

Perdido no mar negro da memória  
Vejo o rumo a seguir.  
Traço minha alma em lembrança  
Deste abraço que me quer fugir.

Oh Sé! Levo a saudade  
Que contigo aprendi a chorar.  
Feitiço desta cidade!  
Vou preso ao me libertar.

Sonho em ficar!  
Sonhar é partir!

Sinto-me em vozes do outrora.  
Escondo o pranto. Vou sorrir!  
Cantam as cordas a minha hora  
No silêncio que me vê partir.

Choro a certeza do Passado:  
Poema eterno de um instante;  
Sonhos, versos, vida... Os receios  
De um Fado tão distante.

Oh Sé! Levo a saudade  
Que contigo aprendi a chorar.  
Feitiço desta cidade!  
Vou preso ao me libertar.

Sonho em ficar!  
Sonhar é partir!

Sinto-me em vozes do outrora.  
Escondo o pranto. Vou sorrir!  
Cantam as cordas a minha hora  
No silêncio que me vê partir.

Balada da Despedida 2012

04 de Maio de 2012

Coimbra

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Professor Doutor João Ramalho Santos pela orientação na realização deste trabalho. Obrigada pela confiança depositada e por ter acreditado que valia a pena, nestes que foram os meus primeiros passos na ciência. Obrigada pela exigência, mas também pela forma como percebeu as minhas dificuldades ao longo deste percurso. Obrigada pelos elogios, pelas críticas, mas acima de tudo pela sinceridade.

À Renata por todo o apoio que deu na minha formação, sempre de uma maneira rigorosa e crítica. Obrigada pela paciência e por todos os ensinamentos. Pela compreensão e pela amizade. Obrigada pelo apoio e motivação constantes, sem ti teria sido mais difícil. É sincera a admiração que tenho.

À Professora Doutora Teresa Almeida Santos, directora do Serviço de Reprodução Humana dos Hospitais da Universidade de Coimbra por me abrir as portas do serviço, permitindo a realização deste trabalho. Obrigada também à Doutora Ana Isabel Barbosa pela simpatia e por estar sempre pronta a ajudar.

À Ana Paula por toda a ajuda que deu ao meu trabalho. A tua presença no Serviço foi fundamental. Obrigada pelas amostras mas também pela preocupação e por todos os conselhos e dicas.

A todas as colegas do grupo de Biologia da Reprodução e Células Estaminais. Às mais novas, Andreia, Maria Inês, Sónia, Sofia e Bárbara, pela partilha de novas experiências, dos medos e pelo entusiasmo de pequenas descobertas. Às mais velhas, Ana Sofia, Carla, Renata, Sandra, Paula e Marta pelo incentivo e pelo apoio científico. Obrigada a todas pelos bons momentos passados no laboratório e por tantas “mixórdias de temáticas” que tão bem nos exercitaram o corpo e a mente.

A todos os colegas da licenciatura e do mestrado em Biologia pelas muitas experiências partilhadas ao longo destes anos. Um obrigado especial à Rita por toda a amizade e por ter estado sempre ao meu lado. És grande! Obrigada também à Vera e à Lucinda, tornaram-se boas amigas.

Aos meus pais por todo o amor e carinho. Pelo apoio incondicional e por terem acreditado sempre em mim, mesmo quando eu própria não acreditava. Obrigada por me mostrarem que por muitas dificuldades que tenhamos na vida devemos sempre lutar pelos nossos sonhos. Tudo o que sou hoje devo-o a vocês, muito obrigada!

Aos meus avós pela forma carinhosa com que sempre me trataram. Pela constante preocupação e por todos aqueles miminhos que só os avós sabem dar. Também a vocês um especial pedido de desculpa por todas as ausências.

À minha irmã, porque vai sempre a minha melhor amiga. Obrigada pela paciência e pelo apoio constante. Obrigada por tantos bons momentos e até pelas brincadeiras “tolas” de irmãs. É com grande admiração que vejo a forma como encaras a vida, e é com enorme orgulho que olho para a pessoa em que te estás a tornar.

À minha casa, a grandiosa *Morsarum Thesaurus*, e a todas (os) as (os) Morsas que por cá passaram. Os momentos vividos dentro destas quatro paredes deixam, para mim, bem claro qual a essência deste “tesouro”.

A todos os meus amigos por terem, cada um à sua maneira, contribuído para o meu crescimento pessoal, sempre rodeada de boa disposição. Um especial obrigado ao Alex, à Avelã, à Adelaide, à Mini, à Anita, à Dani, ao Curto, ao Dinis e à Nádía por todo o carinho e amizade. Cada um de vocês marca a minha vida de uma forma tão única e especial e é difícil agradecer por me deixarem sempre o coração tão cheio. Convosco é tão fácil partilhar sorrisos. Obrigada!

À grande instituição que é a Universidade de Coimbra e à maravilhosa cidade que me acolheu durante os últimos anos. Coimbra! Uma cidade que tanto tem para contar. Histórias, aventuras, sonhos e vontades. Sem dúvida, uma cidade que deixa vontade de voltar!

# Índice

Resumo .....	VI
Abstract .....	VIII
Lista de abreviaturas .....	X
<b>Capítulo 1- Introdução .....</b>	<b>1</b>
1. Introdução .....	2
1.1 O gâmeta masculino: uma célula especializada .....	2
1.1.1 A espermatogénese .....	2
1.1.2 Estrutura e função .....	4
1.2 Infertilidade masculina e qualidade seminal .....	6
1.3 Integridade do ADN .....	7
1.3.1 Causas dos danos na cromatina .....	8
1.3.2 Detecção da integridade da cromatina .....	10
1.3.2.1 O método do <i>Diff-Quik</i> .....	10
1.4 Relevância preditiva da integridade da cromatina .....	12
1.5 Objectivos .....	13
<b>Capítulo 2 – Materiais e Métodos .....</b>	<b>14</b>
2. Materiais e Métodos .....	15
2.1 Material biológico .....	15
2.2 Processamento das amostras .....	15
2.3 Técnica de coloração – <i>Diff-Quik</i> .....	16
2.4 Parâmetros avaliados .....	16
2.5 Análise estatística .....	17
<b>Capítulo 3 – Resultados .....</b>	<b>18</b>
3. Resultados .....	19
3.1 Comparação entre espermatozóides migrados e amostra nativa .....	19
3.1.1 Relação com a fertilidade .....	20
3.1.2 Comparação entre TRA .....	22
3.2 Estudo do varicocele .....	24
3.3 Efeito de antioxidantes .....	25
3.4 Efeito da idade .....	25

<b>Capítulo 4 – Discussão</b> .....	<b>28</b>
4. Discussão .....	29
4.1 Comparação entre espermatozóides migrados e amostra nativa .....	29
4.1.1 Relação com a fertilidade .....	30
4.2 Estudo do varicocele .....	32
4.3 Efeito de antioxidantes .....	33
4.4 Efeito da idade .....	34
<b>Capítulo 5 – Conclusões</b> .....	<b>35</b>
5. Conclusões .....	36
<b>Capítulo 6 – Bibliografia</b> .....	<b>37</b>
6. Bibliografia .....	38

## Resumo

O estado da cromatina e os danos no ADN de espermatozóides podem ser detectados usando ensaios bem estabelecidos baseados em análises de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, por exemplo. Contudo, estes são morosos, envolvem protocolos elaborados e equipamentos sofisticados. O método de coloração *Diff-Quik*, já implementado para avaliação da morfologia espermática, demonstrou poder ser utilizado como um indicador do estado da cromatina em espermatozóides humanos de forma fácil, rápida e reprodutível em qualquer laboratório de andrologia.

Assim, neste trabalho foi avaliado o estado da cromatina de espermatozóides humanos exclusivamente pelo método do *Diff-Quik*. A integridade da cromatina foi avaliada antes e depois da realização de uma técnica de migração de espermatozóides (*swim-up*), e o estado da cromatina desses espermatozóides migrados foi correlacionado com os resultados obtidos em diversos parâmetros clínicos relativos a técnicas de reprodução assistida (TRA). Os efeitos do varicocele (um síndrome anatómico de varizes escrotais), a tomada de um antioxidante na dieta, e a idade do dador no estado da cromatina de espermatozóides foram também estudados.

