**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Thalita Souza Berteli

**MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*) antes ou
após a centrifugação em gradiente de densidade
para o preparo seminal**

**Ribeirão Preto
2017**

Thalita Souza Berteli

**MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*) antes ou
após a centrifugação em gradiente de densidade
para o preparo seminal**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do
Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientadora: Professora Doutora Paula Andrea
de Albuquerque Salles Navarro.

**Ribeirão Preto
2017**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Berteli, Thalita Souza

MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*) antes ou após a centrifugação em gradiente de densidade para o preparo seminal. Ribeirão Preto, 2017.

Nº 74 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientadora: Navarro, Paula Andrea de Albuquerque Salles.

1. Seleção de espermatozoides
2. MACS
3. Integridade do DNA
4. Motilidade espermática.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thalita Souza Berteli

MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*) antes ou após a centrifugação em gradiente de densidade para o preparo seminal.

Dissertação apresentada ao Departamento de
Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Aprovado em : ____/____/____

Banca Examinadora

Professora Dr^a. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura: _____

Professor Dr. Wellington de Paula Martins
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura: _____

Professor Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto
Faculdade de Medicina da Universidade de Caxias do Sul -UCS

Assinatura: _____

Dedicatória

DEDICO aos meus pais, João Baptista e Liomarlene,
pelo amor, pela educação e ensinamentos que
muito me auxiliaram dando-me base necessária para esta e
outras etapas que estão por vir.
Ao Pedro e Antonella pela alegria e amor compartilhados.

Agradecimentos

À Deus por ter me dado paciência, saúde e força para perseverar em minha caminhada;

À minha orientadora Prof^ª. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro, pela amizade, paciência e conhecimento que me proporcionou; pelo exemplo de profissional e principalmente por acreditar em meu potencial, me incentivando e me guiando em meus conhecimentos;

Ao CNPQ pela bolsa de mestrado concedida;

Ao Laboratório de Pediatria, pelo auxílio com o microscópio para leitura das lâminas;

Às colegas pós graduandas pela amizade e pelo carinho, em especial à Nessa, Carol, Aline e Fernanda;

À Michi, pela grata amizade e por todo auxílio durante o mestrado;

Ao Pedro Roveri, pelo auxílio com as figuras;

Às funcionarias do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, Setor de Reprodução Humana, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, especialmente a Marilda, Cris, Camila e Roberta por todos os ensinamentos;

Aos componentes da banca avaliadora, Dr. Wellington de Paula Martins e Prof. Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto, pela disponibilidade em participar da banca;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.
OBRIGADA!

Epígrafe

*“Grandes descobertas científicas são realizadas a
partir de um olhar profundo sobre aquilo que se
parece óbvio à primeira vista”
(Autor desconhecido)*

Lista de figuras

- Figura 1.** Diagrama de fluxo do experimento: MACS – *Magnetic Activated Cell Sorting*; DGC- centrifugação em gradiente de densidade; TUNEL – Método de detecção da fragmentação do DNA por microscopia de fluorescência.....**25**
- Figura 2.** Separação de espermatozoides apoptóticos utilizando o método *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS).....**27**
- Figura 3.** Incorporação de nucleotídeos (d-UTP= 2'-desoxiuridina 5' trifosfato) marcados com corante fluorescente (Isotiocianato de fluoresceína – FITC) na região livre 3' OH das quebras do DNA fita simples ou fita dupla. Essa reação é catalisada por uma enzima transferase desoxinucleotidil terminal que irá polimerizar os nucleotídeos modificados nas regiões de fragmentação do DNA.....**28**
- Figura 4.** Comparação da fragmentação de DNA espermático, concentração, motilidade progressiva e morfologia normal entre amostras processadas por centrifugação em gradiente de densidade (DGC), *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) seguido de DGC (MACS/DGC), DGC seguido de MACS (DGC/MACS) e MACS.....**33**
- Figura 5.** Análise da integridade do DNA espermático de espermatozoides corados pelo método TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling). Sinais azuis indicam marcação do DNA espermático pelo 4',6 – diamidino -2- fenil-indol (DAPI). Sinais verdes indicam espermatozoides TUNEL-positivos. As setas indicam espermatozoides TUNEL-positivos nas imagens sobrepostas (MERGE). A) Amostra processada por MACS/DGC, B) amostra processada por DGC, C) amostra processada por MACS e D) amostra processada por DGC/MACS..... **34**

Lista de tabelas

Tabela 1. Dados descritivos dos parâmetros seminais basais da população estudada.....	32
--	-----------

Tabela 2. Comparação dos parâmetros seminais (fragmentação de DNA, concentração, motilidade progressiva e morfologia normal) das mesmas amostras processadas por centrifugação em gradiente de densidade (DGC), Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) seguido de DGC (MACS/DGC), DGC seguido de MACS (DGC/MACS) e MACS isoladamente.....	32
--	-----------

Lista de siglas

DAPI: (4',6 – diamidino -2- fenil-indol)

DGC: Density Gradient Centrifugation (Centrifugação em Gradiente de Densidade)

DNA: Ácido desoxirribonucleico

d-UTP= 2'-desoxiuridina 5' trifosfato

FITC= Isotiocianato de fluoresceína – FITC

FIV: Fertilização *in Vitro*

ICSI: Injeção Intracitoplasmática de espermatozoide

IUI: Inseminação intra-uterina

MACS: *Magnetic Activated cell Sorting* (Separação celular por ativação magnética)

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

TRA: Técnicas de Reprodução Assistida

TUNEL: *TdT-mediated dUTP Nick End Labeling* (Marcação de quebras por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase)

SPTZ: espermatozoides

Resumo

Berteli, T.S. **MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*) antes ou após a centrifugação em gradiente de densidade para o preparo seminal.**

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Estudos recentes avaliaram o papel do *Magnetic Activated cell Sorting* (MACS, separação celular por ativação magnética) para reduzir a percentagem de espermatozoides apoptóticos e melhorar a qualidade seminal. No entanto, a eficiência do uso do MACS isoladamente, antes ou depois do processamento seminal pelos métodos clássicos, como o centrifugação em gradiente de densidade (DGC), ainda não foi estabelecida, de modo que o protocolo de uso do método não foi adequadamente estabelecido. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o MACS sozinho, antes (MACS-DGC) ou depois do processamento seminal pelo DGC (DGC-MACS) melhora a seleção espermática quando comparado ao processamento pelo DGC. Realizou-se um estudo prospectivo experimental avaliando amostras de sêmen de 15 homens saudáveis. A mesma amostra foi dividida em 4 alíquotas e processada por: DGC, DGC-MACS, MACS-DGC e MACS. Após o processamento, foram analisadas a integridade do DNA espermático pelo método TUNEL - *TdT-mediated dUTP Nick End Labeling* (marcação de quebras no DNA por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase) assim como a concentração de espermatozoides, a motilidade progressiva e a morfologia, segundo os últimos critérios adotados pela Organização Mundial da Saúde. A percentagem de dano ao DNA foi significativamente menor no grupo MACS-DGC, quando comparado com DGC e MACS, e semelhante a do grupo DGC-MACS. A concentração de espermatozoides recuperados nos grupos de DGC e MACS foi similar e significativamente maior do que MACS-DGC e DGC-MACS, que foram semelhantes entre si. A motilidade progressiva dos espermatozoides recuperados foi semelhante nos grupos MACS-DGC e DGC e significativamente maior do que nos grupos DGC-MACS e MACS. O percentual de espermatozoides com morfologia normal foi significativamente maior no grupo MACS-DGC quando comparado ao DGC-MACS e MACS, e semelhante quando comparado com DGC. Desta forma, evidenciou-se que ambos os métodos combinados promovem a recuperação de espermatozoides com menor percentagem de dano ao DNA espermático. O MACS isoladamente ou aplicado após o DGC promove redução significativa dos espermatozoides progressivos recuperados, assim como da percentagem de espermatozoides com morfologia normal. Todavia, o MACS aplicado antes do DGC promove a recuperação de amostras com elevada percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva e morfologia normal, aliada a baixa percentagem de DNA fragmentado, sugerindo ser o melhor protocolo de uso desta metodologia, cuja importância clínica precisa ser avaliada em estudos clínicos bem delineados.

Palavras-chave: seleção de espermatozoides, MACS, integridade do DNA, motilidade espermática

Abstract

Berteli, T.S. *Magnetic Activated Cell Sorting* before or after the density gradient for the seminal prepared.

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Recent studies evaluated the role of Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) in order to reduce the percentage of apoptotic sperm and improve seminal quality. However, the effectiveness of using MACS alone, before or after seminal processing by classical methods, such as the density gradient centrifugation (DGC), has not yet been established. Thus, the role of the present study was evaluate whether: MACS alone, before (MACS-DGC) or after seminal processing by DGC (DGC-MACS) improves sperm selection when compared to DGC. A prospective experimental study was conducted evaluating semen samples from 15 healthy men. The same sample was divided into 4 aliquots and processed by: DGC, DGC-MACS, MACS-DGC and MACS. After processing, the integrity of the sperm DNA was analyzed by TUNEL - TdT - mediated dUTP method Nick End Labeling (marking DNA breaks by dUTP and deoxynucleotidyl terminal transferase), sperm concentration, progressive motility and morphology according to the last criteria adopted by the World Health Organization. The percentage of DNA damage was significantly lower in the MACS-DGC group, when compared to DGC and MACS, and similar to the DGC-MACS group. The concentration of spermatozoa recovered in the DGC and MACS groups was similar and significantly higher than MACS-DGC and DGC-MACS, which were similar to each other. The progressive motility was similar in the MACS-DGC and DGC groups and significantly higher than in the DGC-MACS and MACS groups. The percentage of spermatozoa with normal morphology was significantly higher in the MACS-DGC group when compared to DGC-MACS and MACS, and similar when compared to DGC. Thus, it was evidenced that both methods combined promote the recovery of spermatozoa with a lower percentage of DNA damage. MACS alone or applied after the DGC promotes a significant reduction of the progressive sperm retrieved, as well as the percentage of spermatozoa with normal morphology. However, the MACS applied before the DGC promotes the recovery of samples with a higher percentage of spermatozoa with progressive motility and normal morphology, combined with low percentage of fragmented DNA, suggesting to be the best protocol, whose clinical importance needs to be evaluated in well-delineated clinical studies.

Keywords: sperm selection, MACS, DNA integrity, sperm motility.

Sumário

I. Introdução.....	14
I.1. Infertilidade masculina.....	15
I.2. Parâmetros seminais normais	15
I.3. Principais causas de alterações nos parâmetros seminais.....	16
I.4. Análise da apoptose em espermatozoides.....	17
I.5. Magnetic Activated Cell Sorting (MACS).....	18
I.6. Justificativa do estudo.....	19
II. Objetivos.....	21
III. Material e Métodos.....	23
III.1. Centrifugação em gradiente de densidade (DGC).....	26
III.2. Separação de espermatozoides não apoptóticos (MACS).....	26
III.3. Detecção da fragmentação de DNA pela metodologia TUNEL.....	27
III.5. Análise estatística.....	29
IV. Resultados.....	30
V. Discussão.....	35
VI. Conclusões.....	41
VII. Referências bibliográficas.....	43
VIII. Anexos.....	50
Termo de consentimento.....	51
IV. Artigo.....	53

I. Introdução

I.1. Infertilidade masculina

A infertilidade é uma doença reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Considera-se que um casal é infértil quando após um ano atividade sexual regular, sem utilização de métodos contraceptivos, não consegue alcançar a gestação (Asrm, 2013a). Estima-se que 10 a 15% dos casais em idade reprodutiva sofra da doença e pelo menos 50% da infertilidade seja parcial ou totalmente atribuível a algum fator masculino (Sharlip *et al.*, 2002; Nangia *et al.*, 2011).

