.2008.

Dupas, C., Christine-Maitre, S. What are the factors affecting fertility in 2008? **Ann. Endocrinol.** 69, 57–61, 2008.

Ebner, T., Shebl, O., Moser, M., Mayer, R.B., Arzt, W., Tews, G. Easy sperm processing technique allowing exclusive accumulation and later usage of DNA-strandbreak-free spermatozoa. **Reprod. BioMed. Online** 22, 37–43,2011.

Esquerré-Lamare C, Walschaerts M, Chansel Debordeaux L, et al. Aneuploidia espermática e fragmentação de DNA na perda gestacional recorrente inexplicada: um estudo caso-controle multicêntrico. **Basic Clin Androl.** 28: 4.2018

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

Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Hum Reprod** 14:1039–1049, 1999.

Fatehi A.N, Bevers M.M, Schoevers E, Roelen B.A, Colenbrander B, Gadella B.M., DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **J Androl** 27:176–188, 2006.

Fernandez-Gonzalez, R., Moreira, P. N., Pérez-Crespo, M., Sánchez-Martín, M., Ramirez, M. A., Pericuesta, E. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. **Biol. Reprod.** 78, 761–772,2008.

Fernández, J.L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. **FertilSteril**; 84:833-42, 2005.

Fraczek, M., Hryhorowicz, M., Gaczarzewicz, D., Szumala-Kakol, A., Kolanowski, T.J., Beutin, L., Kurpisz, M. Can apoptosis and necrosis coexist in ejaculated human spermatozoa during in vitro semen bacterial infection? **J Assist Reprod Genet.** 32 (5): 771-9. Maio de 2015

French D. B., Desai N. R., Agarwal A. Varicocele repair: Does it still have a role in infertility treatment? **Obstetrics and Gynecology.**20(3), 269–274,2008.

Freour, T., Delvigne, A., Barrie`re, P. Evaluation of the male of the infertile couple. **J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.** 32, S45–S52,2010.

Ghaleno L.R, Valojerdi M. R, Janzamin E, Chehrazi M, Sharbatoghli M, Yazdi R.S. Evaluation of conventional semen parameters, intracellular reactive oxygen species, DNA fragmentation and dysfunction of mitochondrial membrane potential after semen preparation techniques: a flow cytometric study. **Arch Gynecol Obstet.** 289(1):173–80, 2014.

Gavrieli, A., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol** 119(3): 493-501, 1992.

Glander, H.J. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. **Reproductive BioMedicine Online**, 10, 740-746, 2005.

Gorus, F., Pipeleers, D., A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. **FertilSteril** 35: 662-665, 1981.

Grunewald S, Paasch U, Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. **Cell Tissue Bank.**2:127–33, 2001.

Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V, Said TM, Agarwal A, Hmeidan FA, et al. Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. **Fertil Steril.** 92(2):572–7.2009.

Grunewald, S., Paasch, U. Sperm selection for ICSI using Annexin V. **Methods Mol Biol.** 927: 257-262, 2013.

Gunes, S., Al-Sadaan, M., Agarwal, A., Spermatogenesis , DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility, **Reproductive BioMedicineOnline**, v. 31, n. 3, p. 309–319, 2015.

Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. **N Engl J Med**.345:1388-93,2001.

Ha, H. K., Park, H. J., & Park, N. C. Expression of E-cadherin and  $\alpha$ -catenin in a varicocele-induced infertility rat model. **Asian Journal of Andrology**, 13(3), 470, 2011.

Henkel, R. Sperm preparation: state-of-the-art—physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. **Asian J Androl** 14: 260-269, 2012.

Herrero, M.B, Delbes, G., Troueng, E., Holzer, H., Chan, P.T.K., 28th Annual Meeting of the European Society on Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Differential enrichment of sperm with no DNA strand breaks using magnetic activated cell sorting (MACS) in men with various categories of semen parameters. **Hum Reprod**. 27 suppl 2:ii121–50, 2012.

HFEA. A Long Term Analysis of the HFEA Register Data (1991–2006). Human Fertilisation and Embryology Authority. 2008.

Hino, T., Muro, Y., Tamura-Nakano, M., Okabe, M., Tateno, H., and Yanagimachi, R. The behavior and acrosomal status of mouse spermatozoa in vitro, and within the oviduct during fertilization after natural mating. **Biol. Reprod**.95:50,2016.

Huszar, G., Ozkavukcu, S., Jakab, A., Celik-Ozenci, C., Sati, G. L., and Cayli, S. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol**. 18, 260–267.2006.

