HAMILTON DE MARTIM

**Desenvolvimento de uma técnica para seleção de
espermatozoides em amostra seminal não processada
para utilização na injeção intracitoplasmática de
espermatozoides**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Urologia

Orientador: Dr. Marcello Antonio Signorelli
Cocuzza

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Martim, Hamilton de

Desenvolvimento de uma técnica para seleção de espermatozoides em amostra seminal não processada para utilização na injeção intracitoplasmática de espermatozoides / Hamilton de Martim. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Urologia.

Orientador: Marcelo Antonio Signorelli Cocuzza.

Descritores: 1.Sêmen 2.Injeções de esperma intracitoplásmicas
3.Espermatozoides 4.Infertilidade masculina 5.Técnicas reprodutivas 6.Microfluidica

USP/FM/DBD-151/17

Normatização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Considerações sobre a infertilidade masculina.....	2
1.2	Considerações sobre a avaliação da maturidade da cromatina espermática.....	3
1.3	Considerações sobre a seleção dos espermatozoides para realização de métodos de reprodução assistida	6
2	OBJETIVOS	11
3	MÉTODOS.....	13
3.1	Local do estudo	14
3.2	Seleção dos pacientes	14
3.3	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).	15
3.4	Crerários de Avaliação dos Pacientes	15
3.5	Análise Seminal.....	17
3.5.1	Avaliação macroscópica.....	17
3.5.1.1	Volume	17
3.5.2	Avaliação microscópica.....	17
3.5.2.1	Concentração Espermática	18
3.5.2.2	Motilidade espermática	18
3.5.2.3	Morfologia espermática OMS 2010.....	19
3.6	Centrifugação em gradiente descontínuo	20
3.7	Método de gota estendida com mecanismo de contracorrente (GEMC) de captura de espermatozoide	21
3.8	Análise das características do sistema GEMC	27
3.9	Análise da maturidade da cromatina espermática	27
3.10	Análise estatística.....	28
4	RESULTADOS	30
4.1	Descrição da idade dos pacientes e características dos parâmetros seminais	31

4.2	Descrição das características do sistema GEMC	31
4.3	Comparação da morfologia e da maturidade espermática entre sêmen fresco e após a utilização da técnica GEMC com amostras seminais não processadas	33
4.4	Comparação da morfologia e da maturidade espermática entre sêmen fresco e após o processamento convencional	34
4.5	Comparação da morfologia e da maturidade espermática entre sêmen após o processamento convencional e após a utilização da técnica GEMC com amostras seminais processadas	35
4.6	Comparação da morfologia e da maturidade espermática após a utilização da técnica GEMC com amostras seminais não processadas e após a utilização da técnica GEMC com amostras seminais processadas	36
4.7	Comparação da redução relativa na imaturidade da cromatina espermática em comparação com o sêmen fresco dos tratamentos CGD, GEMC-SF e GEMC-CGD	37
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÕES	44
7	ANEXOS	46
8	REFERÊNCIAS	49

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	- graus Celsius
µL	- Microlitro
µm	- Micrômetro
ROS	- radicais livres de oxigênio (do inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i> – ROS)
DNA	- ácido desoxirribonucleico
HEPES	- tampão bicarbonato de sódio
HTF	- meio de cultura utilizado no laboratório (do inglês: “human tubal fluid – HTF”) – sem tradução para língua portuguesa
ICSI	- injeção intracitoplasmática de espermatozoide (do inglês: <i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i> – ICSI)
FIV	- fertilização <i>in vitro</i>
Min	- Minutos
ml	- Mililitro
mm	- Milímetro
mm ²	- milímetro quadrado
Nº	- Número
ROC	- <i>Receiver Operating Characteristic</i> – sem tradução para língua portuguesa
HRP	- peroxidase de raiz forte (do inglês: <i>Horseradish peroxidase</i> – HRP)
IC	- interval de confiança
ASC	- área sob a curva
Rpm	- rotações por minute
S	- Segundos
T	- Tempo

LISTA DE SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
ASRM	Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (do inglês: <i>American Society for Reproductive Medicine</i> – ASRM)
CAPPesq	Comissão de Ética para a Análise de Projetos de Pesquisa
EUA	Estados Unidos da América
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
SPSS	programa estatístico (do inglês: <i>Statistical Package for Social Science</i>) – sem tradução para língua portuguesa

LISTA DE SÍMBOLOS

[]	- concentração
$\geq$	- igual ou maior
$\leq$	- igual ou menor
$\pm$	- mais/menos
$<$	- menor
$>$	- maior
$=$	- igual a
x	- vezes
%	- por cento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição das frações do ejaculado, formação de alíquotas, procedimentos realizados e comparações realizadas.....	16
Figura 2 -	Placa ICSI convencional.....	21
Figura 3 -	GEMC: Gota Estendida com Mecanismo Contracorrente	22
Figura 4 -	GEMC: Etapa 1	23
Figura 5 -	GEMC: Etapa 2	24
Figura 6 -	GEMC: Etapas 3 e 4	26
Figura 7 -	Teste utilizando corantes para evidenciar a dinâmica dos fluidos no aparato de seleção de espermatozoides	32
Figura 8 -	Comparação da redução relativa na imaturidade da cromatina espermática em comparação com o sêmen fresco dos tratamentos CGD, GEMC-SF e GEMC-CGD	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição da idade dos pacientes e características dos parâmetros seminais	31
Tabela 2 -	Comparação entre sêmen fresco e GEMC - SF	33
Tabela 3 -	Comparação entre sêmen fresco e CGD.....	34
Tabela 4 -	Comparação entre CGD e GEMC – CGD.....	35
Tabela 5 -	Comparação entre GEMC - SF e GEMC – CGD.....	36

RESUMO

Martim H. *Desenvolvimento de uma técnica para seleção de espermatozoides em amostra seminal não processada para utilização na injeção intracitoplasmática de espermatozoides* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Durante a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) seleciona-se um espermatozoide móvel e morfolologicamente normal para injeção em ovócito maduro. Evidências recentes indicam que mesmo espermatozoides aparentemente normais podem ocultar defeitos em nível molecular. O principal objetivo deste trabalho foi a descrição de um novo método capaz de selecionar espermatozoides maduros a partir de amostras não processadas em procedimento de ICSI. Em um estudo comparativo e prospectivo testou-se uma gota estendida modificada. A “gota estendida com mecanismo contracorrente” – GEMC foi montada em uma placa de ICSI padrão a partir de seis gotas de meio de cultivo (10 μ L). O posicionamento e união precisa das gotas deram origem a dois reservatórios e um canal, resultando em um fluxo de líquido através do canal. A adição de uma solução de PVP (polivinilpirrolidona) gerou um gradiente de viscosidade no final do circuito. Amostras seminais foram obtidas de 40 pacientes inférteis. Cada amostra seminal foi dividida em 4 alíquotas: uma alíquota para o processamento por centrifugação em gradiente de densidade (CGD), uma alíquota para a GEMC utilizando amostras não processadas, uma alíquota para a GEMC utilizando amostras processadas e uma alíquota para controle. Nos grupos GEMC uma média de 200 espermatozoides foram consecutivamente coletados, sem seleção, no reservatório de captura utilizando-se uma micropipeta de injeção como no procedimento convencional de ICSI. A morfologia espermática foi avaliada e demonstrou melhora, comparando-se com os controles, em todos os tratamentos utilizados. A imaturidade da cromatina foi avaliada utilizando-se o teste do azul de anilina. Em relação à imaturidade, 100% dos homens obtiveram melhores resultados tanto após o preparo por CGD quanto utilizando o método GEMC. Isto se refletiu em uma redução das formas imaturas de $28.65 \pm 8.97\%$ no sêmen fresco para $17.29 \pm 7.72\%$ após processamento por CGD ($P < 0.01$). Uma redução ainda maior nas formas imaturas foi obtida após o método GEMC quando comparado com o processamento por CGD: $0.89 \pm 1.31\%$ ($P < 0.01$) utilizando-se sêmen fresco e $1.05 \pm 1.63\%$ ($P < 0.01$) utilizando-se amostras processadas. Um novo método unindo seleção e captura de espermatozoides em um mesmo procedimento de ICSI foi descrito e testado. O método GEMC seleciona espermatozoides de forma fácil e permite o uso direto de amostras não processadas em procedimentos de ICSI. Este método seleciona espermatozoides maduros com mais eficiência do que o processamento por CGD. Novos estudos são necessários para se analisar o impacto do método nas taxas de fertilização, desenvolvimento embrionário, gravidez, implantação e abortamento.

Descritores: sêmen; injeções de esperma intracitoplásmicas; espermatozoides; infertilidade masculina; técnicas reprodutivas; microfluídica

ABSTRACT

Martim H. *Development of a technique for selection of spermatozoa for use in intracytoplasmic sperm injection without previous semen processing* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

During intracytoplasmic sperm injection (ICSI) a motile spermatozoon with normal morphology is visually selected for insemination of an oocyte. Recent evidence indicates that even though the sperm appears morphologically normal, a possibility of defects at the molecular level still exists. The main objective of this work was to describe a novel approach capable of selecting mature spermatozoa from unprocessed semen sample in a one-step ICSI procedure. A modified extended drop was tested in a prospective comparative study. The “Gota Estendida com Mecanismo Contracorrente - GEMC” (Positive Rheotaxis Extended Drop - PRED) was assembled on a standard ICSI dish and consisted of six culture medium droplets (10 μ L). The precise merging of the drops created two reservoirs and a channel therefore the fluid flew through the channel. The addition of a PVP solution created a viscosity gradient in the final sector of the circuit. Semen samples were taken from 40 subfertile men. Each semen sample was divided into four aliquots: one aliquot for density gradient centrifugation (DGC), one aliquot for GEMC using fresh semen, one aliquot for GEMC using processed semen and one aliquot for the control. In GEMC a mean of 200 spermatozoa were collected consecutively, without selection, from the outlet reservoir with an injecting pipette as for conventional ICSI procedure. Sperm morphology was assessed and resulted in improvement compared to controls in all treatments. Chromatin immaturity was assessed using aniline blue assay. Regarding to chromatin immaturity, 100% of men had better results after DGC preparation and GEMC approach. This was reflected in a mean reduction from $28.65 \pm 8.97\%$ uncondensed chromatin in the native ejaculates to $17.29 \pm 7.72\%$ in DGC processed semen ($P < 0.01$). An even greater reduction was achieved after GEMC approach showing a mean of $0.89 \pm 1.31\%$ uncondensed chromatin compared to DGC processed sample ($P < 0.01$). A novel one-step ICSI approach joining sperm selection and recovery was developed and tested. This GEMC approach can select sperm easily and permits the direct use of native semen in ICSI. This approach can select sperm with lower chromatin immaturity than DGC method. Further studies need to access its relation to fertilization, embryo development, pregnancy, implantation and miscarriage rates.