O espermograma é um dos primeiros passos na avaliação da infertilidade masculina. Os parâmetros seminais são avaliados de acordo com critérios estabelecidos pela OMS: cor, volume do fluido seminal (indicador da atividade secretora das glândulas anexas), odor, ph, viscosidade, número total de espermatozoides (indicador da capacidade de produção dos testículos e da desobstrução do sistema de canais pós testiculares), motilidade, morfologia e vitalidade (Who, 2010).

I.2. Parâmetros seminais normais

Embora o espermograma revele informações úteis para a avaliação inicial do homem infértil, não deve ser considerado um teste preditivo da fertilidade, pois não fornece informações sobre o potencial funcional do espermatozoide (Kumar e Singh, 2015). É importante salientar que, embora os resultados possam estar correlacionados com a "fertilidade", o exame não é uma medida direta da fertilidade (Kumar e Singh, 2015).

A OMS revisou os limites de referência mais baixos para a análise seminal e os seguintes parâmetros representam o percentil cinco (limites de referência mais baixos e intervalos de confiança de 95%), derivado de um estudo de mais de 1900 homens cujos parceiros tiveram tempo para gravidez menor ou igual a 12 meses (Kumar e Singh, 2015):

- Volume: 1.5 mL (95% CI: 1.4–1.7)
- Concentração: 15 milhões de espermatozoides/mL (95% CI: 12–16)
- Contagem total de espermatozoides: 39 milhões de espermatozoides/ejaculado (95% CI: 33–46)
- Morfologia: 4% formas normais (95% CI: 3–4), utilizando o critério “estrito” de Kruger (Kruger *et al.*, 1987).

- Vitalidade: 58% vivos (95% CI: 55–63)
- Motilidade progressiva 32% (95% CI: 31–34)
- Motilidade total (progressivos + não progressivos): 40% (95% CI: 38–42).

I.3. Principais causas de alteração dos parâmetros seminais

A infertilidade masculina pode dever-se a inúmeros fatores. Anomalias urogenitais, infecções no trato urogenital, anomalias genéticas, distúrbios endócrinos, fatores imunológicos, tóxicos, ambientais, profissionais, e a fatores ligados ao estilo de vida (Jungwirth *et al.*, 2012; Campagne, 2013), como o uso de cigarros, uso de drogas ilícitas, consumo de álcool e cafeína podem influenciar negativamente a fertilidade (Sharma *et al.*, 2013) afetando a concentração, motilidade, morfologia e vitalidade dos espermatozoides, e podendo induzir lesões ao DNA espermático. No entanto, em expressiva parcela dos casos, a causa permanece idiopática (Harton e Tempest, 2012), podendo os seus parâmetros seminais, apresentar-se normais e subnormais (Tuttelmann e Nieschlag, 2010).

Das anomalias anatômicas mais frequentes, destacam-se a varicocele (Smith *et al.*, 2006) e o criptorquidismo (Fawzy *et al.*, 2015).

Muitos fatores genéticos tem sido identificados e demonstrado afetar a fertilidade (Harton e Tempest, 2012), como as microdeleções da região AZF do cromossomo Y (Harton e Tempest, 2012) causadoras de oligozoospermia severa e azoospermia secretora; e as mutações no gene da Fibrose Cística, causadoras de agenesia bilateral dos canais deferentes e azoospermia obstrutiva (Jarzabek *et al.*, 2004). Das anomalias cromossômicas numéricas destaca-se, a Síndrome de Klinefelter (47, XXY) ocorrendo em aproximadamente 1-2 em 1000 nascidos vivos (Harton & Tempest, 2012).

A capacidade reprodutiva masculina também pode ser afetada por fatores ambientais como exposição a metais pesados, químicos, poluição e radiação (Campagne, 2013). Fatores com impacto negativo na fertilidade masculina incluem a obesidade, disruptores endócrinos presentes em alimentos e ambiente; superaquecimento do escroto e o estresse (Campagne, 2013). As infecções também são uma causa potencial da infertilidade masculina, mas têm sido mal documentadas, sendo os organismos mais comumente implicados: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium tuberculosis* (Gupta *et al.*, 2015).

Se por um lado, inúmeros fatores podem comprometer a fertilidade masculina, por outro, até o presente, as ferramentas disponíveis para avaliar a mesma são bastante

deficientes, baseando-se, principalmente, na análise de parâmetros seminais segundo os critérios da OMS, que, como acima descrito, não permitem inferir sobre o potencial funcional espermático. Neste contexto, diferentes metodologias tem sido avaliadas com a finalidade de detectar anomalias espermáticas, potencialmente passíveis de comprometer a fertilidade masculina e os resultados das técnicas de reprodução assistida (TRA).

I.4. Análise da Apoptose em espermatozoides

A formação do espermatozoide é um processo único e complexo envolvendo mudanças na arquitetura do citoplasma, substituição das histonas por proteínas de transição e a adição final das protaminas, levando à cromatina fortemente compactada (Kumaroo *et al.*, 1975). Falhas na compactação do DNA por protaminação inadequada, levariam a presença de cortes ou chanfraduras no DNA, próprios do processo de protaminação. A presença de chanfraduras endógenas em espermatozoides é característica das células apoptóticas (Gorczyca *et al.*, 1993).

A subfertilidade masculina é comumente associada a altas taxas de danos ao DNA dos espermatozoides, e esse dano tem sido correlacionado com uma ampla gama de desfechos clínicos adversos, incluindo diminuição da fertilidade, desenvolvimento embrionário desordenado, altas taxas de aborto e aumento da malformação congênita e à doenças na infância (Aitken e Koppers, 2011; Shamsi *et al.*, 2011; Beshay e Bukulmez, 2012).

Quando técnicas de reprodução assistida são utilizadas em virtude de alterações da função espermática, muitos, se não todos, os mecanismos de seleção espermáticos que a natureza tem posto em prática para assegurar a fertilização do oócito com espermatozoides saudáveis são sobrepostos. Como resultado, a fertilização é realizada *in vitro* com espermatozoides que teriam sido excluídos deste processo *in vivo* (Beshay e Bukulmez, 2012).

A homeostasia tecidual depende de uma regulação precisa entre a proliferação e morte celular. Por meio de um processo designado morte celular programada, cuja forma mais comum e mais compreendida é a apoptose, as células envelhecidas, danificadas, ou aquelas que são desnecessárias ou configuram uma ameaça para o organismo podem ser eliminadas de forma rápida e organizada (Alberts *et al.*, 2007). Durante a apoptose, são observadas alterações morfológicas, como a retração celular e nuclear, separação da matriz extracelular e das células vizinhas, condensação e marginalização da cromatina contra a membrana nuclear, formação de prolongamentos da membrana citoplasmática, condensação e fragmentação do

núcleo, formação de corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados e digeridos por macrófagos, além da fragmentação do DNA e externalização do fosfolípido fosfatidilserina para o folheto externo da membrana plasmática espermática (Bucar *et al.*, 2015).

Na presença de um mecanismo de apoptose eficiente, as células germinativas anormais são eliminadas e os espermatozoides no ejaculado deveriam ser normais (Sakkas *et al.*, 1999). Todavia, expressiva percentagem dos espermatozoides, avaliados por meio de diferentes ensaios, apresenta marcadores de dano ao DNA e apoptose (Schulte *et al.*, 2010). Sugeriu-se, então, que a presença de espermatozoides no ejaculado expressando marcadores apoptóticos possa ser o resultado de um mecanismo designado “apoptose abortiva”, que ocorre durante a espermatogênese (Sakkas *et al.*, 1999).

Por algum motivo ainda pouco esclarecido, algumas células germinativas marcadas para morrer escapam ao mecanismo de eliminação, acabando por completar o processo de remodelação que ocorre durante a espermatogênese, sendo eliminadas no ejaculado. Assim, a presença de espermatozoides com o DNA danificado no ejaculado pode ser resultado de uma tentativa falha das células germinativas em completar a apoptose (Sakkas *et al.*, 1999). Neste contexto, alguns autores evidenciaram que em pacientes oligozoospermicos a proporção de células apoptóticas parece ser maior que em pacientes normozoospermicos, possivelmente decorrente da presença da “apoptose abortiva” (Sakkas *et al.*, 1999).

1.5- Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

A translocação da fosfatidilserina, um fosfolípido com carga negativa, do folheto interno para o folheto externo da membrana plasmática espermática é um evento precoce da apoptose espermática (Martin *et al.*, 1995), sendo considerado um dos sinais para o reconhecimento específico e remoção das células apoptóticas por fagocitose (Makker *et al.*, 2008). A proteína anexina V (utilizada como um marcador de apoptose no espermatozoide) tem alta afinidade pela fosfatidilserina e quando conjugada com microesferas magnéticas submetidas a uma campo magnético em uma matriz de ferro, podem separar espermatozoides apoptóticos dos não apoptóticos. Este procedimento é chamado de *Magnetic activated cell sorting (MACS)* (Ainsworth *et al.*, 2005), e se fundamenta na separação eletroforética de espermatozoides apoptóticos (fração anexina positiva) e não apoptóticos (fração anexina negativa), sem comprometimento da sua viabilidade, permitindo o seu uso subsequente nas Técnicas de Reprodução Assistida [TRA (Ainsworth *et al.*, 2007)]. Estudos recentes têm

avaliado o uso do MACS como um método para reduzir os espermatozoides apoptóticos, visando melhorar a qualidade espermática e, conseqüentemente, as taxas de gravidez clínica após as TRA com resultados controversos (Dirican *et al.*, 2008; Romany *et al.*, 2010; Khalid e Qureshi, 2011a; b; San Celestino *et al.*, 2011; Romany *et al.*, 2012; Gil *et al.*, 2013; Romany *et al.*, 2014; Troya e Zorrilla, 2015). É possível que os resultados controversos sejam, pelo menos em parte, decorrentes da falta de padronização do uso desta técnica nos diferentes estudos.

I.6 – Justificativa do estudo

As técnicas de reprodução assistida (TRA) tem sido cada vez mais utilizadas para o tratamento da infertilidade humana. No entanto, as taxas de sucesso atuais desses procedimentos permanecem abaixo do esperado (Ishihara *et al.*, 2015). Estudos com casais inférteis tem demonstrado que o fator masculino desempenha um importante papel na infertilidade (Nadalini *et al.*, 2014). Técnicas básicas de processamento seminal têm sido utilizadas para selecionar espermatozoides morfolologicamente normais e com maior motilidade para as técnicas de reprodução assistida, baseadas na sedimentação ou migração dos espermatozoides, como o gradiente de centrifugação (DGC) e *swim-up* (SU) (Makker *et al.*, 2008), contudo, estas técnicas apresentam limitações, uma vez que, ao não utilizarem critérios moleculares relevantes para a função reprodutiva, não selecionam, necessariamente, os espermatozoides de acordo com a sua competência funcional. Dados recentes indicam que as técnicas que permitem a seleção de espermatozoides não apoptóticos podem superar algumas das limitações destes outros métodos (Said *et al.*, 2006; Nasr-Esfahani *et al.*, 2012; Sakkas, 2013; Mcdowell *et al.*, 2014; Rappa *et al.*, 2016). Embora os métodos de processamento básicos, como o DGC, demonstrem grande potencial no processamento seminal para as técnicas de reprodução assistida (Makker *et al.*, 2008), questiona-se se o processamento seminal deveria ser complementado com métodos que permitam a seleção de espermatozoides funcionalmente melhores.

Apesar da externalização da fosfatidilserina ser considerada um sinal precoce da apoptose no espermatozoide (Asrm, 2013b), alguns estudos demonstraram que a externalização da fosfatidilserina pode ser parte do processo fisiológico de capacitação e reação acrossômica, ocorrendo em espermatozoides submetidos ao DGC contendo albumina (Tavalaee *et al.*, 2012). Em um estudo com pequena casuística (Tavalaee *et al.*, 2012), evidenciou-se que a utilização do MACS antes do preparo seminal pelo DGC foi mais eficiente para recuperar

espermatozoides não-apoptóticos (Tavalaee *et al.*, 2012). Contudo, a eficácia do uso de MACS isoladamente, antes ou após o processamento seminal pelos métodos clássicos para melhorar a qualidade espermática em termos de motilidade e/ou concentração ainda não foi estabelecida (Lee *et al.*, 2010; Khalid e Qureshi, 2011b; San Celestino *et al.*, 2011; Romany *et al.*, 2012; Tavalaee *et al.*, 2012; Bucar *et al.*, 2015; Cakar *et al.*, 2016). É fundamental, antes de prosseguir com estudos investigando o potencial impacto do MACS nas TRA, definir o protocolo ideal de uso do método, o que motivou a realização do presente estudo.