Os resultados obtidos mostraram o benefício da realização das técnicas de preparação de espermatozóides, onde se enquadra o *swim-up*, na selecção dos que apresentam uma melhor integridade da cromatina. Além disso, a análise dos resultados obtidos com TRA, também mostrou que a presença de danos na cromatina afecta a qualidade do embrião e a existência de uma gravidez clínica, assim como está associada a uma menor taxa de fertilização. Quando analisadas separadamente a fertilização *in vitro* (FIV) e a injeção intracitoplasmática de um espermatozóide (ICSI) verificou-se que a presença de danos na cromatina afectava a qualidade embrionária e a existência de uma gravidez clínica no caso das FIV, mas somente a qualidade do embrião nas ICSI. Tendo como base as observações do estado da cromatina dos espermatozóides e considerando os vários parâmetros clínicos estudados, a FIV mostrou possuir algumas vantagens em relação à ICSI, resultando num maior número (percentual) de gravidezes. Relativamente ao estudo do varicocele, e apesar dos espermatozóides destes indivíduos possuírem mais danos na cromatina que os de indivíduos sem varicocele, não foi verificado qualquer efeito na integridade da cromatina após a embolização, um

procedimento utilizado para tratar este síndrome. Da mesma forma, o estudo do tratamento oral com antioxidantes, não resultou em efeitos positivos na integridade da cromatina dos espermatozóides após o tratamento. Tal sugere que a menor integridade da cromatina observada, neste caso, não será devido a stresse oxidativo ou que o número de amostras analisadas terá sido escasso. Foi também verificado que os indivíduos subférteis apresentam um aumento dos danos na cromatina a partir dos 35 anos, aparentando serem mais susceptíveis a alterações no ADN de espermatozóides a partir dessa idade.

O método do *Diff-Quik* fornece assim informações úteis em vários aspectos clínicos, demonstrando ser uma mais valia na monitorização da integridade da cromatina em qualquer clínica de reprodução assistida.

**Palavras-chave:** infertilidade masculina, integridade da cromatina, método *Diff-Quik*.

## **Abstract**

Sperm chromatin status and nuclear DNA damage can be detected using well-established assays. Nevertheless, most techniques are time-consuming and involve elaborate protocols and equipment such as fluorescence microscopes and flow cytometers. The Diff-Quik staining, already implemented to assess sperm morphology worldwide, can also be easily, quickly and routinely used as an indicator of the chromatin status in human sperm.

Thus, in this study, we only evaluated the status of the human sperm chromatin by the Diff-Quik method. The integrity of the chromatin was assessed before and after the completion of the sperm migration technique (swim-up), and the chromatin status of the migrated sperm was then correlated with the results obtained with assisted reproduction techniques (ART) parameters and indicators. The effects on sperm chromatin status of varicocele (an anatomic syndrome of scrotal varicose veins) of oral antioxidant therapy and of ageing were also analyzed.

The results show the benefit of sperm preparation techniques, and specifically of the swim-up method, in the selection of sperm with higher chromatin integrity. Furthermore, the analysis of the results obtained with ART also showed that higher chromatin damage was associated with lower fertilization rates, embryo quality and clinical pregnancy. When we separately analyzed the outcomes of in vitro fertilization (IVF) we found that increased chromatin damage negatively affected embryo quality and the existence of a clinical pregnancy. However, in the case of intracytoplasmic sperm injection (ICSI), only embryo quality was reduced with high chromatin damage. Based on these observations, IVF showed some advantages compared to ICSI, resulting in a greater number of pregnancies. In the varicocele study we found that men with this pathology have more chromatin damage than healthy individuals. However, we failed to find any difference in the chromatin integrity before and after embolization, a procedure used to treat varicocele. Similarly, the oral antioxidant therapy did not show any effect on the sperm chromatin status after treatment. This suggests that either we used a very limited number of samples or sperm chromatin status was not, in this case, related with oxidative stress. It was also found that subfertile men with more than 35 years old have



higher percentage of sperm with abnormal chromatin status suggesting that they may be more susceptible to changes in sperm DNA.

The Diff-Quik method provides useful information on various clinical aspects and may be extremely useful in monitoring sperm chromatin integrity at any assisted reproduction clinic.

**Keywords:** male infertility, chromatin integrity, Diff-Quik.

## **Lista de abreviaturas**

**%** - Percentagem

**ADN** - Ácido desoxirribonucleico

**ATP** - Adenosina trifosfato

**FIV** - Fertilização *in vitro*

**FSH** - Hormona Folículo Estimulante

**HUC** - Hospitais da Universidade de Coimbra

**ICSI** - Injecção intracitoplasmática de um espermatozóide

**LH** - Hormona Luteinizante

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**ROS** - Espécies reactivas de oxigénio

**SPZ** - Espermatozóides

**TRA** - Técnicas de Reprodução Assistida

## **Capítulo 1 - Introdução**

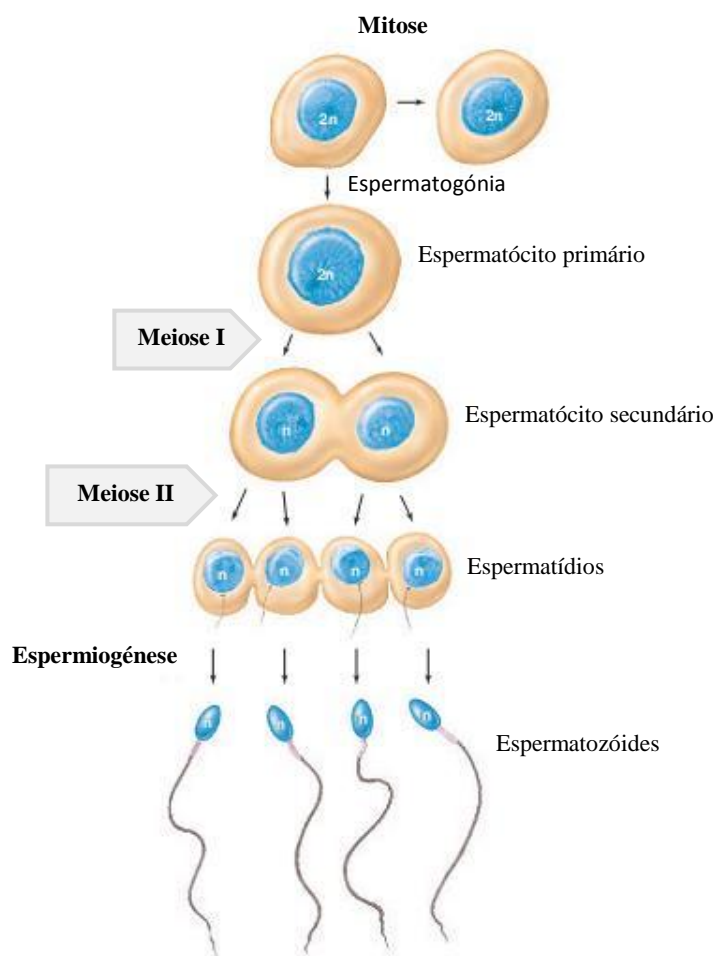
## **1. Introdução**

### **1.1 O gâmeta masculino – uma célula especializada**

O espermatozóide é uma célula aparentemente simples e totalmente diferenciada. Embora pareça ter um conjunto limitado de características funcionais, ou seja, a entrega de um genoma haplóide a um ovócito (fertilização), essas funções abordam muitos pontos importantes na fisiologia e na biologia celular e molecular, com diversas implicações como a produção animal, (in)fertilidade e toxicologia [Ramalho-Santos *et al.*, 2007].

#### **1.1.1 A espermatogénese**

A espermatogénese é um processo de desenvolvimento complexo, que ocorre na maioria dos mamíferos do sexo masculino ao longo da sua vida [Yap *et al.*, 2011], e que culmina com a produção de espermatozoides maduros [Jan *et al.*, 2012]. Este processo ocorre nos túbulos seminíferos, as unidades funcionais dos testículos [Cheng *et al.*, 2011], onde se encontram as células germinais e as células de Sertoli. As células de Sertoli são células somáticas essenciais para a criação de um microambiente que permite a geração sustentada de espermatozoides. As células germinais espermatogoniais, as espermatogónias, são células individuais localizadas na membrana basal dos túbulos seminíferos [Jan *et al.*, 2012]. O sucesso na autorrenovação das espermatogónias sustenta o processo da espermatogénese, que envolve três fases distintas (Figura 1). A primeira fase envolve a proliferação mitótica das espermatogónias ( $2n$ ) e a diferenciação de parte delas em espermatócitos primários ( $2n$ ), que seguem para a meiose, a segunda fase, para formar espermatídios haploides ( $n$ ). Na terceira e última fase, a espermiogénese, os espermatídios redondos alongam, terminando com a libertação de espermatozoides para o lúmen dos túbulos seminíferos. Como um subproduto da espermiogénese, os corpos residuais contendo excesso de citoplasma, são fagocitados pelas células de Sertoli. Os espermatozoides são então encaminhados para o epidídimo onde são armazenados [Yap *et al.*, 2011].



**Figura 1** – Representação esquemática da espermatogênese. Adaptado de Fox, 2003

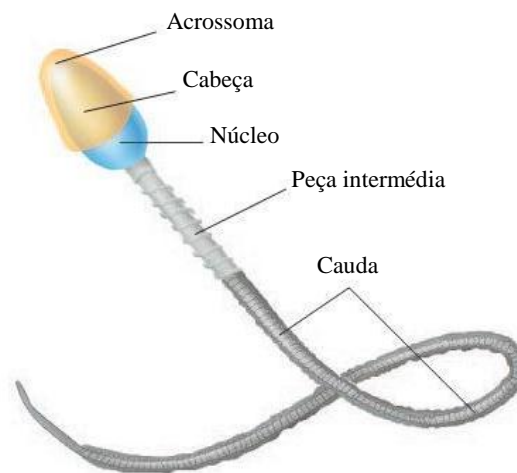
Entre os túbulos seminíferos existe tecido intersticial que contém vasos sanguíneos e linfáticos, macrófagos e células de Leydig, que produzem fatores de crescimento e testosterona. A rodear os túbulos, encontram-se células peritubulares mielóides, que fornecem apoio estrutural, fatores de crescimento e facilitam a circulação do fluido com espermatozoides através do lúmen dos túbulos [Jan *et al.*, 2012].