Descriptors: semen; sperm injections, intracytoplasmic; spermatozoa; infertility, male; reproductive techniques; microfluidics

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre a infertilidade masculina

De acordo com a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (em inglês: *American Society for Reproductive Medicine – ASRM*), a infertilidade é considerada uma doença do sistema reprodutor, cujas funções não se encontram em estado normal, que é constatada após um período de doze meses de tentativa de concepção sem sucesso, em que o casal manteve relações sexuais sem a utilização de nenhum método contraceptivo ⁽¹⁾. A Organização Mundial da Saúde – OMS (em inglês: *World Health Organization - WHO*) estima que aproximadamente 48,5 milhões de casais ao redor do mundo apresentem problemas relacionados à infertilidade ⁽²⁾. Atualmente, estima-se que a infertilidade atinja 8% a 12% dos casais em idade reprodutiva ^(3,4).

De acordo com o Instituto Nacional para Saúde e Excelência Clínica (em inglês: *National Institute for Health and Clinical Excellence - NICE*), em 40% de todos os casos, a infertilidade masculina é a maior razão de não concepção ⁽⁵⁾. As principais causas de infertilidade masculina incluem a varicocele (25%), obstrução do trato genital (15%), falha testicular (15%), criptorquidia (14%), causas idiopáticas (12%), condições genéticas (8%), infecções (3%), disfunção ejaculatória (3%), disfunção hormonal (2%), condições imunológicas (2%), câncer (0,5%), e doenças sistêmicas (0.5%) ⁽⁶⁾.

O advento da injeção intracitoplasmática de espermatozoide (em inglês: *Intracytoplasmic Sperm Injection – ICSI*), divulgado ao mundo inicialmente por Palermo et al. ⁽⁷⁾ em 1992, incorporou inúmeros benefícios à reprodução humana, possibilitando a paternidade aos homens com infertilidade decorrente de causas graves.

1.2 Considerações sobre a avaliação da maturidade da cromatina espermática

Apesar de a análise seminal ser a ferramenta diagnóstica disponível mais utilizada na rotina de prática clínica, esse exame possui relevantes limitações relacionadas à etiologia da disfunção espermática. Sendo assim, aproximadamente 25% dos homens com análise seminal normal não conseguem engravidar suas parceiras, permanecendo sem diagnóstico da causa da infertilidade e sendo classificados como portadores de infertilidade idiopática ⁽⁸⁾. Nesses casos encontramos uma extensa gama de alterações da função espermática como movimento anormal do flagelo, falha no reconhecimento da zona pelúcida e inibição da fusão do espermatozoide com o ovócito ^(9, 10). A introdução de marcadores de função espermática possibilitou uma avaliação mais precisa da etiologia da disfunção do espermatozoide, contribuindo para o correto diagnóstico dos casos classificados como idiopáticos. Além disso, marcadores de função espermática podem ser utilizados como fator prognóstico das taxas de gravidez, tanto espontânea, quanto por meio de reprodução assistida. Nesse sentido, foram descritos alguns testes nos últimos anos, incluindo reação acrossômica, penetração espermática e hemizona, níveis de creatina quinase, radicais livres de oxigênio (em inglês: *reactive oxygen species* – ROS), citocinas como a interleucina 6, capacidade antioxidante total, peroxidação lipídica, teste de fragmentação do ácido desoxirribonucleico (em inglês: *deoxyribonucleic acid* – DNA) e avaliação da maturidade espermática ⁽¹¹⁻¹⁵⁾.

A espermiogênese é um evento pós-meiótico essencial, sendo nesta fase que as espermátides haploides sofrem uma série de mudanças celulares, moleculares e morfológicas dando origem aos espermatozoides maduros. A espermiogênese é composta de vários eventos finamente ajustados, sendo que qualquer alteração nestes passos cruciais pode levar à infertilidade ⁽¹⁶⁾. Entre estas possíveis alterações estão os

defeitos na condensação da cromatina espermática. Nas células somáticas o DNA é compactado em estruturas denominadas “solenoides” compostos por histonas. Durante a espermiogênese as histonas são substituídas por proteínas de transição que posteriormente serão substituídas por protaminas ^(17, 18). As protaminas se fixam firmemente em segmentos de DNA formando subunidades denominadas “toróides” ^(19, 20). A eliminação das histonas progride gradualmente durante a espermiogênese. Aproximadamente 85% da cromatina em um espermatozoide humano maduro está ligada a protaminas enquanto que 15% permanece ligada a histonas. Estudos mostram que a retenção excessiva de histonas está associada a uma degradação extensiva do DNA espermático ^(21, 22, 23).

A avaliação da maturidade da cromatina espermática na rotina da análise seminal fornece informações importantes durante a investigação da fertilidade masculina ⁽²⁴⁾. Muitos testes analíticos têm sido propostos para a avaliação da compactação nuclear do espermatozoide do ejaculado. O mais comumente utilizado é o teste do azul de anilina que detecta a presença excessiva de histonas ⁽²⁵⁻²⁸⁾. Este método permite diferenciar entre a presença de histonas (ricas em lisina) e protaminas (ricas em arginina e cisteína) no núcleo espermático. Durante o teste o azul de anilina se liga aos resíduos de lisina, consequentemente, o núcleo imaturo rico em histonas ficará fortemente corado em azul, enquanto que o núcleo maduro pobre em histonas permanecerá não corado. A adição de eosina ao teste facilita a observação dando mais segurança e acurácia à avaliação ⁽²⁹⁾. Entre os benefícios citados para a utilização do teste do azul de anilina na avaliação da maturidade da cromatina espermática estão a simplicidade do método, a facilidade da confirmação dos resultados, alta sensibilidade e o baixo custo ^(30, 31).

Ao detectar a presença de histonas, o teste do azul de anilina faz uma inferência indireta da presença de baixos níveis de protamina na cromatina espermática. Foresta e

colaboradores, em 1992, observaram uma maior percentagem de espermatozoides corados em pacientes inférteis comparados com doadores férteis ⁽²¹⁾. Franken e colaboradores, 1999, relataram uma maior incidência de espermatozoides corados pelo azul de anilina em pacientes com teratozoospermia quando comparados com pacientes normozoospermicos (51% vs. 26%) ⁽³²⁾. Além disso, outros estudos mostraram que o escore total do teste do azul de anilina para pacientes com infertilidade idiopática era similar ao de pacientes com varicocele ^(31, 33).

Recentemente, Simon e colaboradores relacionaram a retenção excessiva de histonas com volume seminal e morfologia espermática, mas não com concentração espermática ou motilidade ⁽³⁴⁾. Além disso, os autores relataram uma associação entre a retenção de histonas com dano no DNA espermático medido pelas técnicas: Comet (em inglês: *single-cell gel electrophoresis (Comet) assay*), TUNEL (em inglês: *TdT terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labelling*) e SCD (em inglês: *sperm chromatin dispersion test*). Avaliando-se os possíveis efeitos nos resultados de FIV/ICSI foi encontrada uma correlação negativa significativa entre retenção de histonas e qualidade de embriões em estágio de clivagem. No entanto, não houve influência nas taxas de fertilização ou na qualidade dos blastocistos. Contudo, os casais que obtiveram gravidez clínica possuíam um menor percentual de espermatozoides com retenção de histonas comparado a casais que não obtiveram gravidez.

1.3 Considerações sobre a seleção dos espermatozoides para realização de métodos de reprodução assistida

Apesar de ser rotineiramente utilizada na avaliação da fertilidade masculina, a simples análise seminal nem sempre é capaz de fornecer as informações necessárias sobre os fatores paternos que podem afetar o desenvolvimento embrionário ⁽¹⁵⁾.

Na última década, ocorreram avanços consideráveis na compreensão do processo reprodutivo masculino nos aspectos biológico, molecular e genético ⁽³⁵⁾. Esses avanços ressaltaram a importância do conhecimento da fisiologia do espermatozoide e da compreensão do mecanismo de fertilização ^(36, 37).

Durante a realização da ICSI, o risco da escolha acidental de um espermatozoide contendo altos níveis de fragmentação no seu DNA tornou-se uma importante preocupação ⁽³⁸⁾. Alguns trabalhos confirmam que um espermatozoide, mesmo com alterações significativas em seu DNA, ainda possui o potencial de fertilizar o ovócito por meio da ICSI ⁽³⁹⁻⁴²⁾. No entanto, dependendo do grau de fragmentação do DNA dos espermatozoides e da capacidade dos ovócitos fertilizados em reparar os danos existentes, podem ocorrer erros de replicação, transcrição e tradução nos embriões resultantes contribuindo para falhas de implantação, perdas precoces e abortamento ^(43, 44). Apesar disso, em alguns casos, mutações *de novo* podem resultar em efeitos tardios tais como o autismo ou o câncer juvenil ⁽⁴⁵⁾.

A morfologia estrita é considerada um bom teste preditivo para o sucesso da FIV, no entanto, apesar de relativamente simples, existe uma grande variabilidade nos resultados, tanto entre diferentes laboratórios, como entre os técnicos de um mesmo laboratório ⁽⁴⁶⁾. Na avaliação da morfologia espermática publicada por Kruger et al. ⁽⁴⁷⁾ em 1988, um resultado da morfologia superior a 14% indicaria normalidade. Alguns

estudos sugerem que esse valor não corresponde à realidade, tendo sido propostos valores inferiores de morfologia, utilizando os mesmos critérios de avaliação ^(48, 49).