II. Objetivos

Objetivo geral

Avaliar se o MACS sozinho, antes (MACS–DGC) ou depois do processamento seminal pelo DGC (DGC-MACS) melhora a seleção espermática quando comparado ao processamento pelo DGC.

Objetivos específicos

Comparar a qualidade dos espermatozoides selecionados por MACS, MACS/DGC, DGC/MACS e DGC segundo a percentagem de fragmentação do DNA espermático analisado pelo TUNEL, assim como a concentração de espermatozoides recuperados, a percentagem de espermatozoides progressivos e morfologia estrita espermática, segundo os parâmetros da OMS.

III. Material e Métodos

Desenho do estudo e aspectos éticos

Foi realizado um estudo experimental no Laboratório de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto HCFMRP-USP (nº. 679.484).

Pacientes

Os pacientes foram convidados a participar da pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) enquanto aguardavam para ser chamados para a realização de espermograma, realizado como parte do protocolo assistencial de investigação da infertilidade conjugal do Ambulatório de Esterilidade (AEST) e de Infertilidade (AIFE).

Foram incluídos no estudo, homens com idade entre 18 e 50 anos (Brahem *et al.*, 2011), com 3 a 5 dias de abstinência sexual e que não tinham histórico de câncer de qualquer localização, utilização pregressa ou atual de quimioterápicos ou outras medicações que sabidamente interfiram com a espermatogênese. Foram excluídos do estudo, homens que apresentaram concentração total abaixo de 39×10^6 espermatozoides e volume abaixo de 2,5 ml de modo a possibilitar a realização dos 4 tipos de processamento na mesma amostra. As amostras foram coletadas no período de maio de 2014 a março 2015.

Delineamento experimental

Das amostras incluídas no estudo, uma alíquota de 0,5 mL foi utilizada para a

avaliação dos parâmetros seminais basais (concentração espermática, motilidade, morfologia e vitalidade) por microscopia óptica, seguindo as recomendações da 5ª Edição do Manual da Organização Mundial de Saúde (Who, 2010).

A seguir, o fluido seminal foi removido (Tavalaee *et al.*, 2012; Bucar *et al.*, 2015) lavando-se com 2 ml de HTF modificado – HEPES buffer (Irvine Scientific, CA), seguido de centrifugação a 300g por 10 min. O pellet foi então ressuspensionado em 2,0 ml de HTF modificado – HEPES buffer e dividido em 4 frações de 0,5 ml, processadas por : 1. Centrifugação em gradiente de densidade (DGC) , 2. DGC seguido de MACS, 3. MACS seguido de DGC e 4. MACS. Sendo assim, foram realizados os 4 tipos de processamento seminal na mesma amostra, que, após o processamento, foram comparadas em relação à percentagem de fragmentação do DNA espermático analisado pelo TUNEL, assim como a concentração de espermatozoides recuperados, a percentagem de espermatozoides progressivos e morfologia estrita espermática, segundo os parâmetros da OMS (Figura 1).

Figura 1. Diagrama de fluxo do experimento: MACS – *Magnetic Activated Cell Sorting*; DGC - Centrifugação em gradiente de densidade; TUNEL – Método de detecção da fragmentação do DNA por microscopia de fluorescência.

Metodologias

1. Centrifugação em gradiente de densidade (DGC)

As amostras foram colocadas num gradiente descontínuo (Isolate – Sperm Separation Medium - Irvine Scientific, CA, USA) sobre colunas de 45 % e 90 % e centrifugou-se a 300 g durante 30 minutos (Who, 2010) à temperatura ambiente (25° C). O sedimento resultante foi centrifugado durante um período adicional de 10 minutos e ressuspenso em 0,5 ml de HTF modificado – HEPES buffer (Irvine Scientific, CA). Todo o processamento foi realizado na ausência de soro.

2. Separação de espermatozoides não apoptóticos por MACS

A partir de uma alíquota de 0,5 ml de sêmen suspenso em HTF-modificado HEPES buffer, obtido após lavagem para remoção do plasma seminal ou após DGC, foi ressuspenso com 80 µL de tampão de ligação para um total máximo de 10^7 células juntamente com 20 µL de microesferas conjugadas de anexina V, ambos do kit *Annexin-V MicroBead Kit* (Miltenyi Biotec, Huburn, CA, USA), por 15 min a temperatura ambiente. Após adicionar 400 µL de solução de ligação, a suspensão foi colocada na coluna de separação (MiniMacs; Miltenyi Biotec). Os espermatozoides marcados (anexina V positivos) ficaram retidos na coluna, enquanto os não apoptóticos e viáveis (anexina V negativos) passaram através da coluna. (Figura 2). Essa última fração foi recuperada e processada conforme previamente descrito (Bucar *et al.*, 2015).

Figura 2. Separação de espermatozoides apoptóticos utilizando o método *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS).

Fonte: <http://www.imfertilidad.com/>

3. Detecção de fragmentação espermática pela metodologia TUNEL

Resumidamente, a fragmentação do DNA espermático foi avaliada pelo método TUNEL usando o *In Situ Cell Death Detection Kit*, Fluorescein (Roche Diagnostics GmbH, IN, USA), conforme previamente descrito (Tavalaee *et al.*, 2012) e modificado pelos autores. Para avaliação da fragmentação de DNA as suspensões de espermatozoides foram centrifugadas durante cinco minutos a 300 g. O sobrenadante foi descartado e o pellet remanescente foi lavado em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X, Sigma - Aldrich, SP, Brasil). Uma gota da suspensão de espermatozoides foi espalhada sobre as lâminas, secas ao ar e fixadas por imersão em metanol a 80% (LS Chemicals, SP, Brasil) e colocados no freezer por 20 minutos. As lâminas foram permeabilizadas com 0,01% de Triton X-100 (Sigma - Aldrich, SP, Brasil) durante dois minutos e subsequentemente ajustadas com solução tampão PBS 1X (Sigma Aldrich, SP, Brasil) e secas em temperatura ambiente. O mix de nucleotídeos rTdT foi preparado para o teste e para as lâminas de controle. As quebras nas

fitas de DNA foram marcadas com fluoresceína 12-dUTP e mantidas durante 60 minutos a 37°C em uma câmara úmida protegida da luz (Figura 3). As reações foram interrompidas pela imersão dos slides em PBS 1X (Sigma - Aldrich, SP, Brasil), secas à temperatura ambiente e no escuro e posteriormente coradas com solução de Vectashield com 4',6 - diamidino -2-fenil-indol (DAPI), H 1200 Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA) e cobertas com lamínula. As amostras foram analisadas utilizando um microscópio invertido de fluorescência Nikon Eclipse E200 (Nikon Corp., Tokyo, Japão). Em cada lâmina, foram avaliados 200 espermatozoides (Tavalaee *et al.*, 2012; Delbes *et al.*, 2013; Fortunato *et al.*, 2013). Os espermatozoides com danos no DNA foram considerados TUNEL positivos.

Figura 3. Incorporação de nucleotídeos (d-UTP= 2'-desoxiuridina 5' trifosfato) marcados com corante fluorescente (Isotiocianato de fluoresceína – FITC) na região livre 3' OH das quebras do DNA fita simples ou fita dupla. Essa reação é catalisada por uma enzima denominada de transferase desoxinucleotidil terminal que irá polimerizar os nucleotídeos modificados nas regiões de fragmentação do DNA.

Figura fonte: www.sigmaaldrich.com

4. Análise estatística

A distribuição de normalidade das variáveis contínuas foi analisada por gráficos e pelo teste de Kolmogorov - Smirnov. As variáveis contínuas sem distribuição normal foram definidas como mediana (intervalo - interquartil) e comparadas entre os grupos pelo teste de Friedman. As comparações aos pares foram feitas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. O nível de significância foi definido como $p < 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism (versão 6.0, GraphPad Software , La Jolla , CA , EUA).

IV. Resultados

Foram analisados os resultados descritivos dos parâmetros seminais basais dos 15 homens incluídos no estudo, com mediana de idade de 28 anos (intervalo interquartil (IIQ) 25: 26,0 e IIC 75: 34,0). O volume seminal variou de 2,5 a 4,2 ml, com mediana de 3,1 (intervalo interquartil (IIQ) 25: 2,8 e IIC 75: 3,5). A concentração total de espermatozoides variou de 75,0 a 458,0 com mediana de 172,0 (intervalo interquartil (IIQ) 25: 118,0 e IIC 75: 214,0). A concentração de espermatozoides variou de 25,0 a 183,0 milhões por ml, com mediana de 51,0 (intervalo interquartil (IIQ) 25: 39,0 e IIC 75: 66,0). A percentagem de espermatozoides com morfologia normal, variou entre 2% e 9% , com mediana de 5,0 % (intervalo interquartil (IIQ) 25: 4,0 e IIC 75: 7,0). A percentagem de motilidade progressiva variou de 12% a 87% , com mediana de 39,0 (intervalo interquartil (IIQ) 25: 19,0 e IIC 75: 59,0). A percentagem de fragmentação do DNA espermático, avaliado por TUNEL, variou de 6,0% a 29,0%, com mediana de 24,0 % (intervalo interquartil (IIQ) 25: 9,0 e IIC 75: 26,0). A percentagem de espermatozoides vivos variou de 71,0% a 95,0% com mediana de 85,0 % (intervalo interquartil (IIQ) 25: 77,0 e IIC 75: 88,0) (Tabela 1).

A tabela 2 e figura 4 mostram os parâmetros das mesmas 15 amostras após diferentes protocolos de seleção. O percentual de danos ao DNA espermático avaliado por TUNEL foi significativamente menor no grupo MACS-DGC (figura 5A) quando comparado aos grupos DGC (figura 5B) e MACS (figura 5C) e similar ao grupo DGC-MACS (figura 5D).

A concentração de espermatozoides recuperados nos grupos DGC e MACS foi similar e significativamente maior do que nos grupos MACS-DGC e DGC-MACS, que foram similares entre si .

A motilidade progressiva dos espermatozoides recuperados foi similar nos grupos MACS-DGC e DGC e significativamente maior do que nos grupos MACS e DGC-MACS.

O percentual médio de morfologia normal foi significativamente maior no grupo MACS-DGC quando comparado aos grupos DGC-MACS e MACS e similar quando comparado ao grupo DGC.

Tabela 1. Dados descritivos dos parâmetros seminais basais da população estudada

Parâmetro seminal	Mediana	IQR		Mínimo	Máximo
Concentração	51	39	66	25	183
% de sptz progressivos	39	19	59	12	87
Morfologia	5	4	7	2	9
Vitalidade	85	77	88	71	95
% de sptz com dano DNA	24	9	26	6	29

Nota: %: percentagem; sptz: espermatozóides. IQR; intervalo interquartil (25 – 75).

Tabela 2. Comparação dos parâmetros seminais (fragmentação de DNA, concentração, motilidade progressiva e morfologia normal) das mesmas amostras processadas por centrifugação em gradiente de densidade (DGC), Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) seguido de DGC (MACS/DGC), DGC seguido de MACS (DGC/MACS) e MACS isoladamente.