A espermatogênese exige um sistema preciso e bem coordenado que regule constantemente mudanças nos padrões de genes e proteínas [Huang e Sha, 2011]. Por norma, cada homem produz mais que 100 milhões de espermatozoides por dia, desde a

puberdade, até ao fim da sua vida, sob a influência da hormona folículo estimulante (FSH) e da hormona luteinizante (LH), libertadas pela glândula pituitária também conhecida por hipófise. A FSH exerce os seus efeitos nas células de Sertoli mantendo a espermatogénese, enquanto que a LH actua nas células de Leydig induzindo a esteroidogénese para a produção de testosterona e estrogénio que regulam a espermatogénese [Cheng *et al.*, 2011].

### 1.1.2 Estrutura e função

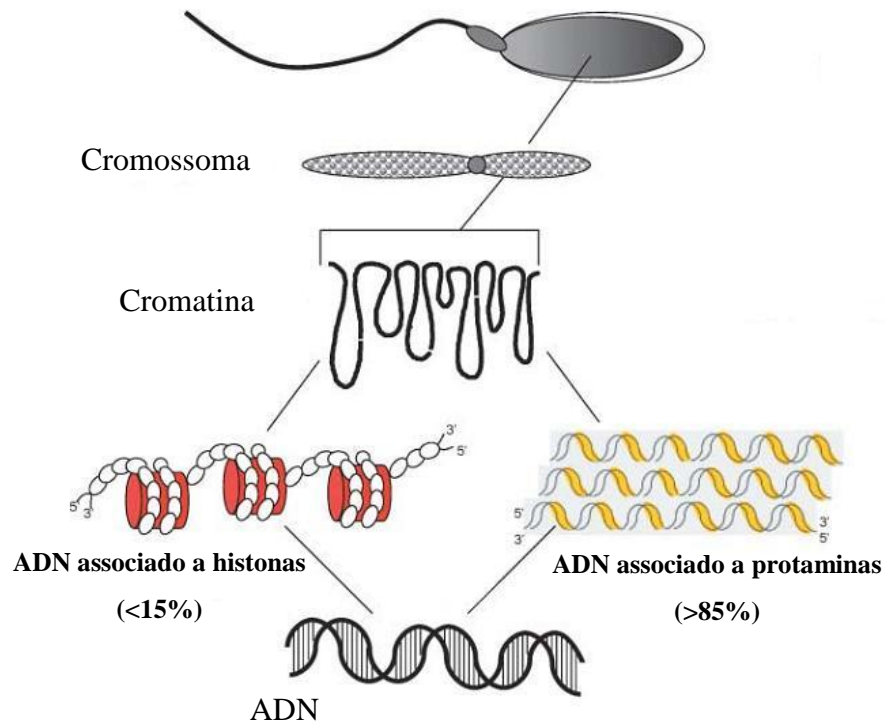
O espermatozóide é composto por três regiões principais: a cabeça, a peça intermédia e a cauda ou flagelo (Figura 2).



**Figura 2** – Representação esquemática de um espermatozóide humano. Adaptado de Fox, 2003.

A cabeça é constituída por um núcleo haplóide onde as proteínas associadas ao ácido desoxirribonucleico (ADN), as histonas, foram parcialmente substituídas por protaminas durante a espermiogénese (Figura 3). A presença de protaminas provoca uma hipercondensação da cromatina, que concomitantemente com a perda da maioria dos organelos celulares e citoplasma leva a uma redução significativa do volume da

célula, aumentando as suas propriedades aerodinâmicas e permitindo a mobilidade espermática e a penetração no ovócito [Fox, 2003; Ramalho-Santos *et al.*, 2007].



**Figura 3** – Representação esquemática dos diferentes níveis de organização genómica num espermatozóide humano. Adaptado de Seli and Sakkas, 2005.

Na região anterior da cabeça o espermatozóide possui uma vesícula secretora designada acrossoma. Esta vesícula contém enzimas hidrolíticas que são libertadas num processo de exocitose designado “reacção acrossómica”, e que permitem a digestão da zona pelúcida e a penetração do espermatozóide no ovócito [Ramalho-Santos *et al.*, 2007]. A cauda ou flagelo é a estrutura que proporciona mobilidade à célula, e baseia-se num axonema central com um arranjo microtubular tradicional de 9 pares de microtúbulos periféricos e 2 microtúbulos centrais. A peça intermédia, para além de estabelecer a ligação entre a cabeça e a cauda, é a região da célula onde se encontram as

mitocôndrias, em número variável, dispostas em hélice na parte anterior do flagelo [Jonge e Barratt, 2006; Ramalho-Santos *et al.*, 2007].

## 1.2 Infertilidade masculina e qualidade seminal

A infertilidade é definida como a incapacidade de concepção após, pelo menos, um ano de relações sexuais desprotegidas e afecta aproximadamente 10 a 15% dos casais. Estima-se que o factor masculino é parcialmente responsável pelos problemas de fertilidade em cerca de metade dos casos [Massart *et al.*, 2012]. Qualquer processo que afecte a produção e a qualidade dos espermatozóides é potencialmente prejudicial para a fertilidade no homem. As principais causas para a infertilidade masculina incluem o varicocelo, obstrução do trato genital, insuficiência testicular, criptorquidismo, exposição a gonadotoxinas, condições genéticas, infecções, disfunção hormonal, condições imunológicas, disfunção sexual/ejaculatória, cancro e doenças sistémicas [Esteves *et al.*, 2011]. No entanto, a infertilidade masculina tem mostrado ser uma patologia complexa ainda não muito bem compreendida, sendo em muitos casos dado o diagnóstico de infertilidade sem uma explicação da causa [Rajender *et al.*, 2011], sendo assim designada de infertilidade idiopática. Quando não é possível tratar o problema de forma cirúrgica ou por tratamento médico, recorre-se a técnicas de reprodução assistida (TRA). Dentro destas técnicas, as que têm sido mais utilizadas são a fertilização *in vitro* (FIV), e a injeção intracitoplasmática de um espermatozóide (ICSI). Os recentes avanços nestas técnicas têm permitido identificar e superar causas de infertilidade anteriormente não tratáveis [Esteves *et al.*, 2011].

A qualidade seminal é um padrão importante para avaliar a infertilidade masculina [Li e Zhou, 2012], sendo normalmente efectuada uma análise seminal de rotina, designada de espermograma. Esta análise avalia os parâmetros seminais clássicos - concentração, mobilidade e morfologia - de acordo com os valores de referência estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Para se definir uma amostra como normal (normozoospermica), têm de se verificar valores dentro dos limites definidos pela OMS em três parâmetros principais: concentração ( $\geq 15$  milhões de espermatozóides/ml de ejaculado); mobilidade ( $\geq 32\%$  de mobilidade progressiva ou  $\geq 40\%$  de mobilidade progressiva e mobilidade *in situ*); e morfologia ( $\geq 4\%$  de formas



normais). Sempre que um dos parâmetros se encontre abaixo dos valores de referência, a amostra não é considerada normal (não normozoospermica). Desta forma, a infertilidade masculina pode ser classificada em oligozoospermia (baixa concentração), astenozoospermia (baixa mobilidade) e teratozoospermia (baixa percentagem de formas normais). Também pode acontecer a conjugação entre dois dos parâmetros, ou em casos mais graves, a conjugação de três parâmetros (oligoastenoteratozoospermia) [WHO, 2010].

A fragmentação do ADN tem sido apontada como um marcador importante da infertilidade masculina visto que os homens inférteis parecem apresentar níveis de danos nos espermatozóides significativamente mais elevados, comparativamente com doadores férteis [Sousa e Tavares *et al.*, 2009]. No entanto este parâmetro não é habitualmente medido.

### **1.3 Integridade do ADN**

O ejaculado humano é muito heterogéneo, podendo ser identificadas numa mesma amostra subpopulações de espermatozóides com características bioquímicas e fisiológicas distintas. Actualmente acredita-se que apenas uma percentagem muito pequena de espermatozóides é capaz de fertilizar um ovócito [Sousa *et al.*, 2011], e tem sido sugerido que a integridade do ADN dos espermatozóides está biologicamente correlacionado com a fertilidade [Natali e Turek, 2011]. Recentemente, a integridade do ADN dos espermatozóides tem sido considerada como uma ferramenta complementar de diagnóstico e como marcador biológico da saúde reprodutiva masculina e infertilidade [Chi *et al.*, 2011].