Apesar da tentativa de se associar a morfologia espermática com a fragmentação do DNA ^(50, 51) estudos recentes mostram que a maior correlação é encontrada com a motilidade progressiva ⁽⁵²⁻⁵⁵⁾. Um dos primeiros efeitos da exposição a radicais livres no espermatozoide é a diminuição progressiva da motilidade, portanto, a seleção de espermatozoides com alta motilidade seria um passo crucial na obtenção de gametas com DNA íntegro ⁽⁵⁶⁾.

As técnicas mais utilizadas para a seleção de espermatozoides móveis na prática clínica incluem a centrifugação em gradiente descontínuo (CGD) e o swim-up (sem tradução em português) ^(57, 58). A CGD, por depender do nível de treinamento do operador, apresenta alta variabilidade de desempenho entre os centros. A habilidade em retirar a fração selecionada sem a contaminação com as outras frações, é um fator fundamental na seleção de espermatozoides com menores níveis de fragmentação do DNA espermático. O risco de contaminação aumenta no processamento de amostras com baixa qualidade devido à diminuição do volume das soluções separadoras. Além disso, soma-se o risco de fragmentação do DNA espermático devido à concentração de células mortas ou leucócitos ⁽⁵⁹⁾, ou mesmo devido ao efeito da força centrífuga que pode resultar em danos estruturais no DNA ⁽⁶⁰⁾.

O Swim-up adequa-se melhor ao processamento de amostras que apresentam parâmetros normais ou aquelas levemente alteradas, sendo inadequado para o tratamento de pacientes com fator masculino moderado e severo, principais indicações da técnica de ICSI ⁽⁶¹⁾. Existe também o risco de fragmentação do DNA espermático pela longa exposição aos meios de cultivo, longe dos antioxidantes naturais proporcionados pelo plasma seminal ^(1-3, 62).

Nas últimas décadas, algumas técnicas foram desenvolvidas com o objetivo de melhorar a seleção dos espermatozoides durante a realização de fertilização assistida^(63, 64), incluindo um método que simula a ligação do espermatozoide com a zona pelúcida (do inglês: *sperm binding to hyaluronic acid - HA-binding assay*)⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾, outro que retira espermatozoides apoptóticos através de microesferas magnetizadas ligadas à anexina V (do inglês: *magnetic-activated cell sorting - MACS*)^(68, 69) e os microcircuitos que permitem a migração dos espermatozoides separando-os da amostra original (do inglês - *Microfluidic Sperm Sorting devices - MFSS*)⁽⁷⁰⁻⁷²⁾. Dentre estes, os MFSS têm demonstrado maior eficiência na seleção de espermatozoides móveis e na redução dos níveis de fragmentação do DNA espermático⁽⁷³⁾. Nosrati e colaboradores, em 2014, descreveram um mecanismo que utiliza um “*microfluidic chip*” (sem tradução em português) capaz de selecionar espermatozoides móveis e geneticamente íntegros⁽⁷⁴⁾. Esse método é rápido, o que evita o risco de exposição excessiva ao meio de cultivo, utiliza meio viscoso que mimetiza a migração do espermatozoide no trato feminino e tem pouca interferência do operador. Os autores reportaram níveis extremamente baixos de fragmentação do DNA espermático (1-3%), confirmando a correlação entre motilidade e integridade da cromatina. Apesar das inúmeras publicações, as técnicas utilizando o MFSS ainda são consideradas experimentais⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾. Algumas características desse dispositivo podem justificar a dificuldade da introdução desse método na prática clínica. Primeiro, a alta complexidade técnica na fabricação do dispositivo⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾. Segundo, a utilização de materiais e soluções ainda com segurança desconhecida em reprodução humana (PDMS-polydimethylsiloxane, COP-cyclic olefin polymer, etc.)^(81, 82). Terceiro, a necessidade de procedimentos complexos antes do processamento seminal. Finalmente, as possíveis modificações nas características do meio de cultivo utilizado, devido ao risco de evaporação por serem aplicados volumes muito baixos⁽⁸³⁾.

A “reotaxia positiva” (do inglês - *positive rheotaxis*), que é a tendência de uma célula nadar contra uma corrente de líquido, foi descrita recentemente por Miki e Clapham como “a maior influência na orientação de longa distância dos espermatozoides em mamíferos” ⁽⁸⁴⁾. Os autores apresentaram três argumentos justificando esse comportamento na natureza. Primeiro, o ato sexual estimula a secreção de uma quantidade substancial de fluido no oviduto, desta forma aumentando o fluxo luminal da ampola ao útero que é direcionado pelo movimento ciliar e contrações musculares. Segundo, a reotaxia positiva de espermatozoides maduros é observada tanto *in situ* como *in vitro*, em camundongos e humanos. Finalmente, a capacitação espermática juntamente com o fluxo contracorrente aceleram o movimento de rotação do espermatozoide o que induz um deslocamento direcional em fluidos viscosos.

As técnicas para a seleção de espermatozoides utilizadas na ICSI foram concebidas a fim de se obter gametas com morfologia e motilidade “ideais”. No entanto, as taxas de fertilização e gravidez poderiam ser afetadas por anomalias no núcleo espermático que permaneceriam indetectáveis pelos embriologistas durante o procedimento padrão de seleção de espermatozoides. Existem dois momentos cruciais nas técnicas de processamento seminal que são: a retirada do sobrenadante (contendo células mortas e espermatozoides de baixa qualidade) e a transferência do material selecionado para a placa de ICSI. Qualquer falha nesses processos, seja pela baixa qualidade da amostra seminal ou pela falta de experiência do operador, possibilitaria a passagem de gametas não funcionais (mesmo móveis e morfologicamente normais), que numa inspeção meramente visual poderiam não ser detectados.

Sendo assim, o desenvolvimento de uma técnica em que seleção e captura fossem eventos consecutivos, o risco da escolha inadvertida de um gameta não funcional seria substancialmente atenuado. Um método que selecionasse espermatozoides explorando a

reotaxia positiva e migração por meio de um gradiente de viscosidade estaria simplesmente mimetizando os mecanismos naturais de seleção observados em mamíferos. Os espermatozoides com motilidade vigorosa sugerem mitocôndrias integras, portanto, com chances menores de terem sido alterados por processos apoptóticos, mesmo que incipientes, comprovando a integridade do DNA espermático⁽⁸⁵⁾. A migração em gradiente de viscosidade também selecionaria os espermatozoides com melhor desempenho hidrodinâmico, ou seja, com melhor morfologia, teoricamente livres de alterações estruturais que caso fossem herdadas prejudicariam o embrião nas fases iniciais de desenvolvimento⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾. Portanto, incorporando-se as características presentes em circuitos que utilizam microfluídica (em inglês: *Microfluidics*) em placas de ICSI, esta técnica passaria a dispor de seu próprio processo de seleção. Este aprimoramento da técnica de ICSI eliminaria a dependência do pré-processamento seminal, aumentando sua praticidade, segurança e possivelmente reduziria os custos.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

1. Descrever o desenvolvimento de uma técnica para seleção de espermatozoides em amostra seminal não processada para utilização na injeção intracitoplasmática de espermatozoides;
2. Avaliar o impacto desta técnica na melhora da morfologia espermática, comparando com a centrifugação com gradiente de densidade;
3. Avaliar o impacto desta técnica na redução da porcentagem de espermatozoides contendo cromatina imatura, comparando com a centrifugação com gradiente de densidade.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Local do estudo

O estudo foi conduzido no Laboratório de andrologia do Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

As análises seminais e a avaliação da maturidade da cromatina espermática foram realizadas no laboratório do Centro de Reprodução Humana do HCFMUSP.

3.2 Seleção de Pacientes

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do HCFMUSP sob Protocolo de Pesquisa número 069327/14 (Anexo 1). Homens provenientes de casais em atendimento no Centro de Reprodução Humana do HCFMUSP entre julho e novembro de 2014 foram convidados a participar deste estudo. Todos os pacientes receberam os termos do consentimento previamente aprovado pela comissão de pesquisa e somente foram inclusos após suas respectivas assinaturas.

Os homens incluídos no projeto de pesquisa foram excluídos da investigação através dos seguintes critérios de exclusão:

- Azoospermia;
- Volume ejaculado < 1.5 ml;
- Número superior a 1×10^6 de leucócitos / mL no sêmen;
- Concentração espermática inferior a 1×10^6 /ml.

Ao final da aplicação dos critérios de exclusão 40 homens foram incluídos no estudo.

3.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

O TCLE foi confeccionado em língua portuguesa, sem termos científicos e/ou elaborados, e de fácil compreensão pelos sujeitos da pesquisa. O TCLE foi entregue aos pacientes antes da realização da coleta da análise seminal e com total esclarecimentos sobre pontos de dúvidas dos sujeitos do estudo. Todos os dados obtidos no decorrer deste protocolo de pesquisa são confidenciais e o sigilo destes e a privacidade de todos os pacientes foram e continuam sendo mantidos. Caso os resultados do ensaio forem publicados, a identidade dos pacientes permanecerá confidencial, conforme exigido pelas normas nacionais e institucionais.

3.4 Critérios de Avaliação dos Pacientes

Os homens selecionados foram avaliados conforme os critérios abaixo listados:

- Análise seminal completa;
- Avaliação da maturidade da cromatina espermática.

Quarenta amostras seminais foram incluídas no estudo sendo inicialmente separadas em duas frações para subsequente análise conforme descrição a seguir.

A primeira fração (Fração A) não sofreu processamento e foi dividida em duas alíquotas. A primeira alíquota foi submetida á análise seminal completa e avaliação da maturidade espermática no sêmen a fresco (Alíquota 1 - SF). A segunda foi submetida ao método de captura de espermatozoide utilizando uma gota estendida com mecanismo

de contracorrente (GEMC) sendo realizada avaliação da maturidade espermática posteriormente (Alíquota 2 – GEMC SF).

A segunda fração da amostra original foi submetida ao processamento seminal por centrifugação em gradiente descontínuo (Fração B). Após o processamento a amostra foi dividida em duas alíquotas. A primeira foi submetida à avaliação da maturidade espermática no sêmen processado (Alíquota 3 - SP), enquanto a segunda foi submetida ao método de captura de espermatozoide utilizando GEMC sendo realizada avaliação da maturidade espermática posteriormente (Alíquota 4 – GEMC SP). A sequência de distribuição das frações e formação das alíquotas estão detalhados na Figura 1.