	DGC	DGC-MACS	MACS-DGC	MACS
Fragmentação DNA (%)	10 (5-16) ^a	6 (3-11) ^b	4 (2-7) ^{a,c}	8 (6-16) ^{b,c}
Concentração	12 (7-16) ^{a,b}	5 (3-9) ^{a,c}	4 (3-7) ^{b,d}	15 (13-24) ^{c,d}
Motilidade progressiva (%)	61 (39-76) ^{a,b}	10 (2-20) ^{a,c}	68 (44-78) ^{c,d}	11 (2-27) ^{b,d}
Morfologia normal (%)	6 (5-7)	5 (4-6) ^a	7 (6-9) ^{a,b}	5 (4-8) ^b

Nota: Fragmentação de DNA espermático avaliada por TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling). Dados apresentados em mediana (interval interquartil 25 – 75). Letras iguais na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

Figura 4. Comparação da fragmentação de DNA espermático, concentração, motilidade progressiva e morfologia normal entre amostras processadas por centrifugação em gradiente de densidade (DGC), Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) seguido de DGC (MACS/DGC), DGC seguido de MACS (DGC/MACS) e MACS.

Figura 5. Análise da integridade do DNA espermático de espermatozoides corados pelo método TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling). Sinais azuis indicam marcação do DNA espermático pelo 4',6 – diamidino-2- fenil-indol (DAPI). Sinais verdes indicam espermatozoides TUNEL-positivos. As setas indicam espermatozóides TUNEL-positivos nas imagens sobrepostas (MERGE). A) Amostra processada por MACS/DGC, B) amostra processada por DGC, C) amostra processada por MACS e D) amostra processada por DGC/MACS.

V. Discussão

Entre os quatro métodos de processamento seminal avaliados (DGC, DGC/MACS, MACS/DGC e MACS), os dois métodos combinados (MACS/DGC e DGC/MACS) permitiram recuperar espermatozoides com menor percentagem de DNA fragmentado. O MACS isoladamente ou aplicado após o DGC promoveu uma redução significativa de espermatozoides progressivos recuperados, assim como a percentagem de espermatozoides com morfologia normal. Contudo, o MACS aplicado antes do DGC promoveu a recuperação de amostras com uma maior percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva e morfologia normal, combinado a baixa percentagem de fragmentação de DNA.

Até o presente, poucos estudos investigaram qual o melhor protocolo de utilização do MACS no preparo seminal em termos de obtenção de espermatozoides com maior potencial reprodutivo avaliado pela percentagem de fragmentação do DNA espermático, motilidade progressiva e morfologia estrita. A maioria dos estudos compara a eficácia do MACS isoladamente, com os métodos clássicos de processamento seminal (DGC ou SU) em termos de obtenção de espermatozoides com menor percentagem de fragmentação. Poucos estudos compararam os métodos de separação de espermatozoides combinados em termos de obtenção de espermatozoides com melhor qualidade (Tavalaee *et al.*, 2012; Nadalini *et al.*, 2014; Bucar *et al.*, 2015; Cakar *et al.*, 2016).

Tavalaee *et al.*, 2012 analisaram amostras seminais obtidas de 15 pacientes inférteis, processadas utilizando os quatro métodos que utilizamos no presente estudo, e verificaram uma redução de aproximadamente 30% na fragmentação do DNA espermático com a aplicação do DGC ou do MACS isoladamente; de 40% utilizando o processamento DGC-MACS e 49% utilizando o processamento MACS-DGC (Tavalaee *et al.*, 2012), corroborando nossos achados em que os procedimentos combinados (DGC-MACS e MACS-

DGC) obtiveram uma percentagem significativamente menor de fragmentação de DNA. Todavia, neste estudo, não foram comparados entre os quatro métodos de processamento seminal, outros importantes parâmetros relacionados a qualidade seminal, como a concentração e a motilidade progressiva, sendo o presente estudo o primeiro a avaliar estas variáveis concomitantemente em um protocolo utilizando MACS e DGC.

Bucar *et al.*, 2015, distribuíram amostras seminais de 100 homens aleatoriamente em 5 grupos distintos de processamento seminal, analisando apenas métodos combinados de processamento seminal: (DGC-SU: *swim up*); (DGC-MACS-SU); (DGC-SU-MACS); (MACS-DGC-SU); (MACS-SU). Os cinco grupos apresentaram redução significativa na fragmentação do DNA espermático: DGC-SU (73%), DGC-MACS-SU (78.9%) , DGC-SU-MACS (53.8%), MACS-SU (73.5%), sendo que o grupo MACS-DGC-SU apresentou a maior redução (83.3 %). Entretanto, os autores não avaliaram o processamento seminal utilizando MACS-DGC e DGC-MACS, não comparam os cinco métodos em relação a morfologia e à concentração de espermatozoides progressivos recuperados, assim como não avaliaram os diferentes métodos de processamento nas mesma amostras, como realizado no presente estudo.

Cakar *et al.*, 2016 avaliaram se a combinação da separação celular por MACS com centrifugação em gradiente de densidade (DGC) ou *swim up* (SU) poderia melhorar a seleção de espermatozoides. Porém neste estudo, o MACS só foi utilizado após o DGC ou o SU. Em comparação com amostras à fresco, a concentração de espermatozoides progressivos e a concentração espermática diminuiu significativamente em ambos os métodos combinados (SU-MACS e DGC-MACS), mostrando que o MACS utilizado após os protocolos clássicos de processamento seminal não parece ser o melhor protocolo (Cakar *et al.*, 2016), o que foi confirmado pelos nossos achados.

Como a motilidade progressiva é fundamental para o sucesso reprodutivo de técnicas de reprodução assistida, como a *inseminação intra-uterina* (IUI) e a fertilização *in vitro* [FIV; (Van Voorhis *et al.*, 2001; Berker *et al.*, 2012; Sakkas *et al.*, 2015)], avaliar a eficácia dos métodos também em relação a este parâmetro é fundamental e, pela primeira vez, evidenciamos que o MACS utilizado antes do processamento seminal pelo DGC promove a obtenção de um percentual expressivamente maior de espermatozoides progressivos do que quando o método é aplicado após o DGC (68% vs. 10%), simultaneamente avaliando a motilidade, concentração e percentual de espermatozoides não apoptóticos no mesmo protocolo.

No presente estudo verificarmos um aumento da morfologia normal apenas quando o MACS foi utilizado antes do DGC, diferentemente de Tavalae *et al.*, (2012), que observaram aumento da morfologia normal com uso de MACS tanto antes, como após o DGC. Por outro lado, (Said *et al.*, 2005; Aziz *et al.*, 2007) não demonstraram melhora da morfologia espermática com o uso do MACS após o DGC, porém, diferentemente do nosso estudo não foi testado o uso de MACS antes do DGC no qual evidenciamos um aumento da morfologia normal. Pelo contrário, evidenciaram uma diminuição da morfologia espermática, mas apenas em pacientes normozoospermicos (Delbes *et al.*, 2013). Na atualidade o impacto da morfologia espermática na fertilidade natural e sucesso das TRA permanece pouco elucidado (Nikbakht e Saharkhiz, 2011; Sakkas *et al.*, 2015), de modo que não é possível inferir se a recuperação de maior percentagem de espermatozoides com morfologia normal poderia impactar positivamente os resultados das TRA.

Os estudos que compararam as taxas de gestação após TRA entre os diferentes métodos de processamento seminal utilizando o MACS, utilizaram o MACS em diferentes protocolos, com resultados controversos (Dirican *et al.*, 2008; Romany *et al.*, 2010; Khalid e Qureshi, 2011a; b; San Celestino *et al.*, 2011; Romany *et al.*, 2012; Romany *et al.*, 2014;

Troya e Zorrilla, 2015; Horta *et al.*, 2016) o que pode, entre outros fatores, ser decorrente da falta de padronização do melhor protocolo de uso desta metodologia. Cabe ressaltar que os estudos que utilizaram o MACS para o processamento seminal, o fizeram isoladamente (Dirican *et al.*, 2008; Alvarez Sedó *et al.*, 2010; Nikbakht e Saharkhiz, 2011; Van Thillo *et al.*, 2011) ou após o SU (Romany *et al.*, 2010; Romany *et al.*, 2014), ou DGC (Rawe *et al.*, 2010; Khalid e Qureshi, 2011b; Nadalini *et al.*, 2014). Um único estudo avaliou MACS antes do DGC, (Tavalaee *et al.*, 2012), mas não avaliaram a eficácia deste procedimento combinado de processamento seminal em termos de motilidade e concentração.

Nossos achados sugerem que o protocolo MACS-DGC parece ser o método mais eficaz em termos de obtenção de amostras com menor percentagem de fragmentação e maior percentagem de motilidade progressiva e morfologia normal.

Como apontado anteriormente, tem sido mostrado que a externalização da fosfatidilserina pode ser parte de um processo fisiológico de capacitação e reação acrossômica que ocorre em espermatozoides submetidos ao DGC (Tavalaee *et al.*, 2012) o que fisiologicamente justifica o uso de MACS antes do DGC. Alguns estudos têm mostrado que as colunas MACS parecem causar uma ligeira diminuição da motilidade (Paasch *et al.*, 2003; Grunewald *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010), e a população de espermatozoides expostos à coluna MACS parecem ser mais susceptíveis às alterações mecânicas e forças magnéticas dentro da coluna, o que pode resultar em defeitos da cauda (Paasch *et al.*, 2003). Estes defeitos podem ser removidos e a ligeira diminuição da motilidade melhorada, aplicando DGC após MACS, como evidenciado no presente estudo. Além disso, as microesferas remanescentes após MACS podem ser retiradas usando DGC, o que, potencialmente, tornaria o procedimento mais seguro para fins clínicos (Tavalaee *et al.*, 2012).

O presente estudo não traz implicações clínicas diretas, mas levanta a possibilidade de avaliar o protocolo utilizando o MACS, seguido do DGC, como método de processamento

seminal passível de melhorar as taxas de nascidos vivos em ciclos de IUI e FIV, o que precisa ser investigado em estudos clínicos controlados bem delineados.

Uma limitação do presente estudo foi o pequeno tamanho amostral, sendo justificado pela necessidade de amostras com concentração total acima de 39×10^6 espermatozoides e volume mínimo de 2,5 mL, de modo a possibilitar que a mesma amostra processada pelos 4 métodos de processamento analisados. Todavia, utilizar os 4 métodos de processamento na mesma amostra reduz vieses relacionados ao potencial impacto da amostra e não do processamento nos desfechos avaliados. Contudo, como recrutamos homens que investigavam a infertilidade em nosso Centro de Fertilização *in vitro*, a maioria deles tinha parâmetros seminais anormais limitando o tamanho da amostra. Assim, estudos com maior casuística seriam necessários para confirmar nossos resultados. Outra limitação é que os presentes achados só podem ser extrapolados para homens com os critérios de elegibilidade adotados e novos estudos são necessários para validar nossos achados em homens com parâmetros anormais do sêmen.

VI. Conclusões

Entre os quatro métodos de processamento seminal utilizados (DGC, DGC-MACS, MACS-DGC e MACS), os métodos combinados (MACS-DGC e DGC-MACS) foram os que permitiram recuperar um menor número de espermatozoides com fragmentação do DNA. Os dois procedimentos combinados recuperaram uma concentração similar de espermatozoides. O MACS isoladamente ou aplicado após o DGC promoveu uma redução significativa dos espermatozoides progressivos recuperados, assim como da percentagem de espermatozoides com morfologia normal. Todavia, o MACS utilizado antes do DGC permitiu a recuperação de uma percentagem maior de espermatozoides com motilidade progressiva e com morfologia normal quando comparado ao DGC-MACS.

Considerando que o dano ao DNA espermático possa ser um fator deletério ao sucesso das TRA, os presentes achados sugerem que, para os procedimentos de reprodução assistida em que a motilidade progressiva seja um importante fator relacionado ao sucesso reprodutivo como a inseminação intrauterina e a fertilização *in vitro*, o MACS, utilizado antes do DGC possa ser o melhor protocolo em termos de recuperação de espermatozoides com maior potencial reprodutivo, pois permitiu, ao mesmo tempo, recuperar mais espermatozoides sem danos ao DNA e com maior motilidade progressiva. Estudos clínicos randomizados e controlados, bem delineados, precisam ser conduzidos, comparando os métodos clássicos de processamento seminal com o protocolo combinado, utilizando o MACS antes do DGC, para investigar se o protocolo combinado promove melhora das taxas de nascidos vivos ou não e estabelecer potenciais grupos de pacientes que se beneficiariam do seu uso.