IBGE. **Censo Demográfico**, 2010. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em: 10 de janeiro de 2019.

Irvine D.S, Twigg J.P, Gordon E.L, Fulton N, Milne P.A, Aitken R.J. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. **J Androl**.21:33-44, 2000.

Kashou, A. H., du Plessis, S. S., Agarwal, A. The role of obesity in ROS generation and male infertility. In A. Agarwal, R. J. Aitken, & J. G. Alvarez (Eds.), **Studies on men's health and fertility** (pp. 571–590). New York, NY: Humana Press, 2012.

Kim, G. Y. What should be done for men with sperm DNA fragmentation? **Clin Exp Reprod Med.** 45(3):101-109, 2018.

Kopera, I., Bilinska, B., Cheng, C., Mruk, D. Sertoli–germ cell junctions in the testis: a review of recent data. **PhilosTrans R SocLond B BiolSci.**365: 1593-1605, 2010.

Kruger, T.F, Menkveld, R, Stander, F.S. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. **Fertil Steril.** 46:1118–23, 1986.

Lachaud, C., Tesarik, J., Cañadas, M., Mendoza, C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. **Hum Reprod** 19(3): 607-610. 2004.

La Maestra, S., De Flora, S., & Micale, R. T. Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa. **International Journal of Hygiene and Environmental Health,** 218(1), 117–122, 2015.

Lee, T-H., Liu, C-H., Shih, Y-T., Tsao, H-M., Huang, C-C. Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. **Hum Reprod** 25(4): 839-846, 2010.

Lopes S, Sun J.G, Jurisicova A, Meriano J, Casper R.F., Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. **FertilSteril** 69:528–532, 1998.

Losada C, Ortega I, Pacheco A, Bronet F, 28th Annual Meeting of the European Society on Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Can MACS as a sperm preparation technique improve clinic results in patients with Kartagener syndrome? **Hum Reprod.**27 suppl 2:ii162–205,2012.

Mahmoud, H. Concise review: spermatogenesis in an artificial three-dimensional system. **Stem Cells,** 30, 2355–2360, 2012.

Ménézo, Y., Dale, B., Cohen, M., DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. **Zygote,** 18, 357–365, 2010.

Mehta, A., Haber, J.E. Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** 6:a016428, 2014.

Meldrum, D. R., Casper, R. F., Diez-Juan, A., Simon, C., Domar, A. D., Frydman, R. Aging and the environment affect gamete and embryo potential: can we intervene? **Fertility and sterility.** 105(3), 548–559, 2016.

Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry.*11:231-238, 1990.

Monica G., Valerie S.S., Yolisiid M. S., Ramon C., Miguel A. C. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. **J Assist Reprod Genet.** 30:479–485.2013.

Morales R, Lledó B, Ortiz J, Rodríguez-Arnedo D, Fabregat A, Bernabeu R. Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. **Revista Ibero Americana de Fertilidad**; 24:305-13, 2007.

Nasr-Esfahani, M. H., Razavi, S., Vahdati, A. A., Fathi, F., and Tavalae, M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. **J. Assist. Reprod. Genet.** 25, 197–203. 2008.

Nicolau, P., Miralpeix, E., Sola, I., Carreras, R., & Checa, M. A. Alcohol consumption and in vitro fertilization: A review of the literature. **Gynecological Endocrinology**, 30(11), 759–763, 2014.

O'Donnell, L., Meachem, S., Stanton, P., McLachlan, R. Endocrine Regulation of Spermatogenesis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Cap. 21, 3° ed. (Neill, J., Eds.). USA, Elsevier, St. Louis, pp. 1017-1069, 2006.

Oehninger, S., Acosta, R., Morshedi, M., Philput, C., Swanson, R. Relationship between morphology and motion characteristics of human spermatozoa in semen and in the swim-up sperm fractions. **J Androl** 11(5): 446-452,1990.

Oseguera-López, I., Ruiz-Díaz, S., Ramos-Ibeas, P., Pérez-Cerezales, S. Novel Techniques of Sperm Selection for Improving IVF and ICSI Outcomes. **Front. Cell Dev. Biol.** 7:298,2019.

Paasch, U., Grunewald, S., Fitzl, G., Glander, H.J. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. **J Androl.**; 24:246-252, 2003.

Pasqualotto, F. F., Sundaram, A., Sharma, R. K., Borges, E., Pasqualotto, E. B., & Agarwal, A. Semen quality and oxidative stress scores in fertile and infertile patients with varicocele. **Fertility and Sterility**. 89(3), 602–607, 2008.