Figura 1 - Distribuição das frações do ejaculado, formação de alíquotas, procedimentos realizados e comparações realizadas

3.5 Análise Seminal

A análise seminal foi realizada em todas as amostras de acordo com as normas estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde em 2010. Todas as amostras de sêmen foram obtidas em salas apropriadas para coleta por meio de masturbação. Foi utilizado recipiente plástico de boca larga devidamente identificado, estéril e atóxico, na coleta das amostras. Todos os pacientes realizaram a coleta com abstinência sexual de 3 a 5 dias. Os pacientes que apresentaram perda seminal durante a coleta foram submetidos à nova coleta após período adequado de abstinência.

3.5.1 Avaliação macroscópica

3.5.1.1 Volume

O volume do ejaculado foi medido por aspiração de toda a amostra com o auxílio de uma pipeta graduada (Corning, USA).

3.5.2 Avaliação Microscópica

As amostras foram acondicionadas em uma incubadora (Fisher, Ontário, Canadá), à temperatura de 37°C, por 20 a 30 minutos, para que se procedesse a liquefação seminal. A avaliação microscópica inicial foi realizada após homogeneização do sêmen com o uso do agitador de tubos vortex (modelo AP 56, Cole-Parmer, São Paulo, Brasil), em velocidade média durante 5 segundos, determinando-se os seguintes parâmetros abaixo descritos.

3.5.2.1 Concentração espermática

A concentração espermática foi determinada através de câmaras de contagem do tipo Makler (Makler Counting Chamber – Mid Atlantic Diagnostics, Inc. Mount Laurel, EUA).

3.5.2.2 Motilidade espermática

A avaliação da motilidade quantitativa e qualitativa, segundo os padrões estipulados pela OMS ⁽⁴⁾, foi realizada na mesma câmara de contagem Makler com microscopia de fase, em aumento de 200 vezes (objetiva x 20). Utilizou-se uma alíquota de 5µl de sêmen, sendo realizada avaliação de 100 espermatozoides. Esse procedimento foi realizado duas vezes, sendo que em casos de diferença superior a 10% entre as duas avaliações, foi realizada uma terceira contagem. Utilizou-se a média dessas avaliações no cálculo da motilidade. A motilidade espermática foi definida pela multiplicação do número de espermatozoides móveis por 100, dividido pela concentração espermática. O resultado é expresso em porcentagem.

$\text{Motilidade espermática (\%)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de espermatozoides móveis} \times 100}{\text{N}^{\circ} \text{ de espermatozoides móveis} + \text{imóveis}}$
--

Com relação à motilidade qualitativa, os espermatozoides avaliados para a determinação da motilidade quantitativa foram distribuídos nas categorias a, b e c, de acordo com o grau de movimentação. As definições dos graus de motilidade foram classificadas segundo as recomendações da OMS ⁽⁸⁹⁾. A motilidade total foi calculada a partir da soma das porcentagens de espermatozoides grau a, b e c. A motilidade

progressiva foi calculada a partir da soma da motilidade grau a e grau b, segundo recomendações da OMS ⁽⁸⁹⁾.

- Motilidade grau a – espermatozoides móveis com progressão rápida;
- Motilidade grau b – espermatozoides móveis com progressão lenta;
- Motilidade grau c – espermatozoides móveis, porém sem progressão;
- Motilidade grau d – espermatozoides imóveis.

3.5.2.3 Morfologia espermática OMS 2010

Na avaliação da morfologia espermática, foram preparadas lâminas pela técnica de esfregaço seminal. As lâminas foram coradas por corante tipo Panótico, constituído de três soluções: fixante, corante I e corante II. Cada lâmina foi imersa cinco vezes na primeira solução, após secas, três vezes no corante I, seguido de cinco imersões no corante II. O excesso dos corantes foi retirado com suave gotejamento de água destilada sobre as lâminas. Duzentas células espermáticas, sob microscopia de imersão (1000x, objetiva x100), foram avaliadas em cada amostra. Segundo o critério estrito, o espermatozoide foi considerado normal quando seu segmento cefálico possuía configuração oval, absolutamente perfeita, medindo entre 5 e 6 µm de comprimento e 2,5 e 3,5 µm de largura ⁽⁹⁰⁾. Além disso, quando possuía o acrossomo bem definido, abrangendo cerca de 40% a 70% da porção cefálica do espermatozoide. Os segmentos cefálicos com formato limítrofe foram considerados anormais, assim como a presença de qualquer vacúolo. A existência de qualquer anormalidade na peça intermediária ou na cauda foi considerada anormal. A peça intermediária foi considerada normal quando se apresentava delgada, anexada à parte central do corpo, medindo menos de 1 µm de largura, sendo o comprimento aproximadamente uma vez e meia o do segmento cefálico.

A presença de inclusão citoplasmática também foi considerada anormal. A cauda foi considerada normal quando se apresentava uniforme, ligeiramente mais fina que a peça intermediária, medindo aproximadamente 45 μm , não podendo estar em espiral.

3.6 Centrifugação em gradiente descontínuo

Todos os procedimentos foram conduzidos em condições estéreis. Um mililitro da solução 90% do gradiente Isolate® (Irvine Scientific, USA) foi transferido para o fundo de um tubo cônico (Falcon BD 352095, USA). Sobre esta adicionou-se cuidadosamente uma camada de 1ml da solução 45% do mesmo gradiente. Uma amostra de sêmen liquefeito (1 ml) foi gentilmente disposta sobre a camada superior, de forma que não houvesse uma mistura entre as camadas. O tubo foi então centrifugado por 20 minutos a 300 g. Após a centrifugação, as camadas superiores e inferiores foram retiradas cuidadosamente sem que houvesse ressuspensão do pellet. Então, 2 ml de HTF-HEPES-10% SSS (Irvine Scientific, USA) foram acrescentados ao pellet que foi ressuspensão e centrifugado por 10 minutos a 300 g. O sobrenadante foi então removido e o pellet novamente ressuspensão com 0,5ml de HTF-HEPES-10% SSS.

3.7 Método de gota estendida com mecanismo de contracorrente de captura de espermatozoide

A confecção da placa com mecanismo contracorrente (GEMC) seguiu os mesmos padrões utilizados na confecção da placa ICSI convencional ⁽⁹¹⁾, exceto a gota central para deposição e captura dos espermatozoides. A placa ICSI convencional consiste em uma gota (usualmente 5 μ l de meio de cultivo suplementado com 7% de PVP) na qual se adiciona 1 μ l de sêmen processado, usualmente por centrifugação em gradiente de concentração (figura 2). Ao redor da gota central deposita-se as gotas para ovócitos.

Figura 2 - Placa ICSI convencional. As gotas de 1 a 8 são reservadas para os ovócitos. A gota central, marcada com um círculo vermelho, contém solução de PVP e 1 μ L da amostra seminal processada

A GEMC foi confeccionada utilizando-se seis gotas de meio de cultivo dispostas em uma sequência espacial e temporal precisas criando um circuito com dois reservatórios interligados por um canal. A diferença de pressão entre os dois reservatórios gerou um fluxo de meio de cultivo através do canal. O reservatório de controle de fluxo (RCF) foi confeccionado de forma a ter uma área menor e um volume maior, portanto, uma pressão hidrostática maior do que o reservatório de deposição da amostra seminal (RDAS). O fluxo de meio de cultivo gerado por essa diferença de

pressão deveria estar presente por pelo menos 45 minutos para cumprir duas funções principais. Primeiro, evitar a difusão de detritos e células mortas através do canal de ligação. Segundo, selecionar os espermatozoides com maior motilidade e resistência (figura 3).

Figura 3 – GEMC: Gota Estendida com Mecanismo Contracorrente

A confecção do circuito GEMC seguiu as mesmas especificações em todos os casos, pois qualquer alteração no posicionamento das gotas ou na sequência em que elas fossem unidas modificaria a dinâmica do fluxo, alterando o resultado esperado. A confecção da placa foi dividida em quatro etapas conforme descrito abaixo.

Na primeira etapa a placa foi virtualmente dividida em quatro partes iguais, por meio de uma linha imaginária horizontal e outra vertical. Inicialmente, uma gota de 10 µl de meio de cultivo foi posicionada no centro da placa (figura 3, gota 1). A segunda gota foi posicionada aproximadamente a 2/3 da distância entre a gota central e a borda superior da placa, seguindo a linha vertical (figura 3, gota 2). A terceira gota foi posicionada ainda no eixo vertical entre as duas existentes, mantendo a mesma distância

entre as anteriores (figura 3, gota 3). A quarta gota foi posicionada abaixo da primeira, também no eixo vertical, na mesma distância da terceira gota em relação ao centro (figura 3, gota 4).

A quinta gota foi posicionada no eixo horizontal na metade da distância entre a gota central e a borda direita da placa (figura 3, gota 5). A sexta gota foi posicionada na metade da distância entre a quinta gota e a borda direita da placa (figura 3, gota 6), também no eixo horizontal. Desta forma, a primeira etapa foi completada com o posicionamento de quatro gotas no eixo vertical e duas no eixo horizontal (figura 3, etapa 1).

Figura 4 - Posicionamento inicial das gotas de meio de cultivo - gota1: gota central; gota 2: gota posicionada a 2/3 da distância entre a gota central e a borda superior da placa; gota 3: gota posicionada na metade da distância entre a gota central e a gota 2; gota 4: gota posicionada abaixo da gota central respeitando a mesma distância entre as gotas anteriores; gota 5: gota posicionada na metade da distância entre a gota central e a borda direita da placa, respeitando o eixo horizontal; gota 6: gota posicionada na metade da distância entre a gota 5 e a borda direita da placa, respeitando o eixo horizontal; Etapa 1 (final): foto ilustrativa do final da Etapa 1

Na segunda etapa realizou-se a formação dos reservatórios. Inicialmente as duas gotas do eixo horizontal foram unidas, primeiro lateralmente e depois em um movimento vertical resultando em uma figura semelhante a um losango. Esta união resultou no RDAS. A formação do losango teve o objetivo de aumentar a área do reservatório diminuindo desta forma a pressão hidrostática (figura 5, etapas 2a – 2d). Na sequência, foram unidas as duas gotas inferiores do eixo vertical utilizando-se uma ponteira. Esta união resultou no RCF (figura 5, etapa 2e).