VII. Referências Bibliográficas¹

)

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT 6023)

AINSWORTH, C.; NIXON, B.; AITKEN, R. J. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. **Hum Reprod**, v. 20, n. 8, p. 2261-70, Aug 2005. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831507> >.

AINSWORTH, C. et al. First recorded pregnancy and normal birth after ICSI using electrophoretically isolated spermatozoa. **Hum Reprod**, v. 22, n. 1, p. 197-200, Jan 2007. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16971383> >.

AITKEN, R. J.; KOPPERS, A. J. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. **Asian J Androl**, v. 13, n. 1, p. 36-42, Jan 2011. ISSN 1745-7262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20802502> >.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. et al. Apoptosis. In: *Molecular Biology of the Cell*, Chap. 18, 5th edition (Anderson, M. & Granum, S., Eds.). Garland Science, New York, USA, pp. 1115-1129, 2007.

ALVAREZ SEDÓ, C. et al. **Clinical outcome using non-apoptotic sperm selection for ICSI procedures: report of 1 year experience.** 94(4):S232. *Fertility and Sterility* 2010.

ASRM. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. **Fertil Steril**, v. 99, n. 1, p. 63, Jan 2013a. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23095139> >.

_____. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. **Fertil Steril**, v. 99, n. 3, p. 673-7, Mar 2013b. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23391408> >.

AZIZ, N. et al. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. **Hum Reprod**, v. 22, n. 5, p. 1413-9, May 2007. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17303629> >.

BERKER, B. et al. Absence of rapid and linear progressive motile spermatozoa "grade A" in semen specimens: does it change intrauterine insemination outcomes? **Urology**, v. 80, n. 6, p. 1262-6, Dec 2012. ISSN 1527-9995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23040198> >.

BESHAY, V. E.; BUKULMEZ, O. Sperm DNA damage: how relevant is it clinically? **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 24, n. 3, p. 172-9, Jun 2012. ISSN 1473-656X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22366964> >.

BRAHEM, S. et al. The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. **J Assist Reprod Genet**, v. 28, n. 5, p. 425-32, May 2011. ISSN 1573-7330. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21287403> >.

BUCAR, S. et al. DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. **J Assist Reprod Genet**, v. 32, n. 1, p. 147-54, Jan 2015. ISSN 1573-7330. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25374393> >.

CAKAR, Z. et al. Does combining magnetic-activated cell sorting with density gradient or swim-up improve sperm selection? **J Assist Reprod Genet**, v. 33, n. 8, p. 1059-65, Aug 2016. ISSN 1573-7330. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27233651> >.

CAMPAGNE, D. M. Can Male Fertility Be Improved Prior to Assisted Reproduction through The Control of Uncommonly Considered Factors? **Int J Fertil Steril**, v. 6, n. 4, p. 214-23, Jan 2013. ISSN 2008-076X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24520443> >.

DELBES, G. et al. The use of complimentary assays to evaluate the enrichment of human sperm quality in asthenoteratozoospermic and teratozoospermic samples processed with Annexin-V magnetic activated cell sorting. **Andrology**, v. 1, n. 5, p. 698-706, Sep 2013. ISSN 2047-2927. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23843365> >.

DIRICAN, E. K. et al. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. **J Assist Reprod Genet**, v. 25, n. 8, p. 375-81, Aug 2008. ISSN 1058-0468. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18810633> >.

FAWZY, F. et al. Cryptorchidism and Fertility. **Clin Med Insights Reprod Health**, v. 9, p. 39-43, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26740750> >.

FORTUNATO, A. et al. **Sperm DNA Fragmentation Assays Correlate with Sperm Abnormal Morphology and the Pregnancy Outcome.**: J Fertil In Vitro. 1:101 2013.

GIL, M. et al. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. **J Assist Reprod Genet**, v. 30, n. 4, p. 479-85, Apr 2013. ISSN 1573-7330. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23468098> >.

GORCZYCA, W. et al. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. **Exp Cell Res**, v. 207, n. 1, p. 202-5, Jul 1993. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8391465> >.

GRUNEWALD, S. et al. Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. **Fertil Steril**, v. 92, n. 2, p. 572-7, Aug 2009. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18823884> >.

GUPTA, R.; SINGH, P.; KUMAR, R. **Should men with idiopathic obstructive azoospermia be screened for genitourinary tuberculosis?** J Hum Reprod Sci: 43-47 p. 2015.

HARTON, G. L.; TEMPEST, H. G. Chromosomal disorders and male infertility. **Asian J Androl**, v. 14, n. 1, p. 32-9, Jan 2012. ISSN 1745-7262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22120929> >.

HORTA, F. et al. **Male Factor Infertility Outcomes Using Magnetic Activated Cell Sorting in Intra Cytoplasmic Sperm Injection Cycles**. *Andrology* (Los Angel). 5 2016.

ISHIHARA, O. et al. International committee for monitoring assisted reproductive technologies: world report on assisted reproductive technologies, 2007. **Fertil Steril**, v. 103, n. 2, p. 402-13.e11, Feb 2015. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25516078> >.

JARZABEK, K. et al. Cystic fibrosis as a cause of infertility. **Reprod Biol**, v. 4, n. 2, p. 119-29, Jul 2004. ISSN 1642-431X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15297887> >.

JUNGWIRTH, A. et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. **Eur Urol**, v. 62, n. 2, p. 324-32, Aug 2012. ISSN 1873-7560. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22591628> >.

KHALID, S.; QURESHI, I. **Effect of magnetic selected sperm on fertilization and embryo development: an animal model study**. 96(3):S169. *Fertility and Sterility*.: Elsevier Ltd. 2011a.

_____. **Pregnancy rate improves in couples with unexplained infertility following intrauterine insemination (IUI) with magnetically selected non-apoptotic sperms**. 96(3):S25. *Fertility and Sterility*: Elsevier Ltd. 2011b.

KRUGER, T. F. et al. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. **Urology**, v. 30, n. 3, p. 248-51, Sep 1987. ISSN 0090-4295. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3629768> >.

KUMAR, N.; SINGH, A. K. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. **J Hum Reprod Sci**, v. 8, n. 4, p. 191-6, 2015 Oct-Dec 2015. ISSN 0974-1208. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26752853> >.

KUMAROO, K. K.; JAHNKE, G.; IRVIN, J. L. Changes in basic chromosomal proteins during spermatogenesis in the mature rat. **Arch Biochem Biophys**, v. 168, n. 2, p. 413-24, Jun 1975. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1137406> >.

LEE, T. H. et al. Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. **Hum Reprod**, v. 25, n. 4, p. 839-46, Apr 2010. ISSN 1460-2350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150175> >.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. K. Magnetic activated cell sorting (MACS): utility in assisted reproduction. **Indian J Exp Biol**, v. 46, n. 7, p. 491-7, Jul 2008. ISSN 0019-5189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18807751> >.

MARTIN, S. J. et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J Exp Med**, v. 182, n. 5, p. 1545-56, Nov 1995. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7595224> >.

MCDOWELL, S. et al. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 10, p. CD010461, Oct 2014. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25348679> >.

NADALINI, M. et al. Annexin V magnetic-activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: is the new approach better then the traditional one? **J Assist Reprod Genet**, v. 31, n. 8, p. 1045-51, Aug 2014. ISSN 1573-7330. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24906302> >.

NANGIA, A. K. et al. National study of factors influencing assisted reproductive technology outcomes with male factor infertility. **Fertil Steril**, v. 96, n. 3, p. 609-14, Sep 2011. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21733503> >.

NASR-ESFAHANI, M. H.; DEEMEH, M. R.; TAVALAEE, M. New era in sperm selection for ICSI. **Int J Androl**, v. 35, n. 4, p. 475-84, Aug 2012. ISSN 1365-2605. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22804455> >.

NIKBAKHT, R.; SAHARKHIZ, N. The influence of sperm morphology, total motile sperm count of semen and the number of motile sperm inseminated in sperm samples on the success of intrauterine insemination. **Int J Fertil Steril**, v. 5, n. 3, p. 168-73, Oct 2011. ISSN 2008-076X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25101161> >.

PAASCH, U. et al. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. **J Androl**, v. 24, n. 2, p. 246-52, 2003 Mar-Apr 2003. ISSN 0196-3635. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634312> >.

RAPPA, K. L. et al. Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? **Biotechnol Adv**, v. 34, n. 5, p. 578-87, 2016 Sep-Oct 2016. ISSN 1873-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26845061> >.

RAWE, V. Y. et al. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. **Reprod Biomed Online**, v. 20, n. 3, p. 320-3, Mar 2010. ISSN 1472-6491. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096634> >.

ROMANY, L. et al. **Effect of sperm selection by annexin-V sorting prior to ICSI in ovum donation program. Preliminary data**. 24(Suppl1):S2. Reproductive Biomedicine Online. 2012.

_____. Removal of annexin V-positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males. **Fertil Steril**, v. 102, n. 6, p. 1567-75.e1, Dec 2014. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25305728> >.

_____. **Magnetic activated sorting selection (MACS) of nonapoptotic sperm (NAS) improves pregnancy rates in homologous intrauterine insemination (IUI). Preliminary data**. 94(4):S14. Fertility and Sterility: Elsevier Ltd. 2010.

SAID, T. et al. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. **Biol Reprod**, v. 74, n. 3, p. 530-7, Mar 2006. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16306419> >.

SAID, T. M. et al. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. **Reprod Biomed Online**, v. 10, n. 6, p. 740-6, Jun 2005. ISSN 1472-6483. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15970004> >.

SAKKAS, D. Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. **Fertil Steril**, v. 99, n. 4, p. 1023-9, Mar 2013. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23357456> >.

SAKKAS, D.; MARIETHOZ, E.; ST JOHN, J. C. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. **Exp Cell Res**, v. 251, n. 2, p. 350-5, Sep 1999. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471320> >.

SAKKAS, D. et al. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? **Hum Reprod Update**, v. 21, n. 6, p. 711-26, 2015 Nov-Dec 2015. ISSN 1460-2369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26386468> >.

SAN CELESTINO, M. et al. **Improved pregnancy rate after sperm magnetic separation technique in egg donation cycles using frozen sperm samples**. 26 suppl 1:i123-48. Human Reproduction 2011.

SCHULTE, R. T. et al. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. **J Assist Reprod Genet**, v. 27, n. 1, p. 3-12, Jan 2010. ISSN 1573-7330. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20012685> >.

SHAMSI, M. B.; IMAM, S. N.; DADA, R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. **J Assist Reprod Genet**, v. 28, n. 11, p. 1073-85, Nov 2011. ISSN 1573-7330. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21904910> >.

SHARLIP, I. D. et al. Best practice policies for male infertility. **Fertil Steril**, v. 77, n. 5, p. 873-82, May 2002. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12009338> >.

SHARMA, R. et al. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 11, p. 66, Jul 2013. ISSN 1477-7827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23870423> >.

SMITH, R. et al. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. **Hum Reprod**, v. 21, n. 4, p. 986-93, Apr 2006. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16361286> >.

TAVALAEE, M. et al. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? **J Assist Reprod Genet**, v. 29, n. 1, p. 31-8, Jan 2012. ISSN 1573-7330. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22170231> >.

TROYA, J.; ZORRILLA, I. Annexin V-MACS in infertile couples as method for separation of sperm without DNA fragmentation. **JBRA Assist Reprod**, v. 19, n. 2, p. 66-9, May 2015. ISSN 1518-0557. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27206090> >.

TUTTELMANN, F. & NIESCHLAG, E. Classification of Andrological Disorders. In: **Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction**, Chap. 4, 3rd edition (Nieschlag, E., Behre, H., Nieschlag, S., Eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 87-92, 2010.