O espermatozóide contribui com a informação genética paterna para a formação do embrião diplóide aquando da fertilização, estando a realização deste processo e o subsequente desenvolvimento embrionário, em parte, dependente da integridade do ADN do gâmeta masculino [O'Brien e Zini, 2005]. Como referido anteriormente, a cromatina do espermatozóide difere radicalmente da dos outros tipos de células, pois a maioria do genoma está empacotado por proteínas específicas dos espermatozóides (protaminas), resultando num genoma altamente compacto. Esta característica é essencial para a fertilidade, integridade do genoma e desenvolvimento embrionário

precoce [Vavouri e Lehner, 2011]. No entanto, os espermatozóides são células mais vulneráveis a danos no ADN, pois não têm capacidade de reparação, visto que se acredita que estas células são inactivas ao nível da transcrição e/ou tradução [Ramalho-Santos *et al.*, 2007; Chi *et al.*, 2011]. Desta forma, apesar do estado de compactação da cromatina parecer conferir uma protecção contra eventuais danos, os espermatozóides podem apresentar anomalias, pondo em causa a correcta transmissão genética paterna.

A fragmentação do ADN é caracterizada por quebras nas suas cadeias simples e duplas e é particularmente frequente em espermatozóides de homens subférteis. No entanto, também é verdade que os ovócitos e os embriões precoces podem reparar danos no ADN de espermatozóides, por isso, o efeito biológico dos danos no ADN de espermatozóides está dependente tanto da extensão e gravidade de danos na cromatina como na capacidade de reparação por parte dos embriões [Natali e Turek, 2011].

### **1.3.1 Causas dos danos na cromatina**

Nos espermatozóides os danos na cromatina podem encontrar-se ao nível do ADN (fragmentação) ou ao nível da compactação da cromatina, e apesar de não serem conhecidos todos os mecanismos, são várias as circunstâncias que podem levar a este tipo de danos. Os principais mecanismos que se pensa estarem na origem de danos na cromatina de espermatozóides são a apoptose abortiva antes da ejaculação, a produção excessiva de espécies reactivas de oxigénio (ROS) no ejaculado, e anomalias no empacotamento do ADN [Tavalaee *et al.*, 2009].

A apoptose ou morte celular programada, resulta, durante a espermatogénese, na destruição de até cerca de 75% de potenciais espermatozóides. Este processo controla o excesso de produção do gâmeta masculino pois restringe o normal nível de proliferação das células germinais espermatogoniais, e selectivamente destrói formas anormais de espermatozóides. Tem sido proposto que os danos no ADN de espermatozóides podem ser o resultado de uma apoptose abortiva. A apoptose abortiva é um fenómeno no qual os espermatozóides com danos no ADN, já depois de terem iniciado a apoptose, aparecem no ejaculado [O'Brien e Zini, 2005; Zini e Sigman, 2009].

O stress oxidativo é uma consequência dos radicais livres gerados a partir do metabolismo celular. Apesar de existirem antioxidantes naturais nos testículos e no sémen, os danos celulares podem acontecer quando os mecanismos homeostáticos são perturbados levando à produção excessiva de ROS, tanto por espermatozóides defeituosos como por células do sistema imunitário, e que pode ser detectado no plasma seminal. Pensa-se que o excesso de ROS provoca danos na membrana dos espermatozóides, reduz a sua mobilidade e induz danos ao nível do ADN. O tratamento com antioxidantes parece melhorar o balanço de ROS, no entanto ainda não se sabe muito sobre o efeito prático da toma destes compostos, nomeadamente em relação ao aumento da taxa de gravidez natural [Natali e Turek, 2011].

Defeitos no empacotamento do ADN, nomeadamente na troca de histonas por protaminas durante a espermiogénese, podem provocar um aumento de danos no ADN [Barroso *et al.*, 2000]. Além disso, a deficiência em protaminas (absoluta ou relativa) também pode resultar em defeitos na compactação da cromatina, aumentando a susceptibilidade do ADN a danos [Zini e Sigman, 2009].

Estes são os factores intrínsecos, no entanto a etiologia dos danos no ADN de espermatozóides é multifactorial, e existe uma serie de factores extrínsecos como drogas (quimioterapia), tabagismo, inflamações no tracto genital e varicocelo que causam danos no ADN [Zini e Sigman, 2009].

O varicocelo é descrito pela Sociedade Portuguesa de Andrologia como um síndrome anatómico de varizes escrotais, que atinge cerca de 10 a 20 % da população masculina e que se desenvolve após a puberdade. A principal característica é a dilatação das veias que drenam o sangue da região dos testículos, provocando a acumulação de substâncias nocivas e o aumento da temperatura local, levando a uma diminuição na produção dos espermatozóides e podendo, em alguns casos, comprometer a fertilidade. De facto, o varicocelo é uma condição comum encontrada em muitos homens que se apresentam em clinicas de infertilidade para avaliação da sua qualidade seminal [Baazeem *et al.*, 2011]. No entanto, apesar de ser clinicamente evidente, nem todos os homens com varicocelo são inférteis, e mesmo que a análise seminal seja normal e haja documentação de fertilidade anterior existe o risco de perda subsequente da função testicular e da fertilidade [Smith *et al.*, 2006]. Um dos tratamentos possíveis constitui

um procedimento não cirúrgico, a embolização, que consiste na obstrução de veia espermática através da colocação de um pequeno êmbolo.

### **1.3.2 Detecção da integridade da cromatina**

Os danos no ADN de espermatozóides podem ser detectados por vários ensaios, baseados em métodos de fluorescência ou colorimétricos. Diversos testes têm sido desenvolvidos para avaliar a integridade do ADN, sendo no entanto, diferentes naquilo que cada um mede. Em geral, os ensaios servem para determinar o estado da cromatina, para medir a fragmentação do ADN e para avaliar a matriz nuclear [Natali e Turek, 2011].

Os ensaios mais utilizados são o SCSA (*sperm chromatin structure assay*; Evenson *et al.*, 1980), o teste de laranja de acridina (Tejada *et al.*, 1984), o COMET (*single cell gel electrophoresis assay*; Aravindan *et al.*, 1997), o ISNT (*in situ nick translation assay*; Gorczyca *et al.*, 1993) e o TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labelling*; Sailer *et al.*, 1995) [Sousa e Tavares *et al.*, 2009].

No entanto, a maioria destas técnicas, para além de serem demoradas envolvem a realização de protocolos elaborados e a utilização de equipamentos (como o microscópio de fluorescência ou o citómetro de fluxo) que não existem na maioria dos laboratórios de andrologia. Desta forma, e apesar de diversos estudos demonstrarem a importância da avaliação da integridade da cromatina dos espermatozóides, este parâmetro não é avaliado de forma rotineira [Sousa e Tavares *et al.*, 2009].

#### **1.3.2.1 O método do *Diff-Quik***

O método do *Diff-Quik* é um ensaio colorimétrico simples, rápido e pouco dispendioso, que foi inicialmente desenvolvido para monitorizar o estado do ADN de espermatozóides de animais selvagens em condições de campo [Mota e Ramalho-Santos, 2006]. Este método é baseado na intensidade de cor ao nível do núcleo dos

espermatozóides (Figura 4), sendo considerados normais aqueles que apresentam uma coloração clara e como contendo uma menor integridade da cromatina aqueles que apresentam uma coloração mais escura.



**Figura 4** – Observação de espermatozóides humanos ao microscópio óptico de campo claro com uma objectiva de 100x em óleo de imersão e corados pelo método do *Diff-Quik*.

Este método não envolve a realização de técnicas complexas nem o uso de reagentes e equipamentos adicionais pois ele já é utilizado, com fins clínicos, na maioria dos laboratórios de andrologia, para avaliação da morfologia espermática [Sousa e Tavares *et al.*, 2009]. De facto foi demonstrado que o método do *Diff-Quik* pode, para além da avaliação da morfologia, monitorizar o estado da cromatina em espermatozóides humanos de forma fácil, rotineira e reprodutível [Sousa e Tavares *et al.*, 2009].

#### 1.4 Relevância preditiva da integridade da cromatina

Como já foi referido, a integridade da cromatina dos espermatozóides é extremamente importante para o processo de fecundação. Para além disso, diversos estudos mostram que existe uma correlação negativa entre a presença de danos no ADN de espermatozóides e os parâmetros seminais clássicos [Sun *et al.*, 1997; Gandini *et al.*, 2000; Irvine *et al.*, 2000; Varum *et al.*, 2007; Sousa e Tavares *et al.*, 2009; Chi *et al.*, 2011].