Figura 5 - Confeção dos reservatórios RCF (Reservatório de controle de fluxo) e RDAS (Reservatório de deposição da amostra seminal) - Etapa 2a: redimensionamento da gota 5 com extensão da extremidade superior; Etapa 2b: redimensionamento da gota 6 e fusão das extremidades superiores das gotas 5 e 6; Etapa 2c: redimensionamento da gota 5 com extensão da extremidade inferior; Etapa 2d: redimensionamento da gota 6 e fusão das extremidades inferiores das gotas 5 e 6 concluindo a formação do RDAS; Etapa 2e: fusão da gota central e gota 4 formando o RCF; Etapa 2 (final): foto ilustrativa do final da Etapa 2

Na etapa 3 realizou-se a formação do canal. Com a ajuda da mesma ponteira utilizada na etapa 2 estendeu-se um canal partindo da extremidade inferior do RCF até a metade da distância entre o RCF e a borda inferior da placa; sempre sobre o eixo vertical (figura 6, etapa 3a). Da região inferior do losango estendeu-se um canal em forma de arco, ligando o RDAS à extremidade inferior do canal proveniente do RCF (figura 6, etapa 3b). A junção dos dois canais ocorreu em um ângulo aproximado de 90°. Ao final da etapa 3 obteve-se o RCF e o RDAS ligados por um canal com uma junção em cotovelo e duas gotas restantes acima do RCF (figura 6, etapa 3 - final).

Na quarta etapa realizou-se a conclusão do circuito e a deposição das gotas que conteriam os ovócitos. Esta etapa iniciou-se com a transferência do volume da gota posicionada logo acima do RCF (gota 3) para o próprio RCF. Na “marca” deixada pela gota que foi esvaziada depositou-se 10µl de solução de PVP (7%). Em seguida, a borda superior do RCF foi unida à gota de PVP. Da mesma forma, uniu-se a borda inferior da gota restante (gota 2) à gota de PVP (figura 6, etapa 4a).

A ponteira, contendo resíduos de PVP foi então trocada. Em seguida, para aumentar ainda mais a diferença de pressão entre RCF e RDAS, retirou-se 10µl de meio de cultivo do centro do RDAS e adicionou-se esse volume ao RCF. Rapidamente depositou-se 5µl de amostra seminal no centro do RDAS. A ponteira foi trocada novamente. Foram acrescentadas então 4 gotas de 10µl de meio de cultivo para a deposição dos ovócitos (figura 6, etapa 4b).

Figura 6 - Formação do canal entre RCF (Reservatório de controle de fluxo) e RDAS (Reservatório de deposição da amostra seminal), conclusão do circuito e deposição das gotas que conterão os ovócitos - Etapa 3a: redimensionamento do RCF com extensão da extremidade inferior; Etapa 3b: formação do canal ligando a extremidade inferior do RCF à extremidade inferior do RDAS; Etapa 3 (final): foto ilustrativa do final da Etapa 3; Etapa 4a: fusão da gota 1 com a gota 2 (que contém PVP – polivinilpirrolidone) e deposição da amostra seminal no RDAS; Etapa 4b: conclusão do circuito e deposição das gotas que conterão os ovócitos ; Etapa 4 (final): foto ilustrativa do final da Etapa 4

Após a confecção do circuito e adição das gotas para oócitos a placa foi coberta com 4-6 ml de óleo mineral (figura 3).

No método GEMC-SF foram utilizadas amostras não processadas, enquanto que no método GEMC-SP utilizou-se amostras processadas. Deixou-se a placa descansar por

aproximadamente 15 minutos em uma mesa de aquecimento (T-47, K-Systems - Dinamarca) a 37°C até que fosse levada ao microscópio invertido para a captura dos espermatozoides.

3.8 Análise das características do sistema GEMC

Para garantir que o método GEMC seja reprodutível foram obtidas medidas de todos os circuitos. Foram medidos o comprimento e a largura do canal, o tempo em que o meio de cultivo continua fluindo, o tempo gasto até a captura do primeiro espermatozoide e o tempo total para a captura de aproximadamente 200 gametas.

Para evidenciar a dinâmica dos fluidos um circuito GEMC foi confeccionado em uma placa ICSI padrão e corantes foram utilizados para facilitar a observação. Adicionou-se corante vermelho à solução de PVP. Uma gota de 10 µL de meio de cultivo corada em amarelo foi adicionada ao reservatório de controle de fluxo (RCF). Outra gota de 10 µL contendo meio de cultura corado em azul foi adicionada ao reservatório de deposição da amostra seminal (RDAS), mimetizando uma amostra seminal. Fotos foram obtidas logo após a deposição dos corantes, cinco minutos após e 15 minutos após, evidenciando o fluxo de líquido no canal e a formação do gradiente de PVP.

3.9 Análise da maturidade da cromatina espermática

Os espermatozoides foram corados segundo técnica descrita anteriormente ⁽²⁹⁾
⁽³⁰⁾. As lâminas foram preparadas como esfregaço nas amostras de sêmen e pós-preparo (gradiente de concentração ou lavado). No caso da gota estendida (sêmen ou gradiente)

as lâminas foram previamente marcadas com ponta diamantada nas quais foram depositadas gotas de 5 µl de água destilada. Os espermatozoides coletados através de micropipetas foram adicionados nestas gotas marcadas. As lâminas foram deixadas para secar durante a noite.

As lâminas desidratadas foram fixadas em solução alcoólica (95%) por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram coradas em solução 5% de azul de anilina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) em solução 4% de ácido acético (pH 3,5) por 5 minutos. Então, as lâminas foram lavadas em água corrente e coradas com solução de eosina 0,5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) por 1 minuto. Isto foi seguido por novo enxague em água e secagem ao ar. Os espermatozoides foram avaliados em microscópio ótico de campo claro em aumento de 1.000x. Gametas imaturos coram-se em roxo (devido ao contraste da eosina) enquanto que os gametas maduros apresentam uma coloração rósea alaranjada. Foram analisados 200 espermatozoides por lâmina nos esfregaços e todos os encontrados no material proveniente da captura com micropipeta.

3.10 Análise estatística

Para a análise descritiva dos dados analisados utilizamos a média e desvio padrão (SD). A normalidade na distribuição dos dados nas amostras foi verificada através do teste Shapiro-Wilk. Para a comparação de dados pareados utilizou-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon.

Foi calculada a eficiência de cada método (CGD, GEMC-SF, GEMC-CGD) através do cálculo da redução relativa do percentual de imaturidade da cromatina espermática em relação à amostra não processada (SF). Este cálculo foi efetuado através da subtração da percentagem média de fragmentação do DNA obtida em cada método da

percentagem média de fragmentação do DNA do sêmen não processado, dividido pela percentagem média de fragmentação do DNA do sêmen não processado, multiplicado por 100.

Todas as análises estatísticas foram feitas com o programa SPSS® versão 22.0 (SPSS® Inc; Ilinois, EUA). O valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Descrição da idade dos pacientes e características dos parâmetros seminais

A idade dos pacientes e características dos parâmetros seminais estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Descrição da idade dos pacientes e características dos parâmetros seminais

Características	(n = 40)
Idade (anos)	34,45 ± 7,78
Volume (mL)	3,62 ± 1,85
Concentração (x10 ⁶ /mL)	62,18 ± 53,59
Motilidade progressiva (%)	31,88 ± 17,90
Morfologia OMS (%)	13,31 ± 8,91

NOTA: OMS = Organização Mundial da Saúde. Valores descritos como: média ± desvio padrão.

4.2 Descrição das características do sistema GEMC

O comprimento médio do canal principal, medido do ponto de deposição da amostra seminal até o ponto de captura dos espermatozoides foi de 32,55 ± 0,86 mm, com uma largura média de 1,04 ± 0,21 mm. O circuito GEMC foi capaz de manter um fluxo direcional por pelo menos 45 minutos. Em 82,5% dos casos (33/40), pelo menos 50 espermatozoides foram capturados entre 15 e 30 minutos. Em apenas 5 casos (12,5%) todos os espermatozoides foram capturados entre 30 e 45 minutos. Foi encontrada uma correlação positiva entre a concentração espermática e a porcentagem de

espermatozoides capturados antes de 30 minutos, utilizando-se o circuito GEMC ($R^2 = 62\%$, $P < 0,001$).

No experimento de migração dos corantes (figura 7) evidenciou-se a segurança do método GEMC. O aporte constante de meio de cultivo através do canal manteve a amostra seminal confinada no RDAS evitando a difusão de contaminantes. Outra observação foi a formação do gradiente de viscosidade pela migração do PVP através do RCF. Portanto, o experimento confirmou a proposição de que os espermatozoides deveriam abandonar a amostra seminal, nadar contra o fluxo através do canal e finalmente atravessar um gradiente de viscosidade até atingirem o ponto de captura no final do circuito.

Figura 7 – Teste utilizando corantes para evidenciar a dinâmica dos fluidos no aparato de seleção de espermatozoides. A) Um circuito GEMC foi confeccionado em uma placa ICSI padrão. RCF: reservatório de controle de fluxo; RDAS: reservatório de deposição da amostra seminal. B) O meio de cultivo (amarelo) começa a fluir através do canal a partir do RCF; o PVP (vermelho) difunde lentamente através do RCF; a amostra seminal (azul) permanece confinada no RDAS; o meio de cultivo alcança o RDAS e previne a difusão da amostra seminal através do canal. C) A mudança de azul para verde sinaliza o constante aporte de meio de cultivo no RDAS, impedindo a difusão de debris e contaminantes; formação do gradiente de PVP no RCF; o gameta masculino deve nadar contra o fluxo e através de um gradiente de PVP afim de alcançar o ponto de captura

4.3 Comparação da morfologia e da maturidade espermática entre sêmen fresco e após a utilização da técnica GEMC com amostras seminais não processadas

A Tabela 2 apresenta os valores da morfologia e maturidade espermática no sêmen fresco e após a utilização da gota estendida com mecanismo contracorrente, podendo-se observar melhor morfologia e menor imaturidade da cromatina espermática após a utilização da técnica GEMC.