VAN THILLO, G. G., M. et al. **Biological safety and live births after selection of non-apoptotic spermatozoa during ICSI**. 96(3):S160-1. Fertility and Sterility: Elsevier Ltd. 2011.

VAN VOORHIS, B. J. et al. Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 75, n. 4, p. 661-8, Apr 2001. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287015> >.

WHO, W. H. O. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. . 5th ed.: Geneva 2010.

VIII. Anexos

Anexo I

Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado, como voluntário, a participar da pesquisa cujo título é: “MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*) antes ou após a centrifugação em gradiente de densidade para o preparo seminal: qual método é mais adequado para o congelamento seminal? “

A justificativa, os objetivos e os procedimentos: A criopreservação (congelamento) seminal é a forma mais efetiva para a tentativa de preservação de fertilidade masculina, recomendada em situações nas quais o homem será submetido a procedimentos (por exemplo, uso de quimioterapia para o tratamento do câncer) que podem comprometer a sua fertilidade (capacidade de engravidar uma mulher). Todavia, a criopreservação seminal promove redução de alguns parâmetros da qualidade seminal após o descongelamento, com destaque para a vitalidade e motilidade dos espermatozoides (células reprodutivas masculinas), além de favorecer a apoptose (ou morte celular programada) espermática. A utilização do MACS, um método não invasivo e inócuo, permite a separação de uma fração de espermatozoides contendo mais espermatozoides com morfologia normal e sem evidências de apoptose, o que potencialmente permitiria a melhora da qualidade do sêmen após o descongelamento seminal. Até o presente, não dispomos de estudos avaliando se utilização do MACS antes ou após a capacitação dos espermatozoides usando a centrifugação por gradiente de densidade (DGC), promoveria a melhora da qualidade seminal após o descongelamento, o que nos motivou a realizar o presente estudo, cujo objetivo geral é avaliar o papel do preparo seminal utilizando o MACS antes ou após o DGC para o congelamento seminal na qualidade seminal após o descongelamento.

A sua participação neste estudo consistiria em fornecer uma alíquota do sêmen que você irá colher hoje, no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, para a realização do seu espermograma, que foi solicitado para avaliar a sua qualidade seminal. Habitualmente, uma alíquota do sêmen é usada para fazer o espermograma e o restante é descartado. Desta forma, pedimos que doe a alíquota que seria descartada, para ser utilizada no presente estudo. Esta alíquota será dividida em cinco frações: uma será congelada sem ser processada, uma será processada pelo MACS e após congelada, uma será processada pelo MACS, seguido do DGC e depois processada, uma será processada pelo DGC e depois congelada e a outra será processada pelo DGC seguido da MACS e depois congelada. Após o descongelamento, alguns parâmetros da qualidade seminal serão analisados nas cinco frações, para verificar qual dos procedimentos promoveu melhora da qualidade seminal após o descongelamento.

Desconforto e riscos: A participação neste estudo não promove qualquer desconforto ou risco, pois apenas prevê a doação de parte da amostra seminal coletada para outra finalidade (realização do espermograma, solicitado para investigação da infertilidade conjugal) para uso no presente estudo, após o que será totalmente descartada seguindo as normas de biossegurança.

Garantia de esclarecimento. Liberdade de recusa e garantia de sigilo: Você será esclarecido sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu

consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados de exames porventura realizados serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado. Você não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e outra será fornecida a você.

Custos da participação, ressarcimento e indenização por eventuais danos: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

Benefícios diretos e indiretos

A participação neste estudo não trará qualquer benefício direto a você. Como benefício indireto, estará ajudando a avaliar métodos que podem ajudar melhorar a qualidade seminal após a criopreservação seminal.

Declaração do participante:

Eu, _____ fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar.

As pesquisadoras Paula Andrea Navarro e/ou Thalita Berteli certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais. Em caso de dúvidas poderei chamar a pesquisadora Paula Andrea Navarro e/ou Thalita Berteli no telefone (16)3602-2816; procurá-las diretamente Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, sito à avenida Bandeirantes, 3900, Campus Universitário da USP, 1º andar, Ribeirão Preto, SP; ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, situado na Avenida dos Bandeirantes, 3900, Campus Universitário da USP, 1º andar, Ribeirão Preto, SP.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
Nome	Assinatura da Testemunha	Data

IX. Artigo

Magnetic activated cell sorting before density gradient centrifugation improves recovery of high quality spermatozoa

Berteli TS¹, Da Broi MG¹, Martins WP¹; Ferriani RA¹, Navarro PA¹

¹ Human Reproduction Division, Department of Gynecology and Obstetrics, Ribeirao Preto School of Medicine, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil

Berteli TS (*)

*Correspondence address: Avenida Bandeirantes, 3900 – Ribeirao Preto, SP, CEP: 14049-900, Brazil.

Phone: +55-16-3602-2821; Fax: +55-16-3633-0946; E-mail: thalitabertelli@gmail.com.

Study funding/competing interest(s): This study was financially supported by the National Institute of Hormones and Women's Health, CNPq, Brazil. The authors affirm that there are no conflicts of interest.

Magnetic activated cell sorting before density gradient centrifugation improves recovery of high quality spermatozoa

Abstract

Recent studies have evaluated the use of magnetic activated cell sorting (MACS) to reduce apoptotic sperm and improve sperm quality. However, the efficiency of using MACS alone, before or after sperm processing by density gradient centrifugation (DGC) has not yet been established. The purpose of the present study is to determine the optimal protocol of MACS in assisted reproduction techniques (ART). Thus, we compared sperm quality obtained by DGC alone (DGC), DGC followed by MACS (DGC-MACS), MACS followed by DGC (MACS-DGC), and MACS alone (MACS), and found that the combined methods (MACS-DGC and DGC-MACS) led to retrieval of less sperm with fragmented DNA compared to the single protocols. However, MACS-DGC protocol led to a significantly higher percentage of spermatozoa with progressive motility and normal morphology than DGC-MACS protocol. These findings suggest the potential clinical value of using MACS-DGC to improve sperm quality in seminal preparation for ART.

Keywords: sperm selection, MACS, DNA integrity, sperm motility.

Introduction

Assisted reproduction techniques (ARTs) are widely used for treatment of human infertility. However, the success rates of these procedures are less than desired (Ishihara *et al.*, 2015). Studies of infertile couples indicated that male factors are a major cause of infertility (Nadalini *et al.*, 2014). Male subfertility is commonly associated with high rates of DNA damage in the spermatozoa, and such damage has, in turn, been correlated with wide range of adverse clinical outcomes including impaired fertility, disordered embryonic development, high rates of miscarriage and an increased congenital malformation and childhood diseases (Aitken and Koppers, 2011; Shamsi *et al.*, 2011; Beshay and Bukulmez, 2012). When ART is used to address defective sperm function, fertilization is being achieved *in vitro* with spermatozoa that would have been excluded from this process *in vivo* (Beshay and Bukulmez, 2012).

DNA damage in spermatozoa can affect both mitochondrial as well as nuclear DNA (Sakkas and Alvarez, 2010). Alterations in chromatin remodeling during the process of spermiogenesis could result in DNA fragmentation and the presence of DNA nicks in ejaculated sperm may be indicative of incomplete maturation during spermiogenesis (Sakkas and Alvarez, 2010). Activation of caspases, disruption of mitochondrial membrane potential, and increased DNA fragmentation are some of the apoptotic features that have been identified in ejaculated spermatozoa (Gorczyca *et al.*, 1993; Said *et al.*, 2008). In the presence of efficient apoptosis, abnormal germ cells are eliminated so that only normal sperm cells are present in the ejaculate (Sakkas *et al.*, 1999). For some reason, certain germ cells marked for apoptosis “escape” the elimination mechanism, and complete the remodeling process during spermatogenesis. Therefore, production of ejaculated spermatozoa that possess

apoptotic markers indicate that, in some men with abnormal sperm parameters, an ‘abortive apoptosis’ has taken place (Sakkas *et al.*, 1999).

Basic techniques of seminal processing are used to select sperm cells that have normal morphology and motility. Sperm preparation techniques are based on sperm sedimentation or migration, density gradient centrifugation (DGC), and “swim up” (SU) behavior (Makker *et al.*, 2008). However, these procedures have limitations, because they do not use molecular criteria to assess reproductive function, so the selected cells do not necessarily have the greatest functional competence. Although basic seminal processing methods, such as DGC, show great potential for ART (Makker *et al.*, 2008), additional processing methods may complement these methods and provide selection of functionally superior sperm. Recent data indicate that techniques that allow selection of non-apoptotic sperm cells may overcome some of the limitations of these other methods (Said *et al.*, 2006; Nasr-Esfahani *et al.*, 2012; Sakkas, 2013; McDowell *et al.*, 2014; Rappa *et al.*, 2016).

The translocation of phosphatidylserine from the inner leaflet to the outer leaflet of the sperm plasma membrane is an early event of sperm apoptosis (Martin *et al.*, 1995), and is considered one of the signs for recognition and removal of apoptotic cells by phagocytosis (Makker *et al.*, 2008). Annexin V (a marker of apoptosis) has a high affinity for phosphatidylserine, and when combined with magnetic microspheres and subjected to a magnetic field in an iron matrix, can separate apoptotic and non-apoptotic sperm. This procedure is called magnetic activated cell sorting (MACS) (Ainsworth *et al.*, 2005), and is based on electrophoretic separation of apoptotic (annexin-positive fraction) and non-apoptotic (annexin-negative fraction) sperm, without compromising viability so they can be used in ART (Ainsworth *et al.*, 2007). Recent studies have evaluated the use of MACS to reduce apoptotic sperm and

improve sperm quality, but the efficacy of MACS in achieving pregnancy after ART is controversial (Dirican *et al.*, 2008; Romany *et al.*, 2010; Khalid and Qureshi, 2011a; b; San Celestino *et al.*, 2011; Romany *et al.*, 2012; Gil *et al.*, 2013; Romany *et al.*, 2014; Troya and Zorrilla, 2015).

Although the externalization of phosphatidylserine is considered an early sign of apoptosis in sperm (Asrm, 2013), some studies have shown that externalization of phosphatidylserine may be part of the physiological capacitation process and an acrosome reaction that occurs in sperm subjected to DGC with albumin (Tavalaee *et al.*, 2012). One study with small sample size (Tavalaee *et al.*, 2012) showed that the use of MACS before DGC was more efficient than MACS after DGC for the recovery of non-apoptotic sperm (Tavalaee *et al.*, 2012). However, the efficiency of using MACS alone, or before or after sperm processing by classical methods to improve sperm quality in terms of sperm motility and/or concentration has not yet been established (Lee *et al.*, 2010; Khalid and Qureshi, 2011b; San Celestino *et al.*, 2011; Romany *et al.*, 2012; Tavalaee *et al.*, 2012; Bucar *et al.*, 2015; Cakar *et al.*, 2016).

The purpose of the present study is to determine the optimal use of MACS in an ART protocol. Thus, we compared sperm quality obtained by DGC alone (DGC), DGC followed by MACS (DGC-MACS), MACS followed by DGC (MACS-DGC), and MACS alone (MACS). We used the TUNEL assay to assess sperm chromatin integrity and also measured the cell concentration, motility, and morphology of sperm selected by these four procedures.

Methods

We performed a prospective experimental study at the Sector of Human Reproduction, Department of Obstetrics and Gynecology, Ribeirao Preto School of

Medicine, University of São Paulo (FMRP-USP). From May 2014 to March 2015, all men who went to the Human Reproduction service of the University Hospital (HCFMRP) for semen analysis were assessed for eligibility. We included men aged between 18 to 50 years-old (Brahem *et al.*, 2011) with 3–5 days of sexual abstinence, without history of cancer or use of chemotherapy or other medications likely to affect spermatogenesis. As we proposed to evaluate four different methods of semen processing at the same sample, samples with seminal volume lower than 2.5 mL and semen concentration lower than 15.0 million/mL were excluded from this study. Thus, based on these eligibility criteria, samples from fifteen men were considered eligible. Initially, seminal fluid was removed (Tavalaee *et al.*, 2012; Bucar *et al.*, 2015) by washing with 2 ml of HTF-modified HEPES buffer (Irvine Scientific, CA), followed by centrifugation at 300 g for 10 min. Sperm were then resuspended in 2,0 mL of HTF-modified HEPES buffer and divided in 4 separated fractions and processed by DGC alone, DGC followed by MACS, MACS followed by DGC, and MACS alone. Cell concentration, cell motility, cell morphology were evaluated according to the 5th edition of the World Health Organization Manual guideline (Who, 2010). The percentage of apoptotic cells were evaluated based on the TUNEL method. Each of the 15 samples was processed by the same 4 methods.