As questões relativas à integridade da cromatina de espermatozóides e os resultados clínicos nas TRA geram alguma controvérsia entre os grupos de investigação. No entanto, há estudos que demonstram a existência de uma correlação negativa entre os níveis de danos no ADN dos espermatozóides e a taxa de fertilização [Sun *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 1998; Esterhuizen *et al.*, 2000; Host *et al.*, 2000; Duran *et al.*, 2002; Benchaib *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Muriel *et al.*, 2006; Velez de la Calle *et al.*, 2008]. Uma correlação negativa é também encontrada entre os níveis de danos no ADN e a taxa de desenvolvimento embrionário [Sun *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 2002; Tesarik *et al.*, 2004; Sousa e Tavares *et al.*, 2009]. Outros autores demonstram ainda que os níveis elevados de danos no ADN dos espermatozóides afectam a qualidade do embrião [Zini *et al.*, 2005; Velez de la Calle *et al.*, 2008; Sousa e Tavares *et al.*, 2009], e a probabilidade de ocorrência de uma gravidez clínica [Tomlinson *et al.*, 2001; Benchaib *et al.*, 2003; Henkel *et al.*, 2003; Larson-Cook *et al.*, 2003; Sousa e Tavares *et al.*, 2009].

Durante a reprodução *in vivo*, o sistema de selecção natural garante que apenas o espermatozóide com material genético normal consegue fertilizar o ovócito [Tavalaee *et al.*, 2009]. O facto de haver uma maior ocorrência de danos no ADN em homens subférteis tem dado origem a preocupações relativamente ao uso de TRA nestes pacientes pois a capacidade de fertilização de um espermatozóide com danos no ADN e as consequências no desenvolvimento embrionário ainda não são totalmente conhecidas [Muratori *et al.*, 2003]. De facto, nas TRA os processos fisiológicos de selecção natural existentes no tracto reprodutor feminino e masculino são contornados [Smamsi *et al.*, 2008]. No caso da FIV, os espermatozóides são colocados em contacto com ovócitos não fertilizados *in vitro*, para facilitar a fertilização [Lopata *et al.*, 1978], existindo alguma aproximação da realidade. No entanto na ICSI, processo de micromanipulação

em que um espermatozóide é seleccionado e injectado dentro do ovócito [Palermo *et al.*, 1992], é completamente ignorado o processo de selecção natural havendo a possibilidade de serem utilizados espermatozóides anormais para fertilizar o ovócito [Tavalaee *et al.*, 2009]. Esta circunstância pode ser superada através de procedimentos de selecção de espermatozóides apropriados. Esses procedimentos de selecção são avaliados usando diferentes características dos espermatozóides, sendo que uma das mais importantes é a integridade da cromatina [Tavalaee *et al.*, 2009].

## **1.5 Objectivos**

Os casos diagnosticados de infertilidade masculina têm aumentado nos últimos tempos e como consequência o recurso a TRA também tem tido um aumento paralelo. O método de coloração do *Diff-Quik* já demonstrou conseguir dar informações relativamente ao estado de integridade da cromatina em espermatozóides humanos. Desta forma, este trabalho teve como principal objectivo utilizar o método do *Diff-Quik* para avaliar o estado da cromatina de espermatozóides, e relacionar os dados obtidos com diversos aspectos clínicos para que este possa, no futuro, ser implementado nos laboratórios de andrologia, de forma rotineira, para avaliação do estado da cromatina.

## **Capítulo 2 – Materiais e Métodos**



## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Material biológico**

Este trabalho foi realizado com amostras de sémen, cedidas pelo Serviço de Reprodução Humana dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC). As amostras foram obtidas por masturbação após 3 a 5 dias de abstinência sexual, de homens saudáveis, que recorreram ao Serviço para realização de análises de rotina (espermogramas) ou de técnicas de reprodução assistida (fertilização *in vitro*, FIV ou injeção intracitoplasmática de um espermatozóide, ICSI). Todos os indivíduos assinaram formulários de consentimento informado e todo o material biológico foi usado de acordo com os procedimentos aprovados pelos Hospitais da Universidade de Coimbra.

### **2.2 Processamento das amostras**

Todas as amostras foram tratadas, analisadas e categorizadas de acordo com as normas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS; WHO, 2010). As amostras de sémen frescas foram mantidas à temperatura ambiente durante cerca de 30 minutos para permitir a liquefacção, ou a 37°C nos casos de elevada viscosidade.

Para utilização nas técnicas de reprodução assistida (TRA), os espermatozóides foram separados do plasma seminal e outras células através de uma centrifugação de 10 minutos a 300xg em gradiente de densidade (Isolate® Sperm Separation Medium; Irvine Scientific, CA, EUA). As amostras foram posteriormente ressuspendidas em meio de preparação de espermatozóides (SPM; Medicult, Jyllinge, Denmark) e sujeitas a uma centrifugação durante 10 minutos a 300xg. Finalmente, o sobrenadante não foi totalmente retirado de modo a permitir a migração de espermatozóides durante 45 minutos a 37°C pelo método designado “*swim-up*”. Os espermatozóides que migram do sedimento para o sobrenadante serão então utilizados nas TRA.

As amostras de sémen para a análise do varicocelo, antioxidantes e idade foram utilizadas na sua forma nativa.

### **2.3 Técnica de coloração – *Diff-Quik*®**

O ensaio de coloração com o *Diff-Quik*® é baseado na intensidade de cor ao nível nuclear. Os espermatozóides que apresentam uma coloração clara ao nível do núcleo são considerados normais, enquanto que aqueles que apresentam uma coloração mais escura são considerados como contendo uma menor integridade da cromatina (Figura 5). É feito um esfregaço com 10 µl da amostra e seguidamente procede-se à coloração com o *kit* comercial *Diff-Quik*® (Dade Behring Inc., Newark, NJ, USA). Este *kit* é composto por 3 soluções: metanol (fixador), eosina (corante ácido/aniónico) que cora as proteínas com carga positiva/básicas de vermelho e tiazina (frequentemente o azul de metileno) que cora o ADN de azul. As lâminas são mergulhadas sequencialmente em cada uma destas soluções, durante cerca de 10 segundos, pela ordem anteriormente referida. Retira-se o excesso de corante numa rápida passagem por água corrente e montam-se as lâminas. As lâminas foram observadas num microscópio óptico de campo claro (Nikon 2000), com uma objectiva de 100x em óleo de imersão. Foram contados 200 espermatozóides por lâmina em diferentes campos e divididos em espermatozóides claros/normais ou escuros/anormais. As imagens foram obtidas com uma objectiva de 100x em óleo de imersão.

### **2.4 Parâmetros avaliados**

Foram avaliados vários parâmetros de fertilidade nas amostras utilizadas nas TRA. Calcularam-se as taxas de fertilização (número de ovócitos fecundados/número de ovócitos total  $\times$  100), de desenvolvimento embrionário (número de embriões/número de ovócitos total  $\times$  100), e de gravidez (número de gravidezes clínicas/número de transferências  $\times$  100). Foi também analisada a qualidade do embrião e a gravidez clínica. Os embriões são classificados de acordo com o número, forma, simetria e fragmentação dos blastómeros em quatro graus diferentes (I a IV), sendo o embrião de grau I o de melhor qualidade.

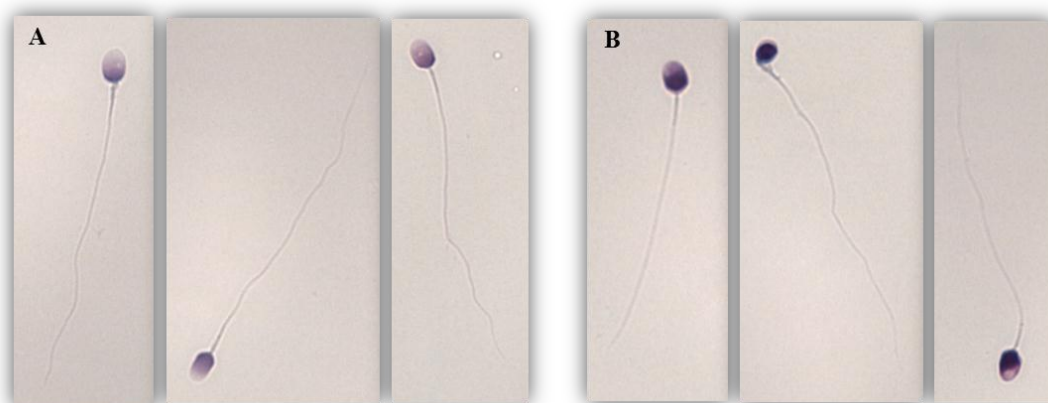
## 2.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi efectuada utilizando o programa SPSS para *Windows*, versão 20 (SPSS INC, USA). A normalidade das variáveis foi analisada através do teste *Kolmogorov-Smirnov*, ou do teste *Shapiro-Wilk* quando  $n \leq 25$ . Nos casos onde se verificou uma distribuição normal dos dados foi utilizado o teste T para amostras independentes ou o seu equivalente, teste *Mann-Whitney*, quando essa distribuição não era paramétrica. Para analisar a correlação entre as taxas de fertilização e de desenvolvimento embrionário e a coloração anormal/escura efectuou-se o teste paramétrico de *Pearson* (ou o equivalente não paramétrico, o teste de *Spearman*,). Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão (SEM) e as diferenças foram consideradas como estatisticamente significativas sempre que associadas a um valor de  $p < 0,05$ .