Tabela 2 – Comparação entre sêmen fresco e GEMC - SF

	Sêmen fresco (Aliquota 1)	GEMC - SF (Aliquota 2)	<i>P</i>
Morfologia (% de formas normais)	12,11 ± 8,93	57,59 ± 9,47	<0,001
Azul de anilina (% de formas imaturas)	28,65 ± 8,97	0,89 ± 1,31	<0,001

NOTA: GEMC - SF = Gota estendida com mecanismo contracorrente utilizando sêmen fresco.

4.4 Comparação da morfologia e da maturidade espermática entre sêmen fresco e após o processamento convencional

A Tabela 3 apresenta os valores da morfologia e maturidade espermática no sêmen fresco e após a realização do processamento seminal, podendo-se observar melhor morfologia e menor imaturidade da cromatina espermática após a utilização do processamento com centrifugação com gradiente de concentração.

Tabela 3 – Comparação entre sêmen fresco e CGD

	Sêmen fresco (Aliquota 1)	CGD (Aliquota 3)	<i>P</i>
Morfologia (% de formas normais)	12,11 ± 8,93	27,91 ± 11,67	<0,001
Azul de anilina (% de formas imaturas)	28,65 ± 8,97	17,29 ± 7,72	<0,001

NOTA: CGD = Sêmen processado por centrifugação com gradiente de concentração.

4.5 Comparação da morfologia e da maturidade espermática entre sêmen após o processamento convencional e após a utilização da técnica GEMC com amostras seminais processadas

A Tabela 4 apresenta os valores da morfologia e maturidade espermática nos espermatozoides selecionados após a realização do processamento seminal e após a utilização da gota estendida com mecanismo contracorrente também em amostra processada, podendo-se observar melhor morfologia e menor imaturidade da cromatina espermática após a utilização da técnica GEMC.

Tabela 4 - Comparação entre CGD e GEMC - CGD

	CGD (Aliquota 3)	GEMC – CGD (Aliquota 4)	<i>P</i>
Morfologia (% de formas normais)	27,91 ± 11,67	56,82 ± 9,28	<0,001
Azul de anilina (% de formas imaturas)	17,29 ± 7,72	1,05 ± 1,63	<0,001

NOTA: CGD = Sêmen processado por centrifugação com gradiente de concentração. GEMC - CGD = Gota estendida com mecanismo contracorrente utilizando sêmen processado.

4.6 Comparação da morfologia e da maturidade espermática após a utilização da técnica GEMC com amostras seminais não processadas e após a utilização da técnica GEMC com amostras seminais processadas

A Tabela 5 apresenta os valores da morfologia e maturidade espermática nos espermatozoides selecionados por meio da utilização da gota estendida com mecanismo contracorrente também em amostra processada e não processada, podendo-se observar não haver diferença significativa nos valores encontrados.

Tabela 5 - Comparação entre GEMC - SF e GEMC - CGD

	GEMC – SF (Aliquota 2)	GEMC – CGD (Aliquota 4)	<i>P</i>
Morfologia (% de formas normais)	57,59 ± 9,47	56,82 ± 9,28	0,4679
Azul de anilina (% de formas imaturas)	0,89 ± 1,31	1,05 ± 1,63	0,2516

NOTA: GEMC - SF = Gota estendida com mecanismo contracorrente utilizando sêmen fresco. GEMC - CGD = Gota estendida com mecanismo contracorrente utilizando sêmen processado.

4.7 Comparação da redução relativa na imaturidade da cromatina espermática em comparação com o sêmen fresco dos tratamentos CGD, GEMC-SF e GEMC-CGD

A Figura 8 demonstra a capacidade dos métodos CGD, GEMC-SF e GEMC-CGD em selecionar espermatozoides maduros. A eficiência foi definida como a redução relativa na percentagem de espermatozoides imaturos em relação ao sêmen fresco. Pode-se observar que o processamento por centrifugação com gradiente de densidade (CGD) resulta em uma redução de 39,6% na imaturidade da cromatina espermática em relação ao sêmen fresco (SF). No entanto, o tratamento com o método GEMC é mais eficiente tanto a partir de amostras seminais (96,9%), quanto a partir de amostras processadas (96,3%).

NOTA: CGD = Centrifugação com gradiente de densidade. GEMC - SF = Gota estendida com mecanismo contracorrente utilizando sêmen fresco. GEMC - CGD = Gota estendida com mecanismo contracorrente utilizando sêmen processado por CGD

Figura 8 - Comparação da redução relativa na imaturidade da cromatina espermática em comparação com o sêmen fresco dos tratamentos CGD, GEMC-SF e GEMC-CGD

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) tornou-se nas últimas décadas uma ferramenta de valor inestimável no tratamento da infertilidade masculina. Este sucesso se deve à capacidade de ultrapassar virtualmente todas as barreiras naturais que impediriam o gameta masculino de fertilizar o ovócito ⁽⁹²⁾. Nos casos extremamente graves, quando apenas poucos espermatozoides estão disponíveis, tanto a morfologia como a motilidade podem não ser valorizadas na tentativa de possibilitar a paternidade do casal infértil ⁽⁹³⁾. No entanto, a utilização de tais gametas aumenta o risco de comprometimento genético da prole, risco esse que deve ser ponderado pelo casal em tratamento ⁽⁴⁴⁾. Por sua praticidade e eficácia a técnica de ICSI vem sendo utilizada não só no tratamento do fator masculino grave, para o qual foi desenvolvida, mas responde hoje por mais de 70% dos ciclos de reprodução assistida. A utilização indiscriminada dessa técnica ocasiona uma série de preocupações relativas à segurança e possíveis implicações genéticas dos embriões ⁽⁶⁴⁾.

Uma das principais críticas à técnica de ICSI é que a inspeção visual isoladamente, pode permitir a seleção inadvertida de espermatozoides portadores de vários níveis de patogênese ^(64, 94, 95). Isto ocorre porque a ICSI é em essência um processo de “escolha”, não de “seleção”, portanto, dependente de um processamento seminal prévio. Consequentemente a seleção e a captura, e posterior injeção, não são eventos consecutivos. Desta forma, o espermatozoide que será escolhido para injeção pode não ser um dos primeiros que foram selecionados no processamento seminal prévio.

Dentre os métodos de processamento seminal atualmente disponíveis a CGD é o mais comumente utilizado em laboratórios de Reprodução Assistida ^(96, 97). Esta técnica se mostrou eficiente na seleção de espermatozoides móveis e morfologicamente normais, porém possui a tendência de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) durante as etapas de centrifugação ⁽⁹⁸⁾. Estudos recentes questionam a segurança desse procedimento sugerindo a indução de danos *de novo* ao DNA espermático ^(99, 100).

Recentemente, foram desenvolvidos novos sistemas de seleção que utilizam a microfluídica (em inglês: *Microfluidics*) e permitem a seleção de espermatozoides com melhor morfologia, alto grau de maturidade da cromatina espermática e maior integridade do DNA em comparação com espermatozoides selecionados por métodos tradicionais ^(74, 76, 101). Um dos méritos de se utilizar um dispositivo de microfluídica em reprodução assistida é a não necessidade de uma etapa de centrifugação. A eliminação da etapa de centrifugação minimiza a exposição dos espermatozoides a espécies reativas de oxigênio prevenindo a fragmentação do DNA ^(71, 77).

Neste estudo desenvolveu-se um método efetivo baseado em dispositivos seletores de espermatozoides que utilizam microfluídica (do inglês: *Microfluidic Sperm Sorters* - MFSSs) com o intuito de promover uma seleção segura de espermatozoides usando uma placa ICSI padrão, sem processamento seminal prévio. Desta forma, a lacuna entre seleção e captura presente na técnica tradicional foi superada. Os resultados revelam que o método GEMC foi mais eficiente na remoção de espermatozoides contendo cromatina espermática imatura, comparando-se com a centrifugação com gradiente de densidade (CGD). A morfologia espermática também foi significativamente melhorada, utilizando-se o método em estudo em comparação com o CGD.

O método GEMC nada mais é do que o aprimoramento de um dos aspectos da técnica de ICSI: a confecção da placa. Os demais aspectos são mantidos como originalmente descritos por Palermo et. al. (1992)⁽⁷⁾. O método GEMC assemelha-se às “gotas ICSI estendidas” anteriormente descritas^(102, 103) apresentando também características particulares que permitem a seleção e captura de espermatozoides em um único procedimento. O método consiste na confecção de reservatórios de meio de cultivo (um deles contendo solução de PVP), ligados por um canal.

Quando uma amostra espermática é introduzida no reservatório de entrada do circuito GEMC os espermatozoides se movem aleatoriamente a partir do sítio de deposição e se acumulam próximo às bordas⁽¹⁰⁴⁾, deixando debris, espermatozoides não progressivos e espermatozoides imóveis para trás. Nadando ao longo das bordas⁽¹⁰⁵⁾ os espermatozoides móveis alcançam a junção entre o reservatório de deposição da amostra seminal e o canal de ligação, onde são arrastados pelo fluxo de meio de cultivo dentro do canal. O fluxo é gerado pela pressão hidrostática criada pela diferença de altura da coluna de meio de cultivo nos reservatórios⁽¹⁰⁶⁾. A altura da coluna de meio de cultivo nos reservatórios muda levemente e progressivamente à medida em que o fluxo no canal de ligação se estabelece. Inicialmente, o fluxo no canal supera a capacidade de natação dos espermatozoides, porém, neste sistema de bombeamento por gravidade, a taxa de fluxo diminui ao longo do tempo à medida que o volume de fluido no reservatório de controle de fluxo diminui⁽¹⁰⁷⁾, desta forma os espermatozoides que apresentam motilidade vigorosa são capazes de nadar contra a corrente – fenômeno descrito como reotaxia positiva⁽⁸⁴⁾. Os gametas que exibem o comportamento de reotaxia positiva alinham-se contra o fluxo espalhando-se por todo canal^(108, 109), evitando uma concentração excessiva nas bordas e reduzindo a probabilidade de colisão entre as células^(105, 110). Após nadar um longo percurso contra o fluxo, os espermatozoides

adentram um trecho com fluxo decrescente e viscosidade progressiva (gradiente de PVP). Temos então, a oportunidade perfeita para a captura dos gametas, ou seja, espermatozoides movendo-se lentamente junto à borda em um ambiente livre de impurezas ou células mortas.