Pérez-Cerezales, S., Ramos-Ibeas, P., Acuña, O. S., Avilés, M., Coy, P., Rizos, D. The oviduct: from sperm selection to the epigenetic landscape of the embryo. **Biol. Reprod.** 98, 262–276, 2017.

Petersen C. G., Mauri A.L., Vagnini A.D., Renzi A., Petersen b., Matilla M.C., Comar V.A., Ricci J., Dieamant F., Oliveira J.B.A., Baruffi R.L.R., Franco Jr J.G. Randomized comparison of two commercial culture media (Cook and Vitrolife) for embryo culture after IMSI. **JBRA Assisted Reproduction**. 23(1):33-36, 2019.

Povey, A.C., Stocks, S.J. Epidemiology and trends in male subfertility. **Hum. Fertil. (Camb)** 13, 182–188, 2010.

Powles R., Mehta, J., Kulkarni, S., Treleaven, J., Millar, B., Marsden, J., Shepherd, V., Rowland, A, Sirohi, B, Tait, D. Horton, C., Long .S., Singhal, S. Allogeneic blood and bone-marrow stem-cell transplantation in haematological malignant diseases: a randomised trial. **Lancet**. 355:1231-1237, 2000.

Razavi, S. H., Nasr-Esfahani, M. H., Deemeh, M. R., Shayesteh, M., Tavalae, M. Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity. **Andrologia** 42, 13–19, 2010.

RB D'Agostino, "Tests for Normal Distribution" in *Goodness-Of-Fit Techniques* edited by RB D'Agostino and MA Stephens, Macel Dekker, 1986.

Rodríguez, A. G., Ramírez, D.F., La fragmentación de ADN espermático, influencia sobre las técnicas de reproducción asistida y La calidad embrionaria. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología** Vol. 61 No. 2, PP.160-164, 2010.

Romany L, Meseguer M, García-Herrero S, Romero JL, Pellicer A, Garrido N, et al. Magnetic activated sorting of non-apoptotic sperm result in improved embryo quality in ovum donation cycles with intracytoplasmic sperm injection. **Hum Reprod**. 25 suppl 1:i8. 2010.



Rubes, J., Selevan, S.G., Evenson, D.P., Zudova, D., Vozdova, M., Zudova, Z., Robbins, W.A., Perreault, S.D. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. **Hum Reprod.** 20:2776–2783,2005.

Saalu, L. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: An evidence based evaluation. **Pakistan Journal of Biological Sciences.** 13(9), 413, 2010.

Sabeti, P., Pourmasumi, S., Rahiminia, T., Akyash, F., & Talebi, A. R. Etiologies of sperm oxidative stress. **International Journal of Reproductive BioMedicine.** 14(4), 231, 2016.

Said, T.M., Grunewald, S., Paasch, U., Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. **Reprod. Biomed. Online** 10, 740–746, 2005b.

Said, T., Agarwal, A., Grunewald, S., Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. **Biol. Reprod.** 74, 530–537. 2006.

Said, T. M., Agarwal, A., Zborowski, M., Grunewald, S., Glander, H.J., Paasch, U., Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. **J. Androl.** 29, 134–142, 2008.

Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P.G., Bianchi, U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. **Rev. Reprod.** 4, 31–37.1999.

Sakkas, D., Alvarez, J. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **FertilSteril** 93 (4): 1027-1036, 2010.

Selevan, S.G., Borkovec, L., Slott, V.L., Zudova, Z., Rubes, J., Evenson, D.P., Perreault, S.D. Semen quality and reproductive health of young czech men exposed to seasonal air pollution. **Environ Health Perspect.**108:887–894,2000.

Shamsi, M., Kumar, R., Dada, R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. **Indian J Med Res** 127: 115-123, 2008.

Sikka, S.C., Wang, R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. **Asian J Androl.** 10:134–145,2008.

Simon, L., Proutski, I., Stevenson, M., Jennings, D., McManus, J., Lutton, D., Lewis S. Sperm DNA damage negatively affects live-birth rates in IVF patient. **Reproductive BioMedicine Online.** 26, 68– 78, 2013.

Simopoulou, M., Gkolesb, L., Bakasb, P., Gianneloub, P., Kalampokasb, T., Pantosc, K., Koutsilierisa, M. Improving ICSI: A review from the spermatozoon perspective. **Systems Biology in Reproductive Medicine** 1939-6368 (Print) 1939-6376 (Online), 2016.

Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. **Fertil Steril.**;73:43-50. 2000.

Spano, M. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. **Fertil Steril.** v. 80, n. 6, p. 1404–1412, 2003.

Spano M, Cordelli E, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Nuclear chromatin variations in the human spermatozoa which underwent swimup and cryopreservation, which were evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. **Mol Hum Reprod**, 5 : 29-37, 1999.

Sawilowsky, S.S. Fermat, Schubert, Einstein, and Behrens-Fisher: The Probable Difference Between Two Means With Different Variances. **J. Modern Applied Statistical Methods.**vol. 1 pp. 461-472,2002.

Tamburrino, L., Marchiani, S., Montoya, M., Elia Marino, F., Natali, I., Cambi, M., Forti, G., Baldi, E., Muratori, M., Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. **Asian J. Androl.** 14, 24–31, 2012.

Tesarik J, GrecoE, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation , **Hum Reprod.** vol. 19 (pg. 611-615).2004

Torregrosa, N., Dominguez-Fandos, D., Camejo, M.I., Shirley, C.R., Meistrich, M.L., Balleasca, J.L., Oliva, R., Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. **Hum. Reprod.** 21, 2084–2089, 2006.

Troya, J., Zorrilla, I., Annexin V-MACS in infertile couples as method for separation of sperm without DNA fragmentation. **JBRA Assisted Reproduction.** 19(2):66-69, 2015.

Volpes, A., Sammartano, F., Rizzari, S., Gullo, S., Marino, A., Allegra, A. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. **J Assist Reprod Genet.** 33:765–770, 2016.

Weinbauer, G., Luetjens, C., Simoni, M., Nieschlag, E. Physiology of Testicular Function. In: **Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction**, Cap. 2, 3<sup>a</sup> ed (Nieschlag, E., Behre, H., Nieschlag, S., Eds.) Germany. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 11-59, 2010.

WHO, World Health Organization and Department of Reproductive Health and Research, **Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen**. World Health Organization, Geneva, Switzerland, cap. 1, p. 56–58, 2010.

Xiao, X., Mruk, D.D., Cheng, C.Y. Intercellular adhesion molecules (ICAMs) and spermatogenesis. **Hum. Reprod. Update**, 19, 167–186, 2013.

Zhang, Z. H., Zhu, H. B., Li, L. L., Yu, Y., Zhang, H. G., & Liu, R. Z. Decline of semen quality and increase of leukocytes with cigarette smoking in infertile men. **Iranian Journal of Reproductive Medicine.** 11(7), 589, 2013.

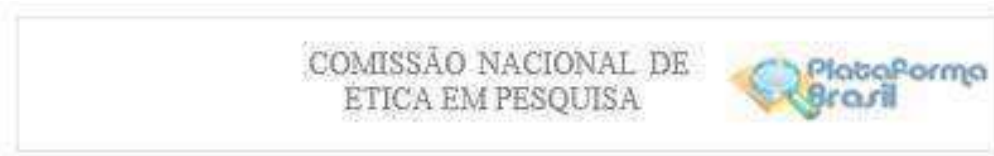
Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes M.T. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. **FertilSteril**; 75:674-7, 2001.

Zini A, Meriano J, Kader K, Jarvi K, Laskin CA, Cadesky K. Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. **Hum Reprod**; 20:3476-80, 2005.

Zini A., Libman J., Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. **CMAJ** 175: 495–500, 2006.

Zini, A., Sigman, M. Are tests of sperm DNA damage review clinically useful? Pros and cons. **J Androl** 30(3): 219-229, 2009.

## ANEXOS

**ANEXO 1 - Parecer Consubstanciado de aprovação da pesquisa pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.****PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação da viabilidade da técnica de separação magnética de espermatozoides (Anexina V) na rotina de laboratórios de Reprodução Humana Assistida.

**Pesquisador:** Francisco Augusto ~~Cachapa~~ Coelho

**Área Temática:** Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):  
(Reprodução assistida);  
(Manipulação de gametas, pré-embriões, embriões e feto);