## **Capítulo 3 – Resultados**

### 3. Resultados

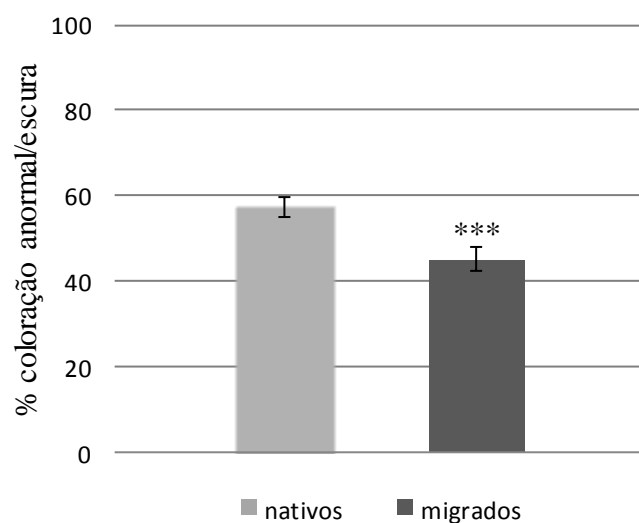
Como referido anteriormente, este trabalho baseia-se no uso de uma técnica de coloração, o *Diff-Quik*, que nos permite distinguir espermatozóides com uma coloração nuclear normal/clara de gâmetas masculinos com uma coloração anormal/escura (Figura 5).



**Figura 5** – Identificação de espermatozóides humanos com coloração nuclear normal/clara (A) e coloração anormal/escura (B) utilizando o método do *Diff-Quik*. Observação ao microscópio óptico de campo claro, com uma objectiva de 100x em óleo de imersão.

#### 3.1 Comparação entre espermatozóides migrados e amostra nativa

Para verificar se o método de migração de espermatozóides (*swim-up*) consegue seleccionar, para além dos espermatozóides com maior mobilidade, aqueles que apresentam uma melhor integridade da cromatina, foram comparadas as mesmas amostras de sémen, antes (nativos) e depois (migrados) de serem tratadas (n=92). Como indicado (Figura 6) verificaram-se diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,001$ ) entre os espermatozóides nativos ( $57,38 \pm 2,40$ ) e os migrados ( $45,03 \pm 2,75$ ), com os últimos a apresentar melhor qualidade ao nível da ADN.



**Figura 6** – Percentagem de espermatozoides com uma coloração anormal/escuro antes e depois da migração (*swim-up*). Os resultados apresentam o valor da média  $\pm$  erro padrão em percentagem de espermatozoides (n=92). \*\*\*p<0,001

### 3.1.1 Relação com a fertilidade

Para a realização das TRA são seleccionados os espermatozoides que migraram após o método do *swim-up*.

Como indicado na Tabela I foram calculadas as taxas de fertilização, de desenvolvimento embrionário e de gravidez para as TRA executadas (FIV+ICSI). Verificou-se uma taxa de fertilização de 62,34%, uma taxa de desenvolvimento embrionário de 49,17% e uma taxa de gravidez 32,84%.

**Tabela I** – Percentagens médias de vários parâmetros clínicos.

Parâmetro	Média (%)
Taxa de fertilização	62,34
Taxa de desenvolvimento embrionário	49,17
Taxa de gravidez	32,84

Seguidamente foi relacionar-se a qualidade do embrião e a gravidez clínica com a percentagem média de espermatozóides com coloração anormal/escuro. Como indicado (Tabela II) verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas ao nível da coloração escura entre os embriões de grau I e os embriões de outros graus ( $p=0,048$ ;  $n=75$ ) e entre a existência ou não de uma gravidez clínica ( $p=0,037$ ;  $n=67$ ) demonstrando que uma menor integridade da cromatina se encontra associada a uma pior qualidade embrionária e à ausência de gravidez.

**Tabela II** – Relação da qualidade do embrião e da gravidez clínica com a percentagem de espermatozóides com coloração anormal/escuro.

Parâmetro	Grupos	n	% SPZ com coloração escura (média ± erro-padrão)	p
<b>Qualidade do embrião</b>	Grau I	44	37,46 ± 3,62	0,048 *
	Outros graus	31	49,51 ± 4,93	
<b>Gravidez</b>	Positiva	22	36,35 ± 3,74	0,037 *
	Negativa	45	48,33 ± 4,20	

Os resultados apresentam o valor da média ± erro padrão em percentagem de espermatozóides (SPZ) com uma coloração anormal/escuro. \* $p<0,05$

Efectuaram-se também correlações entre parâmetros clínicos e a percentagem de espermatozóides com uma coloração anormal/escuro (Tabela III). Como se pode verificar existe uma correlação negativa estatisticamente significativa entre a taxa de fertilização e a percentagem de espermatozóides com coloração anormal/escuro ( $p=0,031$ ;  $n=84$ ). Contudo, o mesmo não se verifica entre a taxa de desenvolvimento embrionário e a proporção de espermatozóides com coloração nuclear escura ( $p>0,05$ ;  $n=84$ ).

**Tabela III** – Correlação entre parâmetros clínicos e percentagem de espermatozóides com coloração anormal/escuro.

Parâmetro	r	p
<b>Taxa de fertilização</b>	- 0,236	0,031 *
<b>Taxa de desenvolvimento embrionário</b>	- 0,041	0,704

Os resultados apresentam o valor do coeficiente de correlação (r). \* $p<0,05$

### 3.1.2 Comparação entre TRA

Pretendeu-se também analisar os resultados de fertilidade obtidos pelas técnicas FIV e ICSI individualmente. No caso da FIV a fertilização ocorre de uma forma natural enquanto que na ICSI a escolha do espermatozóide que vai fertilizar o ovócito é feita pelo embriologista. Isto levanta algumas questões relacionadas com a possibilidade de, no caso da ICSI, poder ser injectado um espermatozóide com danos ao nível da cromatina, facto que não deve acontecer quando a fertilização ocorre de forma natural (FIV).

Como indicado na Tabela IV foram calculadas as taxas de fertilização, de desenvolvimento embrionário e de gravidez para as TRA executadas, mas neste caso das FIV e das ICSI separadamente. Verificou-se uma melhor taxa de fertilização nas ICSI (64,34%) em relação as FIV (53,92%),e também uma melhor taxa de desenvolvimento embrionário nas ICSI (51,86%) relativamente às FIV (40,29%). No entanto, a taxa de gravidez foi bastante maior nas FIV (66,67%) do que nas ICSI (30,43%).

**Tabela IV** – Percentagens médias de vários parâmetros clínicos.

	<b>Parâmetro</b>	<b>Média (%)</b>
<b>FIV</b>	<b>Taxa de fertilização</b>	53,92
	<b>Taxa de desenvolvimento embrionário</b>	40,29
	<b>Taxa de gravidez</b>	66,67
	<b>Parâmetro</b>	<b>Média (%)</b>
<b>ICSI</b>	<b>Taxa de fertilização</b>	64,34
	<b>Taxa de desenvolvimento embrionário</b>	51,86
	<b>Taxa de gravidez</b>	30,43

Foi também relacionar-se a qualidade do embrião e a gravidez clínica com a percentagem média de espermatozoides com coloração anormal/escuro em amostras utilizadas para FIV e ICSI separadamente. Verificaram-se (Tabela V) diferenças estatisticamente significativas na qualidade do embrião tanto para a técnica de FIV



(p=0,025; n=14) como para a ICSI (p=0,043; n=70), e na gravidez (p=0,011; n=15) no caso da FIV.

**Tabela V** – Relação da qualidade do embrião e da gravidez clínica com a percentagem de espermatozóides com coloração anormal/escuro.

	Parâmetro	Grupos	n	% SPZ com coloração escura (média ± erro-padrão)	p
FIV	Qualidade do embrião	Grau I	10	37,73 ± 5,98	0,025 *
		Outros graus	4	67,18 ± 10,45	
	Gravidez	Positiva	10	39,33 ± 5,65	0,011 *
		Negativa	5	68,64 ± 8,23	
ICSI	Qualidade do embrião	Grau I	39	36,66 ± 3,97	0,043 *
		Outros graus	31	49,18 ± 4,62	
	Gravidez	Positiva	21	40,80 ± 4,92	0,860
		Negativa	48	43,23 ± 4,15	

Os resultados apresentam o valor da média ± erro padrão em percentagem de espermatozóides (SPZ) com uma coloração anormal/escuro. \*p<0,05

Relativamente às correlações entre taxas de fertilização e de desenvolvimento embrionário a percentagem de espermatozóides com uma coloração anormal/escuro (Tabela VI), não se verificou qualquer correlação estatisticamente significativa tanto nas amostras utilizadas para FIV como nas para ICSI (p>0,05).