O método GEMC possui algumas semelhanças com o swim-up, porém, incorpora algumas características inovadoras dos dispositivos microfluídicos de seleção de espermatozoides, tais como canal de migração estreito ⁽⁷³⁾, bombeamento por gravidade ⁽¹⁰⁶⁾ e fluidos com alta viscosidade ⁽⁷⁴⁾. Pelo nosso entendimento, esta é a primeira vez que todos esses recursos são usados no mesmo método, não como um dispositivo de microfluídica, mas como uma gota ICSI modificada.

Usando um método inspirado em dispositivos de seleção de espermatozoides que utilizam microfluídica, nós obtivemos resultados semelhantes na melhora da morfologia espermática e no status da maturidade da cromatina. Provavelmente também ocorreu uma seleção de espermatozoides com melhor integridade do DNA, já que o método descrito compartilha as mesmas características de seleção. Estudos recentes correlacionam a protaminação ineficiente com a fragmentação do DNA ^(111, 112). Sendo que o método GEMC foi capaz de reduzir substancialmente a porcentagem de espermatozoides contendo cromatina imatura, seria razoável supor que as taxas de fragmentação de DNA também foram reduzidas. Para corroborar tais inferências, serão necessários estudos clínicos multicêntricos comparando a redução dos níveis de fragmentação do DNA espermático obtida pelas técnicas convencionais de processamento seminal e a redução obtida pela GEMC.

Analisando do ponto de vista da segurança do método, o longo canal e a contracorrente evitam a difusão de debris e contaminantes, permitindo o uso de sêmen

não processado diretamente na placa de ICSI. Quanto à praticidade, este método de seleção espermática é relativamente simples de ser utilizado, e apesar de não ter sido descrito, não aumenta de forma significativa o tempo do procedimento. Além disso, utiliza os mesmos insumos que uma placa ICSI padrão e não requer qualificação técnica adicional.

Portanto, tendo como base a descrição detalhada do procedimento e os resultados obtidos até o presente momento, a GEMC pode ser considerada um aprimoramento da técnica de ICSI clássica. Sendo assim, a ICSI se tornaria uma técnica ainda mais completa compreendendo seleção, captura e injeção do gameta masculino.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

As conclusões deste estudo são:

1. O estudo evidenciou o aprimoramento da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides que permite a utilização de amostras seminais não processadas;
2. A técnica apresentada selecionou espermatozoides com melhor morfologia e maior maturidade em relação aos encontrados no sêmen fresco ou após o processamento realizado por meio da centrifugação em gradiente descontínuo;
3. A realização do processamento seminal realizado por meio da centrifugação em gradiente descontínuo previamente a técnica descrita no estudo não apresentou impacto na morfologia ou maturidade dos espermatozoides selecionados.

7 ANEXOS

7 ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do projeto de pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Estudo do impacto da utilização do método de gota estendida com mecanismo de contracorrente na seleção de espermatozoides utilizando avaliação da maturidade da cromatina espermática.		
Pesquisador: Marcello Antonio Signorelli Cocuzza		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 34767014.7.0000.0068		
Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 759.661		
Data da Relatoria: 20/08/2014		
Apresentação do Projeto:		
O projeto é um estudo de viabilidade de espermatozoides de indivíduos em tratamento de infertilidade tendo como critério a fragmentação da cromatina em função de métodos de separação de células.		
Objetivo da Pesquisa:		
O objetivo da pesquisa é testar a técnica de contra-fluxo e verificar se ela aumenta a eficiência da seleção de espermatozoides, quando comparada a outras técnicas. A comparação é baseada principalmente na fragmentação do DNA da fração selecionada.		
Avaliação dos Riscos e Benefícios:		
A coleta de sêmen e de sangue dos participantes representa risco mínimo e não ausência total de risco, como se lê nas informações básicas do projeto.		
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:		
A pesquisa pode melhorar a eficiência dos processos terapêuticos de fertilização, sendo relevante o teste de técnicas de seleção de espermatozoides. Não há problemas na concepção do projeto que possam invalidá-la.		
Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar		
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010		
UF: SP Município: SAO PAULO		
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 759.661

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo de consentimento apresentado tem linguagem adequada e pode ser compreendido pelos participantes, descrevendo adequadamente os procedimentos.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto tem as condições necessárias para ser aprovado pela comissão.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 21 de Agosto de 2014

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. ASRM. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013;99(1):63.
2. Mascarenhas M, Flaxman S, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens G. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*. 2012;9(12): e1001356.
3. Ombelet W, Cooke I, Dyer S, Serour G, Devroy P. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Human Reprod Update*. 2008;14(6):605-21.
4. Inhorn M, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update*. 2015;21(4):411-26.
5. NICE. National Institute for Health and Clinical Excellence. Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems. Clinical Guideline. 2013: p. 156.
6. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics*. 2011;66(4): 691-700.
7. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992;340(8810):17-8.
8. Barratt CL, Naeeni M, Clements S, Cooke ID. Andrology: Clinical value of sperm morphology for in-vivo fertility: comparison between World Health Organization criteria of 1987 and 1992. *Hum Reprod*. 1995;10(3):587-93.

9. Aitken RJ, Best FS, Richardson DW, Djahanbakhch O, Mortimer D, Templeton AA, Lees MM. An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility: conventional criteria, movement characteristics, and fertilizing capacity. *Fertil Steril*. 1982;38(2):212-21.
10. Aitken RJ, De Luliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online*. 2007;14(6):727-33.
11. Yanagimachi R. Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization? *Biol Reprod*. 2011;85(1):4-5.
12. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ Jr, Alvarez JG, Sikka SC. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril*. 2006;86(4): 878-85.
13. Coddington CC, Franken DR, Burkman LJ, Oosthuizen WT, Kruger T, Hodgen GD. Functional aspects of human sperm binding to the zona pellucida using the hemizona assay. *J Androl*. 1991;12(1):1-8.
14. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 1999;14(4):1039-49.
15. Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston K, Hotaling J, Carrell DT. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod*. 2014;29(11):2402-12.
16. Beardsley A, Robertson DM, O'Donnell L. A complex containing alpha6beta1-integrin and phosphorylated focal adhesion kinase between Sertoli cells and elongated spermatids during spermatid release from the seminiferous epithelium. *J Endocrinol*. 2006;190(3):759-70.

17. Golan R, Shochat L, Weissenberg R, Soffer Y, Marcus Z, Oschry Y, Lewin LM. Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: a flow cytometric assay using acridine orange staining. *Mol Hum Reprod.* 1997;3(1):47-54.
18. Hammoud S, Liu L, Carrell DT. Protamine ratio and the level of histone retention in sperm selected from a density gradient preparation. *Andrologia.* 2009;41(2):88-94.
19. Ward WS, Zalensky AO. The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Crit Re Eukaryot Gene Expr.* 1996;6(2-3):139-47.
20. Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(1):30-6.
21. Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl.* 1992;15(4):330-7.
22. Huszar G, Celik-Ozenci C, Cayli S, Kovacs T, Vigue L, Kovanci E. Semen characteristics after overnight shipping: preservation of sperm concentrations, HspA2 ratios, CK activity, cytoplasmic retention, chromatin maturity, DNA integrity, and sperm shape. *J Androl.* 2004;25(4):593-604.
23. Laberge RM, Boissonneault G. Chromatin remodeling in spermatids: a sensitive step for the genetic integrity of the male gamete. *Arch Androl.* 2005;51(2):125-33.
24. Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl.* 1990;13(6):452-62.

25. Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*. 1988;20(3):211-7.
26. Hingst O, Blottner S, Franz C. Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. *Andrologia*. 1995;27(5):275-9.
27. Hammadeh ME, Zeginiadov T, Rosenbaum P, Geog T, Schmidt W, Strehler E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl*. 2001;46(2): 99-104.
28. Talebi AR, Moein MR, Tabibnejad N, Ghasemzadeh J. Effect of varicocele on chromatin condensation and DNA integrity of ejaculated spermatozoa using cytochemical tests. *Andrologia*. 2008;40(4):245-51.
29. Wong A, Chuan SS, Patton WC, Jacobson JD, Corselli J, Chan PJ. Addition of eosin to the aniline blue assay to enhance detection of immature sperm histones. *Fertil Steril*. 2008;(90(5):1999-2002.
30. Park YS, Kim MK, Lee S-H, Cho JW, Song IO, Seo JT. Efficacy of testicular sperm chromatin condensation assay using aniline blue-eosin staining in the IVF-ET cycle. *Clin Exp Reprod Med*. 2011;38(3):142-7.
31. Talebi AR, Vahidi S, Aflatoonian A, Ghasemi N, Ghasemzadeh J, Firoozabadi R, Moein MR. Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia*. 2012;44 Suppl 1:462-70.
32. Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, de Villiers A. Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia*. 1999;31(6):361-6.

33. Salsabili N, Mehraei A, Jalalizadeh B, Pourmand G, Jataie S. Correlation of sperm nuclear chromatin condensation staining method with semen parameters and sperm functional tests in patients with spinal cord injury, varicocele, and idiopathic infertility. *Urol J*. 2006;3(1):32-7.
34. Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, Hotaling J, Aston K, Emery B, Carrell DT. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Hum Reprod*. 2014;29(5): 904-17.
35. Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE. Seeds of concern. *Nature*. 2004;432(7013): 48-52.
36. Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenic maturation in men: relationship among plasma membrane beat 1,4 galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod*. 1997;56(4):1020-4.
37. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 2001;122(4):497-506.
38. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010;93(4):1027-36.
39. Derijck A, van der Heijden G, Giele M, Philippens M, de Boer P. DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Hum Mol Genet*. 2008;17(13): 1922-37.
40. Marchetti F, Wyrobek AJ. DNA repair decline during mouse spermiogenesis results in the accumulation of heritable DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2008;7(4):572-81.

41. Yamauchi Y, Riel JM, Ward MA. Paternal DNA damage resulting from various sperm treatments persists after fertilization and is similar before and after DNA replication. *J Androl.* 2012;33(2):229-38.
42. Aitken RJ, Bronson R, Smith TB, De Iullis GN. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(8):475-85.
43. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: Systematic review and meta-analysis. *Hum reprod.* 2008; 23(12):2663-8.
44. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, Kirkman-Brown J, Coomarasamy A. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2012;27(10):2908-17.
45. Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl.* 2014;16(1):31-8.
46. Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Maes M, Punjabi U, et al. Multicenter study on reproducibility of sperm morphology assessments. *Arch Androl.* 1998;41(2):103-14.
47. Kruger TF, Acosta AS, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1988;49(1): 112-7.
48. Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, et al. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Hum Reprod.* 1997;12(5): 987-93.

49. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod.* 2001;16(6):1165-71.
50. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N Engl J Med.* 2001;345(14):1067-8.
51. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, Antinori S. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online.* 2008;16(6):835-41.
52. Ramos L, Wetzels AM. Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. *Hum Reprod.* 2001;16(8):1703-7.
53. Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril.* 2005;84(1):130-40.
54. Derijck AA, van der Heijden GW, Ramos L, Giele M, Kremer JA, de Boer P. Motile human normozoospermic and oligozoospermic semen samples show a difference in double-strand DNA break incidence. *Hum Reprod.* 2007;22(9):2368-76.
55. Simon L, Lewis SE. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro? *Syst Biol Reprod Med.* 2011;57(3): 133-8.
56. Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, Aitken RJ. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J.* 2011;436(3):687-98.

57. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod.* 2000;15(5):1112-6.
58. Jakab A, Kovacs T, Zavaczki Z, Borsos A, Bray-Ward P, Ward D, Huszar G. Efficacy of the swim-up method in eliminating sperm with diminished maturity and aneuploidy. *Hum Reprod.* 2003;18(7):1481-8.
59. Tomlinson MJ, Moffat O, Manicardi G, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Human Reprod.* 2001;16(10):2160-5.
60. Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken R. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod.* 1998;4(5):439-45.
61. Ricci G, Perticarari S, Boscolo R, Montico M, Guashino S, Presani G. Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertil Steril.* 2009;91(2):632-8.
62. Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl.* 2003;24(2):253-62.
63. Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art-physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl.* 2012;14(2): 260-9.
64. Sakkas D. Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2013;99(4):1023-9.

65. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Revelli A, Huszar G. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril*. 2005;84(6):1665-73.
66. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M. "Physiologic ICSI": hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril*. 2010;93(2):598-604.
67. Worilow KC, Eid S, Woodhouse D, Perloe M, Smith S, Witmyer J, Ivani K, Khoury C, Ball GD, Elliot T, Lieberman J. Use of hyaluronan in the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI): significant improvement in clinical outcomes - multicenter, double-blinded and randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2013;28(2):306-14.
68. Polak de Fried E, Denaday F. Single and twin ongoing pregnancies in two cases of previous ART failure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads. *Fertil Steril*. 2010;94(1):351.e15-8.
69. Rawe VY, Boudri HU, Sedo C, Carro M, Papier S, Nodar F. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2010;20(3):320-3.
70. Cho BS, Schuster TG, Zhu X, Chang D, Smith GD, Takayama S. Passively driven integrated microfluidic system for separation of motile sperm. *Anal Chem*. 2003;75(7):1671-5.
71. Schuster TG, Cho B, Keller LM, Takayama S, Smith GD. Isolation of motile spermatozoa from semen samples using microfluidics. *Reprod BioMed Online*. 2003;7(1):75-81.
72. Wu JM, Chung Y, Belford KJ, Smith GD, Takayama S, Lahann J. A surface-modified sperm sorting device with long-term stability. *Biomed Microdevices*. 2006;8(2):99-107.

73. Tasoglu S, Safaee H, Zhang X, Kingsley JL, Catalano PN, Gurkan UA, et al. Exhaustion of racing sperm in nature-mimicking microfluidic channels during sorting. *Small*. 2013;9(20):3374-84.
74. Nosrati R, Vollmer M, Eamer L, San Gabriel MC, Zeidan K, Zini A, Sinton D. Rapid selection of sperm with high DNA integrity. *Lab Chip*. 2014;14(6):1142-50.
75. Wheeler MB, Walters EM, Beebe DJ. Toward culture of single gametes: the development of microfluidic platforms for assisted reproduction. *Theriogenology*. 2007;68 Suppl 1:S178-89.
76. Zhang B, Yin T, Yang J. A novel microfluidic device for selecting human sperm to increase the proportion of morphologically normal, motile sperm with uncompromised DNA integrity. *Anal Methods*. 2015;7:5981-8.
77. Matsuura K, Uozumi T, Furuichi T, Sugimoto I, Kodama M, Funahashi H. A microfluidic device to reduce treatment time of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2013;99(2):400-7.
78. Friend J, Yeo L. Fabrication of microfluidic devices using polydimethylsiloxane. *Biomicrofluidics*. 2010;4(2):pii. 026502.
79. Qin D, Xia Y, Whitesides GM. Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nat Protoc*. 2010;5(3):491-502.
80. Yeo LY, Chang HC, Chan PP, Friend JR. Microfluidic devices for bioapplications. *Small*. 2011;7(1):12-48.
81. Iliescu C, Taylor H, Avram M, Miao J, Franssila S. A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon. *Biomicrofluidics*. 2012;6(1):16505-16.

82. Matsuura K, Takenami M, Kuroda Y, Hyakutake T, Yanase S, Naruse K. Screening of sperm velocity by fluid mechanical characteristics of a cyclo-olefin polymer microfluidic sperm-sorting device. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(1):109-15.
83. Lopez-Garcia MD, Monson RL, Haubert K, Wheeler MB, Beebe DJ. Sperm motion in a microfluidic fertilization device. *Biomed Microdevices*. 2008;10(5):709-18.
84. Miki K, Clapham DE. Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr Biol*. 2013;23(6):443-52.
85. Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*. 2013;146(5):R163-74.
86. Tesarik J, Greco E, Mendonza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod*. 2004;19(3):611-5.
87. Smith DJ, Gaffney EA, Gadellha H, Kapur N, Kirkman-Brown JC. Bend propagation in the flagella of migrating human sperm, and Its modulation by viscosity. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2009;66(4):220-36.
88. Kirkman-Brown JC, Smith DJ. Sperm motility: is viscosity fundamental to progress?. *Mol Hum Reprod*. 2011;17(8):539-44.
89. World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: WHO Press; 2010.
90. Kruger T, Franken D. Atlas of human sperm morphology evaluation. 1st ed. London: Taylor and Francis; 2004.
91. Honig SC, Lipshultz LI, Jarow J. Significant medical pathology uncovered by a comprehensive male infertility evaluation. *Fertil Steril*. 1994;62(5):1028-34.

92. Palermo GD, Neri QV, Takeuchi T, Rosenwaks Z. ICSI: where we have been and where we are going. *Semin Reprod Med.* 2009;27(2):191-202.
93. Palermo GD, Neri QV, Schlegel PN, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in extreme cases of male infertility. *PLoS One.* 2014;9(12):e113671.
94. Avedaño C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril.* 2010;94(2):549-57.
95. Maettner R, Sterzik K, Isachenko V, Strehler E, Rahimi G, Alabart JL, Sánchez R, Mallmann P, Isachenko L. Quality of human spermatozoa: Relationship between high-magnification sperm morphology and DNA integrity. *Andrologia.* 2014;46(5):547-55.
96. Paasch U, Grunenwald S, Glander H. Sperm selection in assisted reproductive techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;65:515-25.
97. Jayaraman V, Upadhy D, Narayan PK, Adiga SK. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(6):557-63.
98. Rappa KL, Rodriguez HF, Hakkarainen GC, Anchan RM, Mutter GL, Asghar W. Sperm processing for advanced reproductive technologies: where are we today? *Biotechnol Adv.* 2016;34(5):578-87.
99. Aitken RJ, Finnie JM, Muscio L, Whiting S, Connaughton HS, Kuczera L, Rothkirch TB, De Iuliis GN. Potential importance of transition metals in the induction of DNA damage by sperm preparation media. *Hum Reprod.* 2014;29(10):2136-47.
100. Muratori M, Tarozzi N, Cambi M, Boni L, Iorio AL, Passaro C, et al. Variation of DNA fragmentation levels during density gradient sperm selection for assisted reproduction techniques: a possible new male predictive parameter of pregnancy? *Medicine.* 2016;95(20):e3624.

101. Shirota K, Yotsumoto F, Itoh H, Obama H, Hidaka N, Nakagima K, Miyamoto S. Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. *Fertil Steril*. 2016;105(2):315-21.
102. Fujii Y, Motoyama H, Hiraguchi K; Kobashi C, Kunitomi K. A simple method for recovering the motile spermatozoa from extremely low quality sperm samples. *Hum Reprod*. 1997;12(6):1218-21.
103. Hinting A, Lunardhi H. Better sperm selection for intracytoplasmic sperm injection with the side migration technique. *Andrologia*. 2001;33(6):343-6.
104. Wooley D. Motility of spermatozoa at surfaces. *Reproduction*. 2003;126(2):259-70.
105. Denissenko P, Kantsler V, Smith DJ, Kirkman-Brown J. Human spermatozoa migration in microchannels reveals boundary-following navigation. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(21):8007-10.
106. Seo D, Agca Y, Feng Z, Critser J. Development of sorting, aligning, and orienting motile sperm using microfluidic device operated by hydrostatic pressure. *Microfluid Nanofluidics*. 2007;3:561-70.
107. Knowton SM, Sadasivam M, Tasoglu S. Microfluidics for sperm research. *Trends Biotechnol*. 2015;33(4):221-9.
108. Tung CK, Ardon F, Fiore AG, Soares SS, Wu M. Cooperative roles of biological flow and surface topography in guiding sperm migration revealed by a microfluidic model. *Lab Chip*. 2014;14(7):1348-56.
109. El-Sherry TM, Elsayed M, Abdelhafez HK, Abdelgawad M. Characterization of rheotaxis of bull sperm using microfluidics. *Integr Biol (Camb)*. 2014;6(12):1111-21.
110. Nosrati R, Graham PJ, Liu Q, Sinton D. Predominance of sperm motion in corners. *Sci Rep*. 2016;6:26669.

111. Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, Kazerooni M, Ghanadi A, Ghaffarpasand F, Kazerooni Y, Zolghadr J. Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26(11-12):591-6.
112. Zidi-Jrah I, Hajlaoui A, Mougou-Zerelli S, Kammoun M, Meniaoui I, Sallem A, et al. Relationship between sperm aneuploidy, sperm DNA integrity, chromatin packaging, traditional semen parameters, and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2016;105(1):58-64.