1. Density gradient centrifugation (DGC)

Samples were loaded into a discontinuous gradient (Isolate-Sperm Separation Medium, Irvine Scientific, CA, USA) on 45% and 90% columns and centrifuged at 300 g for 30 min (Who, 2010) at room temperature (25°C). The resulting pellet was centrifuged for additional 10 min and resuspended in 0.5 mL of HTF-modified HEPES buffer (Irvine Scientific, CA). All processing was performed in the absence of serum.

2. Magnetic activated cell sorting (MACS)

An 0,5 ml aliquot of sperm suspended in HTF-modified HEPES buffer, obtained either after sperm wash to remove the seminal plasma or after DGC, was centrifuged and the pellet (max of 10^7 cells) was resuspended in 80 μ L of binding buffer with 20 μ L of Annexin V conjugated microspheres, both from the Annexin V microbead kit (Miltenyi Biotec, Huburn, CA, USA), for 15 min at room temperature. After addition of 400 μ L of binding solution, the suspension was placed in the separation column (MiniMACS, Miltenyi Biotec). Labelled (apoptotic) cells were retained on the column and non-labelled (viable) cells passed through the column. This non-labelled fraction was recovered and processed as previously described (Bucar *et al.*, 2015).

3. Sperm DNA fragmentation detection (TUNEL method)

DNA fragmentation was assessed by the TUNEL assay using the *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche Diagnostics GmbH, IN, USA), as previously described (Tavalaee *et al.*, 2012) and modified by the authors. The sperm suspension was first centrifuged for 5 min at 300 g. The supernatant was discarded and the pellet was washed in phosphate buffered saline (PBS 1X), Sigma-Aldrich, SP, Brazil. A drop of the suspension was spread on slides, air dried, fixed by immersion in 80% methanol (LS Chemicals, SP, Brazil), and then placed in a freezer for 20 min. The slides were permeabilized with 0.01% Triton X-100, Sigma-Aldrich, SP, Brazil for 2 min, washed in PBS 1X buffer solution to adjust the pH to 7,4, and then dried at room temperature. A mix of rTdT nucleotides was prepared for the test and control slides. The DNA strands breaks were labeled with fluorescein-12-dUTP and maintained for 60 min at 37°C in a humidified chamber protected from light. The reactions were

stopped by immersing the slides in 1X PBS, dried at room temperature in the dark, stained with a Vectashield solution containing DAPI (H 1200 Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA), and covered with cover slip. Samples were analyzed using a fluorescence inverted microscope Nikon Eclipse E200 (Nikon Corp., Tokyo, Japan). A total of 200 cells were evaluated on each slide (Tavalaee *et al.*, 2012; Delbes *et al.*, 2013; Fortunato *et al.*, 2013). Cells with DNA damage were considered TUNEL-positive (apoptotic) (Figure 1).

Statistical analysis

Continuous variables without normal distributions, determined by graphical analysis and the Kolmogorov-Smirnov test, are summarized as medians and interquartile ranges (IQRs) and compared by the Friedman test. Pairwise comparisons employed Dunn's multiple comparisons test. A *p*-value less than 0.05 was considered significant. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 6.0, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Results

We analyzed the baseline parameters of sperm samples from the 15 enrolled men before implementation of the selection procedures with median age of 28 years old (IIQ) 25: 26.0 e IIC 75: 34.0). Seminal volume ranged from 2.5 to 4.2 ml (median: 3.1, (IIQ) 25: 2.8 e IIC 75: 3.5). The total sperm count ranged from 75.0 to 458.0 × 10⁶ cells, (median: 172.0 × 10⁶ cells (IIQ) 25: 118.0 e IIC 75: 214.0 × 10⁶ cells). The concentration of sperm ranged from 25.0 to 183.0 × 10⁶ cells per mL (median: 51,0 × 10⁶ per mL, IQR: 39.0 to 66.0 × 10⁶ per mL). The percentage of cells with normal morphology ranged from 2% to 9% (median: 5.0%, IQR: 4.0 to 7.0%). The

percentage of cells with progressive motility ranged from 12% to 87% (median: 39.0%, IQR: 19.0 to 59.0%). The percentage of cells with DNA fragmentation ranged from 6.0% to 29.0% (median: 24.0%, IQR 9.0 to 26.0%). The percentage of living cells ranged from 71.0% to 95.0% (median: 85.0%, IQR: 77.0 to 88.0%) (Table 1).

Table 1 and Figure 2 show the parameters of the same 15 samples after the different selection procedures. The percentage of cells with DNA damage was significantly lower in the MACS-DGC group than in the DGC and MACS groups, but similar to the DGC-MACS group. The sperm concentration was highest and similar in the DGC and MACS groups, and significantly lower in the MACS-DGC and DGC-MACS groups, which were similar to each other. The progressive motility of cells was highest and similar in the MACS-DGC and DGC groups, and significantly lower in the MACS and DGC-MACS groups. The percentage of morphologically normal cells was significantly higher in MACS-DGC group than the DGC-MACS and MACS groups, but similar to the DGC group.

Discussion

Our comparison of four sperm processing methods (DGC, DGC-MACS, MACS-DGC, and MACS) indicated that the two combined methods (MACS-DGC and DGC-MACS) provided recovery of spermatozoa with lower percentages of fragmented DNA. MACS alone or applied after the DGC promotes a significant reduction of the progressive sperm retrieved, as well as the percentage of spermatozoa with normal morphology. However, the MACS applied before the DGC promotes the recovery of samples with a higher percentage of spermatozoa with progressive motility and normal morphology, combined with low percentage of fragmented DNA.

It is unknown whether combining MACS with DGC and/or SU separation techniques can improve sperm selection, or the optimal sequence for combining these techniques. Most studies compared the effectiveness of MACS alone with classical processing methods (DGC or SU) by measurement of DNA fragmentation, although a few studies compared the effects of combined methods on sperm quality (Tavalaee *et al.*, 2012; Nadalini *et al.*, 2014; Bucar *et al.*, 2015; Cakar *et al.*, 2016). For example, Tavalaee *et al.* 2012 collected semen samples from 15 infertile patients and processed them using the same methods used in the present study. They found that DGC or MACS alone reduced DNA fragmentation by about 30%, DGC-MACS reduced DNA fragmentation by 40%, and MACS-DGC reduced DNA fragmentation by 49% (Tavalaee *et al.*, 2012). This supports our finding that the combined procedures (DGC-MACS and MACS-DGC) produced a significantly less DNA fragmentation. However, these authors did not evaluate other important parameters related to sperm quality, such as sperm concentration and motility. Our study is the first to simultaneously assess all of these variables in a protocol using MACS and DGC.

Bucar *et al.* 2015 randomly distributed semen samples from 100 men into 5 distinct groups, and then analyzed the effect of using combined methods of sperm processing (DGC-SU, DGC-MACS-SU, DGC-SU-MACS, MACS-DGC-SU, and MACS-SU). Relative to controls (no processing), all 5 groups had significantly reduced DNA fragmentation, with the greatest reduction in the MACS-DGC-SU group (83.3%). However, these authors did not evaluate seminal processing using MACS-DGC and DGC-MACS and did not compare the effect of the 5 methods on cell morphology, concentration, and progressive motility. Cakar *et al.* 2016 evaluated whether combining MACS with DG or SU techniques could improve sperm selection, but they only performed MACS after DGC or SU. Compared to fresh sperm samples,

sperm concentration and rapid progressive motile sperm concentration was significantly lower following both combined methods (SU/MACS and DGC/MACS). This shows that performing MACS after a classical sperm separation technique is an unsuitable protocol (Cakar *et al.*, 2016), in agreement with our findings. As progressive motility is essential feature for the success of certain ARTs, such as intrauterine insemination (IUI) and *in vitro* fertilization (IVF) (Van Voorhis *et al.*, 2001; Berker *et al.*, 2012; Sakkas *et al.*, 2015), it is fundamental to evaluate this parameter. Our study is the first to demonstrate that the MACS performed before DGC yields a significantly higher percentage of progressive sperm than the DGC-MACS procedure (68% vs. 10%), simultaneously assessing the motility and concentration of spermatozoa in the same protocol.

In the present study, we found an increase in the percentage of cells with normal morphology only for MACS-DGC processing, unlike Tavalaei *et al.* 2012, who observed increases with the MACS-DGC and DGC-MACS procedures. (Said *et al.*, 2005; Aziz *et al.*, 2007) showed no improvement in the percentage of cells with normal morphology following MACS, but reported a decrease in this variable in normozoospermic patients (Delbes *et al.*, 2013). However, the impact of sperm morphology in natural fertility and the success of ART remains poorly elucidated (Nikbakht and Saharkhiz, 2011; Sakkas *et al.*, 2015).

Studies comparing pregnancy rates following different seminal processing methods (MACS with different additional protocols) obtained variable results (Dirican *et al.*, 2008; Romany *et al.*, 2010; Khalid and Qureshi, 2011a; b; San Celestino *et al.*, 2011; Romany *et al.*, 2012; Romany *et al.*, 2014; Troya and Zorrilla, 2015). Among other things, this could be due to the lack of protocol standardization. It should be noted that previous studies using MACS for sperm processing utilized

this methodology alone (Dirican *et al.*, 2008; Alvarez Sedó *et al.*, 2010; Nikbakht and Saharkhiz, 2011; Van Thillo *et al.*, 2011), MACS after SU (Romany *et al.*, 2010; Romany *et al.*, 2014), or MACS after DGC (Rawe *et al.*, 2010; Khalid and Qureshi, 2011b; Nadalini *et al.*, 2014). Only one study tested the effect of MACS before DGC (Tavalaee *et al.*, 2012), but they did not evaluate the efficiency of this combined processing method in terms of sperm motility and concentration.

Our findings indicate that the MACS-DGC protocol was the most effective in that it produced cells with the lowest percentage DNA fragmentation, the highest percentage of progressive motility, and the highest percentage of normal morphology. As previously pointed out, it has been shown that externalization of phosphatidylserine may be part of the physiological capacitation process and an acrosome reaction that occurs in sperm subjected to DGC (Tavalaee *et al.*, 2012) (Tavalaee *et al.*, 2012) which physiologically justify the use of MACS before DGC. Some studies have shown that MACS column seems cause a slight decrease in motility (Paasch *et al.*, 2003; Grunewald *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Moreover sperm population exposed to the MACS column seems to be more susceptible to the mechanical and magnetic forces within the column, which may result in tail defects (Paasch *et al.*, 2003). These defects can be removed and slight decrease in motility can be improved by applying DGC after MACS. In addition, micro beads remaining after MACS can be separated by using DGC after MACS, which may make the procedure safer for clinical purpose (Tavalaee *et al.*, 2012).

This study has no direct clinical implications, but it raises the possibility that use of the MACS-DGC protocol for seminal processing may improve live birth rates following IUI or IVF. This hypothesis requires investigation in future clinical trials.

A limitation of our study is the small sample size. This was because we considered eligible for our study only semen samples with at least 2.5 mL of volume and concentration of at least 15.0 million/mL in order to evaluate the four processing methods in the same samples. This procedure reduced biases related to the potential impact of different samples on assessed outcomes. However, as we recruited men among those investigating infertility in our IVF Center, most of them had abnormal semen parameters limiting our sample size. Thus, studies evaluating larger series are needed to confirm our results. Another limitation is the present findings can only be extrapolated to men with the adopted eligibility criteria and new studies are needed to validate our findings in men with abnormal semen parameters.