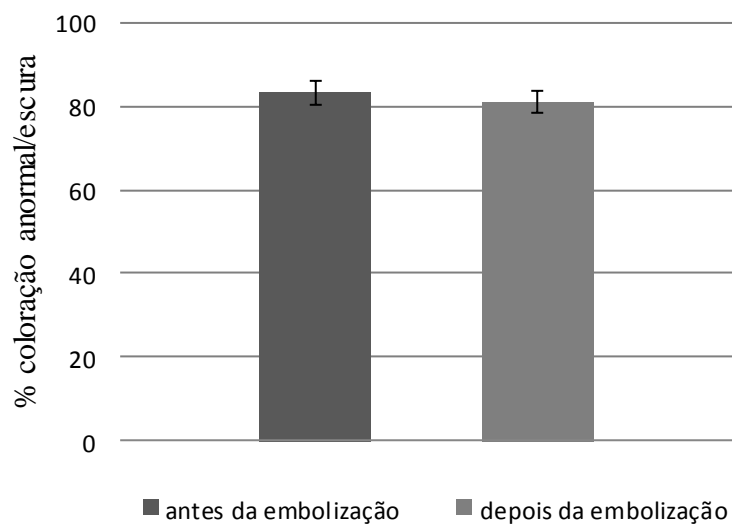
**Tabela VI** – Relação da qualidade do embrião e da gravidez clínica com a percentagem de espermatozóides com coloração anormal/escuro.

	Parâmetro	n	r	p
FIV	Taxa de fertilização	23	- 0,060	0,785
	Taxa de desenvolvimento embrionário	23	- 0,114	0,605
ICSI	Taxa de fertilização	85	- 0,108	0,326
	Taxa de desenvolvimento embrionário	85	- 0,028	0,801

Os resultados apresentam o valor do coeficiente de correlação (r). \*p<0,05

### 3.2 Estudo do varicocele

Avaliou-se se o método do *Diff-Quik* poderia fornecer informação relativamente à integridade da cromatina de espermatozóides em indivíduos com varicocele (antes da embolização) e 3 meses após a embolização do varicocele (n=25). Como indicado (Figura 7) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) entre os espermatozóides de indivíduos antes da embolização ( $83,26 \pm 2,99$ ) e depois da embolização ( $80,88 \pm 2,65$ ).

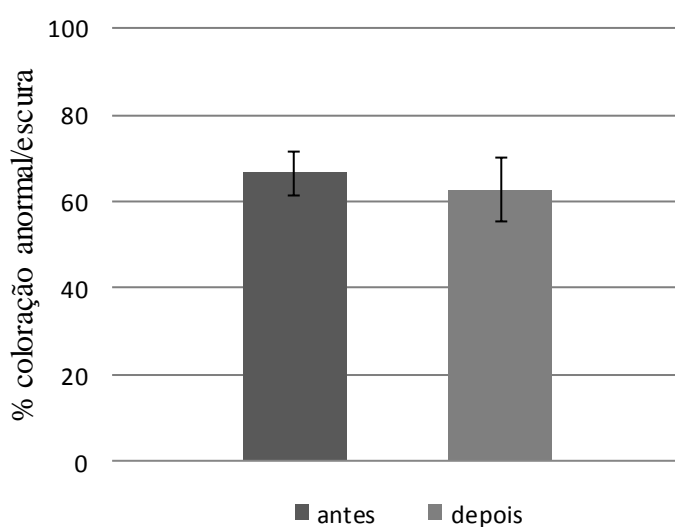


**Figura 7** – Percentagem de espermatozóides com uma coloração anormal/escuro antes e depois da embolização ao varicocele. Os resultados apresentam o valor da média  $\pm$  erro padrão em percentagem de espermatozóides ( $p>0,05$ ; n=25).

No entanto, verifica-se que a percentagem média de espermatozóides com uma coloração anormal/escuro nos indivíduos com varicocele ( $80,55 \pm 2,94$ ; n=37) é bastante superior à percentagem de espermatozóides com coloração anormal/escuro de um grupo de espermatozóides nativos ( $57,38 \pm 2,40$ ; n=92) referidos anteriormente na Figura 6.

### 3.3 Efeito de antioxidantes

Para verificar se a ingestão de antioxidantes pode ter um efeito positivo na integridade da cromatina de espermatozóides compararam-se amostras de sémen (n=10) do mesmo indivíduo antes de tomar antioxidantes ( $66,45 \pm 5,29$ ) e, pelo menos, 3 meses depois do início da toma ( $62,68 \pm 7,45$ ). Como se pode verificar (Figura 8) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ( $p > 0,05$ ).

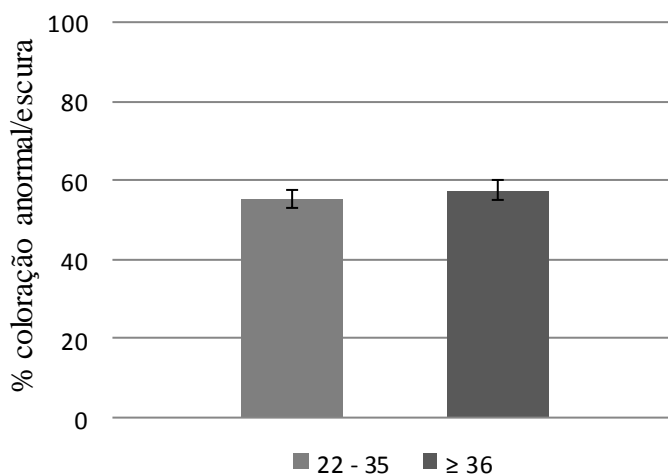


**Figura 8** – Percentagem de espermatozóides com uma coloração anormal/escuro antes e depois de tomar antioxidantes. Os resultados apresentam o valor da média  $\pm$  erro padrão em percentagem de espermatozóides (n=10).

### 3.4 Efeito da idade

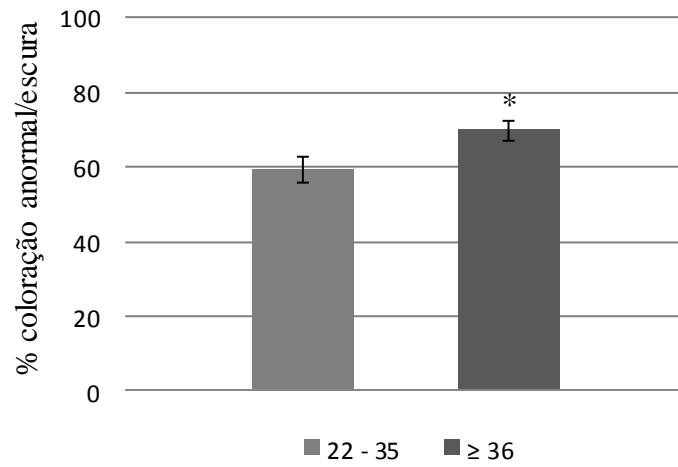
Para avaliar se a integridade da cromatina é afectada com o avanço da idade, foram analisadas amostras de sémen de indivíduos, escolhidos ao acaso, de diferentes idades (22 a 54 anos; n=176) pelo método do *Diff-Quik*. As amostras foram divididas em dois grupos, 22 – 35 anos ( $55,28 \pm 2,22$ ; n=96) e  $\geq 36$  anos ( $57,45 \pm 2,54$ ; n=80), no

entanto não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p=0,519$ ; Figura 9).



**Figura 9** – Percentagem de espermatozoides com uma coloração anormal/escura com idades entre os 22- 35 ( $n= 96$ ) e  $\geq 36$  anos ( $n=80$ ). Os resultados apresentam o valor da média  $\pm$  erro padrão em percentagem de espermatozoides.

Seguidamente foi dividir-se os indivíduos do grupo inicial (22 a 54 anos;  $n=176$ ) em normozoospermicos ( $n=98$ ) e não normozoospermicos ( $n=78$ ). Relativamente às amostras de sémen de indivíduos não normozoospermicos foram obtidas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,023$ ) entre os dois grupos de idades, 22 – 35 anos ( $59,22 \pm 3,56$ ;  $n=41$ ) e  $\geq 36$  anos ( $69,72 \pm 2,78$ ;  $n=37$ ), sugerindo assim um declínio da integridade da cromatina após os 36 anos de idade em indivíduos não normozoospermicos (Figura 10).



**Figura 10** – Percentagem de espermatozoides de amostras não normozoospermicas com uma coloração anormal/escuro com idades entre os 22- 35 (n= 41) e  $\geq 36$  anos (n=37). Os resultados apresentam o valor da média  $\pm$  erro padrão em percentagem de espermatozoides. \*p<0,05

## **Capítulo 4 - Discussão**

## 4. Discussão

Apesar da origem e dos mecanismos responsáveis pelas anomalias genómicas em espermatozóides ainda não serem totalmente claras, tem sido proposto que a fragmentação do ADN pode ser um parâmetro preditivo da fertilidade masculina em alternativa ou em adição aos parâmetros padrão analisados de forma rotineira [Muratori *et al.*, 2008]. Neste trabalho utilizou-se exclusivamente o método de coloração *Diff-Quik* para avaliação do estado da cromatina de espermatozóides humanos. Já foi demonstrado anteriormente por este grupo de investigação que o método é bastante consistente [Sousa e Tavares *et al.*, 2009].