**Versão:** 4

**CAAE:** 78044017.5.0000.5534

**Instituição Proponente:** CENTRO DE ESTUDOS E PESQUISAS DR WILSON PAES

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.627.567

**Considerações Finais a critério da CONEP:**

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB - INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO_966903.pdf	20/03/2018 19:05:19		Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_AO_PARECER_CONSUBSTANCIADO.docx	20/03/2018 19:04:20	Francisco Augusto Colucci Coelho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CONEP_02_alterado.doc	20/03/2018 19:02:30	Francisco Augusto Colucci Coelho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investidor	projeto_anexina_CONEP.doc	10/01/2018 19:25:04	Francisco Augusto Colucci Coelho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_instituicao_participante.pdf	04/09/2017 19:39:07	Francisco Augusto Colucci Coelho	Aceito
Orçamento	orcamento.docx	08/08/2017 20:36:39	Francisco Augusto Colucci Coelho	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	08/08/2017 20:21:52	Francisco Augusto Colucci Coelho	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	08/08/2017 20:15:11	Francisco Augusto Colucci Coelho	Aceito

**Situação do Parecer:**

**Aprovado**

BRASILIA, 29 de  
Abril de 2018

**Assinado por:**  
**Jorge Alves de Almeida**  
**Venancio (Coordenador)**

Endereço: SHNTV III, Via W 3 Norte - Edifício IV-300, Brasília

Bairro: Asa Norte

Município: BRASÍLIA

CEP: 70.719-000

CP: 30

Telefone: (61) 3315-1877

E-mail: conep@cpqde.gov.br

## ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



CEPEW - CENTRO DE ESTUDOS E PESQUISA DR WILSON PÁES

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa sobre uma técnica de separação de espermatozoides. Esta pesquisa tem como objetivo desenvolver um protocolo e comprovar a eficácia da técnica anexa V para ser utilizado em pacientes diagnosticados com oligoastenotermsia (concentração baixa de espermatozoides e movimentação lenta) e com isso disponibilizar uma técnica de tratamento do sêmen, visando melhorar os resultados dos tratamentos e reduzir as complicações causadas pelas alterações moleculares dos espermatozoides como o abortamento. Essa técnica já é utilizada em diversos países, nela os espermatozoides que possuem o DNA espermático danificado serão separados daqueles que não possuem o DNA danificado, antes de serem utilizados para fertilizar os óvulos.

Esta pesquisa foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do ISECENSA e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) que tem como objetivo fazer a avaliação ética de qualquer projeto de pesquisa envolvendo seres humanos, desde que este esteja conforme padrões metodológicos e científicos reconhecidos.

Garantimos que as informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Não será armazenada nenhuma amostra do material coletado e utilizado para análise.

Não haverá nenhum custo adicional por participar dessa pesquisa assim como nenhum recebimento financeiro.

Vocês receberão uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do CEP, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Em caso de dúvidas vocês podem contatar o pesquisador responsável através do endereço Rua Barão da Lagoa Dourada, 409, 2º andar, pelo telefone (22) 2734-9078 ramal 209 ou pelo email [laboratório@centrodeinfertilidade.com.br](mailto:laboratório@centrodeinfertilidade.com.br) Ou o CEP através do endereço Rua Salvador Correa, 139, Centro, pelo telefone (22) 2726-2727 ou pelo email [cepisecensa@gmail.com](mailto:cepisecensa@gmail.com)

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

\_\_\_\_\_

Participante

\_\_\_\_\_

Assinatura

\_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável

### ANEXO 3 – Questionário qualidade de vida e fertilidade masculina



#### Pesquisa Qualidade de vida e fertilidade masculina

Idade: \_\_\_\_\_ anos

Peso: \_\_\_\_\_ kg

Altura: \_\_\_\_\_ m

Tem filhos?  Sim  Não

Fez vasectomia?  Sim  Não

Teve caxumba?  Sim  Não

Teve **criptorquidia** (testículo preso)?  Sim  Não

Faz uso de medicamentos controlados?  Sim  Não

Se sim, por quanto tempo? \_\_\_\_\_

Faz uso de anabolizantes?  Sim  Não

Se sim, por quanto tempo? \_\_\_\_\_

Faz uso de drogas ilícitas?  Sim  Não

Faz uso de álcool?  Sim  Não

Se sim, quantas vezes por semana? \_\_\_\_\_

Faz uso de cigarro?  Sim  Não

Se sim, quantos ao dia? \_\_\_\_\_

Faz atividade física?  Sim  Não

Qual? \_\_\_\_\_ Quantas vezes por semana? \_\_\_\_\_

Trabalha em local com exposição a agentes químicos?  Sim  Não

Trabalha em local com exposição ao calor?  Sim  Não

Trabalha ou já trabalhou em plataformas de embarque?  Sim  Não

Considera-se fazer uso de uma alimentação saudável, ricas em frutas e vegetais?  Sim  Não

Já fez cirurgia bariátrica (de redução do estômago)?  Sim  Não