In conclusion, we compared four sperm processing methods (DGC, DGC-MACS, MACS-DGC, and MACS), and found that the combined methods (MACS-DGC and DGC-MACS) led to retrieval of fewer sperm with fragmented DNA. However, MACS-DGC protocol led to a significantly higher percentage of spermatozoa with progressive motility and normal morphology than the DGC-MACS protocol. These findings suggest that for assisted reproduction procedures in which progressive motility is related to reproductive success, such as IUI and IVF, use of the MACS-DGC protocol may provide better outcomes.

Bibliography

AINSWORTH, C.; NIXON, B.; AITKEN, R. J. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. **Hum Reprod**, v. 20, n. 8, p. 2261-70, Aug 2005. ISSN 0268-1161. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831507> >.

AINSWORTH, C. et al. First recorded pregnancy and normal birth after ICSI using electrophoretically isolated spermatozoa. **Hum Reprod**, v. 22, n. 1, p. 197-200, Jan 2007. ISSN 0268-1161. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16971383> >.

AITKEN, R. J.; KOPPERS, A. J. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. **Asian J Androl**, v. 13, n. 1, p. 36-42, Jan 2011. ISSN 1745-7262. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20802502> >.

ALVAREZ SEDÓ, C. et al. **Clinical outcome using non-apoptotic sperm selection for ICSI procedures: report of 1 year experience.** 94(4):S232. Fertility and Sterility 2010.

ASRM. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. **Fertil Steril**, v. 99, n. 3, p. 673-7, Mar 2013. ISSN 1556-5653. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23391408> >.

AZIZ, N. et al. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. **Hum Reprod**, v. 22, n. 5, p. 1413-9, May 2007. ISSN 0268-1161. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17303629> >.

BERKER, B. et al. Absence of rapid and linear progressive motile spermatozoa "grade A" in semen specimens: does it change intrauterine insemination outcomes? **Urology**, v. 80, n. 6, p. 1262-6, Dec 2012. ISSN 1527-9995. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23040198> >.

BESHAY, V. E.; BUKULMEZ, O. Sperm DNA damage: how relevant is it clinically? **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 24, n. 3, p. 172-9, Jun 2012. ISSN 1473-656X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22366964> >.

BRAHEM, S. et al. The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. **J Assist Reprod Genet**, v. 28, n. 5, p. 425-32, May 2011. ISSN 1573-7330. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21287403> >.

BUCAR, S. et al. DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. **J Assist Reprod Genet**, v. 32, n. 1, p. 147-54, Jan 2015. ISSN 1573-7330. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25374393> >.

CAKAR, Z. et al. Does combining magnetic-activated cell sorting with density gradient or swim-up improve sperm selection? **J Assist Reprod Genet**, v. 33, n. 8, p. 1059-65, Aug 2016. ISSN 1573-7330. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27233651> >.

DELBES, G. et al. The use of complimentary assays to evaluate the enrichment of human sperm quality in asthenoteratozoospermic and teratozoospermic samples processed with Annexin-V magnetic activated cell sorting. **Andrology**, v. 1, n. 5, p. 698-706, Sep 2013. ISSN 2047-2927. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23843365> >.

DIRICAN, E. K. et al. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. **J Assist Reprod Genet**, v. 25, n. 8, p. 375-81, Aug 2008. ISSN 1058-0468. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18810633> >.

FORTUNATO, A. et al. **Sperm DNA Fragmentation Assays Correlate with Sperm Abnormal Morphology and the Pregnancy Outcome.**: J Fertil In Vitro. 1:101 2013.

GIL, M. et al. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. **J Assist Reprod Genet**, v. 30, n. 4, p. 479-85, Apr 2013. ISSN 1573-7330. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23468098> >.

GORCZYCA, W. et al. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. **Exp Cell Res**, v. 207, n. 1, p. 202-5, Jul 1993. ISSN 0014-4827. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8391465> >.

GRUNEWALD, S. et al. Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. **Fertil Steril**, v. 92, n. 2, p. 572-7, Aug 2009. ISSN 1556-5653. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18823884> >.

ISHIHARA, O. et al. International committee for monitoring assisted reproductive technologies: world report on assisted reproductive technologies, 2007. **Fertil Steril**, v. 103, n. 2, p. 402-13.e11, Feb 2015. ISSN 1556-5653. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25516078> >.

KHALID, S.; QURESHI, I. **Effect of magnetic selected sperm on fertilization and embryo development: an animal model study.** 96(3):S169. Fertility and Sterility.: Elsevier Ltd. 2011a.

_____. **Pregnancy rate improves in couples with unexplained infertility following intrauterine insemination (IUI) with magnetically selected non-apoptotic sperms.** 96(3):S25. Fertility and Sterility: Elsevier Ltd. 2011b.

LEE, T. H. et al. Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. **Hum Reprod**, v. 25, n. 4, p. 839-46, Apr 2010. ISSN 1460-2350. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150175> >.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. K. Magnetic activated cell sorting (MACS): utility in assisted reproduction. **Indian J Exp Biol**, v. 46, n. 7, p. 491-7, Jul 2008. ISSN 0019-5189. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18807751> >.

MARTIN, S. J. et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J Exp Med**, v. 182, n. 5, p. 1545-56, Nov 1995. ISSN 0022-1007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7595224> >.

MCDOWELL, S. et al. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 10, p. CD010461, Oct 2014. ISSN 1469-493X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25348679> >.

NADALINI, M. et al. Annexin V magnetic-activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: is the new approach better than the traditional one? **J Assist Reprod Genet**, v. 31, n. 8, p. 1045-51, Aug 2014. ISSN 1573-7330. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24906302> >.

NASR-ESFAHANI, M. H.; DEEMEH, M. R.; TAVALAEE, M. New era in sperm selection for ICSI. **Int J Androl**, v. 35, n. 4, p. 475-84, Aug 2012. ISSN 1365-2605. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22804455> >.

NIKBAKHT, R.; SAHARKHIZ, N. The influence of sperm morphology, total motile sperm count of semen and the number of motile sperm inseminated in sperm samples on the success of intrauterine insemination. **Int J Fertil Steril**, v. 5, n. 3, p. 168-73, Oct 2011. ISSN 2008-076X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25101161> >.

PAASCH, U. et al. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. **J Androl**, v. 24, n. 2, p. 246-52, 2003 Mar-Apr 2003. ISSN 0196-3635. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634312> >.

RAPPA, K. L. et al. Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? **Biotechnol Adv**, v. 34, n. 5, p. 578-87, 2016 Sep-Oct 2016. ISSN 1873-1899. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26845061> >.

RAWE, V. Y. et al. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. **Reprod Biomed Online**, v. 20, n. 3, p. 320-3, Mar 2010. ISSN 1472-6491. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096634> >.

ROMANY, L. et al. **Effect of sperm selection by annexin-V sorting prior to ICSI in ovum donation program. Preliminary data** . 24(Suppl1):S2. Reproductive Biomedicine Online. 2012.

_____. Removal of annexin V-positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males. **Fertil Steril**, v. 102, n. 6, p. 1567-75.e1, Dec 2014. ISSN 1556-5653. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25305728> >.

_____. **Magentic activated sorting selection (MACS) of nonapoptotic sperm (NAS) improves pregnancy rates in homologous intrauterine insemination (IUI). Preliminary data** . 94(4):S14 Fertility and Sterility: Elsevier Ltd. 2010.

SAID, T. et al. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. **Biol Reprod**, v. 74, n. 3, p. 530-7, Mar 2006. ISSN 0006-3363. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16306419> >.

SAID, T. M. et al. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. **J Androl**, v. 29, n. 2, p. 134-42, 2008 Mar-Apr 2008. ISSN 0196-3635. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077822> >.

_____. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. **Reprod Biomed Online**, v. 10, n. 6, p. 740-6, Jun 2005. ISSN 1472-6483. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15970004> >.

SAKKAS, D. Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. **Fertil Steril**, v. 99, n. 4, p. 1023-9, Mar 2013. ISSN 1556-5653. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23357456> >.

SAKKAS, D.; ALVAREZ, J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **Fertil Steril**, v. 93, n. 4, p. 1027-36, Mar 2010. ISSN 1556-5653. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080235> >.

SAKKAS, D.; MARIETHOZ, E.; ST JOHN, J. C. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. **Exp Cell Res**, v. 251, n. 2, p. 350-5, Sep 1999. ISSN 0014-4827. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471320> >.

SAKKAS, D. et al. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? **Hum Reprod Update**, v. 21, n. 6, p. 711-26, 2015 Nov-Dec 2015. ISSN 1460-2369. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26386468> >.

SAN CELESTINO, M. et al. **Improved pregnancy rate after sperm magnetic separation technique in egg donation cycles using frozen sperm samples.** . 26 suppl 1:i123–48. Human Reproduction 2011.

SHAMSI, M. B.; IMAM, S. N.; DADA, R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. **J Assist Reprod Genet**, v. 28, n. 11, p. 1073-85, Nov 2011. ISSN 1573-7330. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21904910> >.

TAVALAEE, M. et al. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? **J Assist Reprod Genet**, v. 29, n. 1, p. 31-8, Jan 2012. ISSN 1573-7330. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22170231> >.

TROYA, J.; ZORRILLA, I. Annexin V-MACS in infertile couples as method for separation of sperm without DNA fragmentation. **JBRA Assist Reprod**, v. 19, n. 2, p. 66-9, May 2015. ISSN 1518-0557. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27206090> >.

VAN THILLO, G. G., M. et al. **Biological safety and live births after selection of non-apoptotic**

spermatozoa during ICSI. 96(3):S160-1. Fertility and Sterility: Elsevier Ltd. 2011.

VAN VOORHIS, B. J. et al. Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 75, n. 4, p. 661-8, Apr 2001. ISSN 0015-0282. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287015> >.

WHO, W. H. O. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.** . 5 th ed.: Geneva 2010.

Figure 1. DNA integrity spermatozoa stained by TUNEL method (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling). Blue signals indicate labeling of sperm DNA by 4', 6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI). Green signals indicate TUNEL-positive spermatozoa. Arrows indicate TUNEL-positive spermatozoa in overlapping images (MERGE). A) Sample processed by DGC, B) sample processed by DGC / MACS, C) sample processed by MACS / DGC and D) sample processed by MACS.

Table 1. Comparison of sperm DNA fragmentation, concentration, progressive motility, and normal morphology among samples processed by density gradient centrifugation (DGC), magnetic activated cell sorting followed by DGC (MACS-DGC), DGC-MACS, and MACS.

	Baseline Parameters	DGC	DGC-MACS	MACS-DGC	MACS
DNA fragmentation, %	24 (9-26)	10 (5-16) ^a	6 (3-11) ^b	4 (2-7) ^{a,c}	8 (6-16) ^{b,c}
Concentration, %	51 (39-66)	12 (7-16) ^{a,b}	5 (3-9) ^{a,c}	4 (3-7) ^{b,d}	15 (13-24) ^{c,d}
Progressive motility, %	39 (19-59)	61 (39-76) ^{a,b}	10 (2-20) ^{a,c}	68 (44-78) ^{c,d}	11 (2-27) ^{b,d}
Normal morphology, %	5 (4-7)	6 (5-7)	5 (4-6) ^a	7 (6-9) ^{a,b}	5 (4-8) ^b

Note: DNA fragmentation measured by TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick End Labelling*). Each entry shows the median (interquartile range). Only the four processing groups (DGC, DGC/MACS, MACS/DGC and MACS) were compared statistically with each other by the Friedman's test. Pairwise comparisons employed Dunn's multiple comparisons test. Common letters in the same row indicate a significant difference ($p < 0.05$).

Figure 2. Comparison of sperm DNA fragmentation, concentration, progressive motility, and normal morphology among samples processed by density gradient centrifugation (DGC), magnetic activated cell sorting followed by DGC (MACS-DGC), DGC-MACS, and MACS