### 4.1 Comparação entre espermatozóides migrados e amostra nativa

Para a realização das TRA, é efectuada uma técnica de migração também conhecida como *swim-up*. Esta técnica baseia-se na selecção de espermatozóides com base na sua capacidade de nadar para fora do plasma seminal e em meio de cultura [WHO, 2010]. Antes da realização da técnica de *swim-up*, as amostras de sémen são também sujeitas a uma centrifugação em gradiente de densidade que permite separar os espermatozóides do plasma seminal e de outros tipos de células [WHO, 2010].

Em ambos os procedimentos (centrifugação em gradiente de densidade e *swim-up*) é realizada uma pequena centrifugação durante 10 minutos a 300xg. Actualmente considera-se que as centrifugações efectuadas nas técnicas de separação de espermatozóides não provocam danos no seu ADN até porque são realizadas a baixa rotação e durante pouco tempo [Younglai *et al.*, 2001].

A capacidade que as técnicas de preparação de espermatozóides têm para remover aqueles que possuem anomalias, nomeadamente ao nível da integridade da cromatina, tem implicações extremamente importantes para o resultado das TRA [Sakkas *et al.*, 2000]. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a análise de espermatozóides pelo método do *Diff-Quik* permite verificar que as técnicas de preparação de espermatozóides, para além de conseguirem seleccionar aqueles que possuem uma maior mobilidade (*swim-up*), também seleccionam os espermatozóides

que apresentam uma melhor integridade da cromatina. Estudos realizados por Sakkas e colaboradores referem que é a técnica de centrifugação em gradiente de densidade e não a técnica de *swim-up* que permite a selecção dos espermatozóides com uma melhor integridade da cromatina [Sakkas *et al.*, 2000]. No entanto, neste trabalho não foram observados os espermatozóides que não migraram após a realização da técnica de *swim-up*, e por isso têm de ser consideradas as técnicas de preparação de espermatozóides como um conjunto. De qualquer forma, em termos de relevância clínica, o que é realmente importante é o facto das técnicas de preparação de espermatozóides para TRA estarem efectivamente a seleccionar os espermatozóides com uma melhor mobilidade e, como verificado neste trabalho, com uma melhor integridade da cromatina.

#### **4.1.1 Relação com a fertilidade**

Como já foi referido anteriormente, diversos estudos mostram a existência de uma correlação negativa entre a presença de danos no ADN de espermatozóides e os parâmetros seminais clássicos.

A capacidade de predição de uma gravidez após a realização das TRA tendo como base a avaliação da integridade da cromatina dos espermatozóides permanece controversa, e apesar de existirem estudos que demonstram uma correlação entre a presença de danos na cromatina e os resultados em termos de fertilidade, isso não quer dizer que forneçam indicações suficientemente fortes para prever a fertilidade masculina [Collins *et al.*, 2008].

Neste trabalho foram verificadas várias relações interessantes entre parâmetros clínicos e o estado da cromatina dos espermatozóides, utilizando exclusivamente o método do *Diff-Quik*. As taxas de fertilização (62,3%), de desenvolvimento embrionário (49,2%) e de gravidez (32,8%), em FIV e ICSI conjuntamente, são neste trabalho bastante semelhantes às verificadas anteriormente por este grupo de investigação (64,7%, 58,7% e 30,5% respectivamente; Sousa e Tavares *et al.*, 2009). Quando essas mesmas taxas são calculadas separadamente para FIV ou ICSI verificou-se que as taxas de fertilização e de desenvolvimento embrionário são cerca de 10% superiores nas ICSI. No entanto, a taxa de gravidez é muito superior nas FIV quando comparadas com as ICSI. Estes factos levam a crer que apesar de nos estados iniciais a ICSI parecer ser



mais promissora, em termos de obtenção de uma gravidez, a FIV mostra ser um melhor método na selecção de espermatozóides.

Alguns estudos não encontram nenhuma correlação entre os níveis de danos no ADN e as taxas de fertilização [Larson-Cook *et al.*, 2003; Henkel *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2008], mas encontram em relação à taxa de desenvolvimento embrionário [Morris *et al.*, 2002; Tesarik *et al.*, 2004]. O facto do genoma paterno ser activado apenas dois dias depois da fertilização [Braude *et al.*, 1988] explica a razão pela qual o estado do ADN não deve afectar dramaticamente a fertilização, tendo apenas influência aquando do desenvolvimento do embrião [Sousa e Tavares, 2009]. No entanto, neste trabalho os resultados foram precisamente opostos, indicando que a percentagem de espermatozóides com coloração anormal/escuro está logo à partida correlacionada com a taxa de fertilização. Estes resultados encontram-se, contudo, de acordo com outros estudos publicados [Sun *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 1998; Esterhuizen *et al.*, 2000; Host *et al.*, 2000; Duran *et al.*, 2002; Benchaib *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Muriel *et al.*, 2006; Velez de la Calle *et al.*, 2008], que sugerem que a correlação existente entre a fragmentação do ADN e a taxa de fertilização está relacionada com o facto de os espermatozóides que apresentam danos no ADN terem dificuldades no desenvolvimento de pronúcleos.

Relativamente à qualidade do embrião e à gravidez clínica, os resultados deste trabalho estão de acordo com os previamente observados por este grupo de investigação também utilizando o método do *Diff-Quik* nas amostras nativas. Uma melhor qualidade do embrião está associada a uma baixa percentagem de espermatozóides com danos na cromatina [Zini *et al.*, 2005; Velez de la Calle *et al.*, 2008; Sousa e Tavares *et al.*, 2009], assim como a obtenção de uma gravidez clínica [Tomlinson *et al.*, 2001; Benchaib *et al.*, 2003; Henkel *et al.*, 2003; Larson-Cook *et al.*, 2003; Sousa e Tavares *et al.*, 2009]. No entanto, quando analisadas as ICSI separadamente verifica-se que a existência de uma gravidez clínica não está, associada a uma baixa percentagem de espermatozóides com danos na cromatina, o que vem reforçar a ideia de que a FIV será um melhor método em termos de resultado final. De facto, a subjectividade na escolha de um espermatozóide para utilizar na ICSI já mostrou ter impacto na qualidade do embrião e muito provavelmente na gravidez, visto que um espermatozóide aparentemente normal pode conter danos ao nível da cromatina [Avendaño *et al.*, 2010].

De qualquer forma o número de casos onde se utilizou a FIV foi bastante inferior às ICSI estando ainda o estudo de mais amostras para FIV em aberto para continuação deste trabalho.

De notar que as discrepâncias encontradas entre os vários estudos podem também estar relacionadas com a utilização de diferentes técnicas de monitorização da integridade da cromatina, com as diferentes técnicas de preparação dos espermatozóides para TRA, ou mesmo da TRA que foi escolhida.

## **4.2 Estudo do varicocelo**

O varicocelo tem sido apontado como uma das maiores causas da infertilidade masculina. No entanto o mecanismo exacto pelo qual o é um factor de infertilidade ainda não é totalmente claro [Baazeem *et al.*, 2011]. Vários factores associados ao varicocelo podem induzir vias que levam a danos no ADN e a apoptose. Esses factores incluem o aumento da temperatura, exposição a agentes tóxicos, hipóxia testicular e aumento do stress oxidativo [Smith *et al.*, 2006].

Neste trabalho foram analisadas amostras de sémen de indivíduos com varicocelo e 3 meses após embolização, período que garante a análise após um ciclo completo da espermatogénese. A análise de espermatozóides pelo método do *Diff-Quik* não distinguiu diferenças ao nível da integridade da cromatina entre os espermatozóides antes e após a embolização ao varicocelo. O facto de a embolização ser um procedimento minimamente invasivo tem muitas vantagens pois não há necessidade de anestesia geral, a recuperação é rápida e há uma diminuição da morbilidade, no entanto a varicocelectomia tem sido apontado como o melhor tratamento para pacientes com varicocelo recorrente [Moon *et al.*, 2012]. De facto, há estudos que demonstram que a correcção cirúrgica do varicocelo através da laqueação das veias espermáticas, a varicocelectomia, melhora a qualidade seminal e reduz os danos no ADN [Smit *et al.*, 2010; Baazeem *et al.*, 2011]. Desta forma, a ausência de diferenças na integridade da cromatina dos espermatozóides pode ser explicada pela insuficiência do método escolhido ou também pela capacidade que cada individuo possui para responder ao tratamento.

De qualquer forma, este trabalho também mostra que os indivíduos com varicocele apresentam uma percentagem média de espermatozóides com uma coloração anormal/escuro bastante superior à de indivíduos de um grupo sem varicocele. De facto, estudos indicam um aumento significativo de danos no ADN de espermatozóides de indivíduos com varicocele, mesmo na presença de parâmetros seminais normais. Esses danos no ADN, independentemente da causa, afectam a qualidade dos espermatozóides ejaculados e podem ter implicações na fertilidade [Smith *et al.*, 2006].

#### **4.3 Efeito de antioxidantes**

Os espermatozóides são células particularmente vulneráveis a danos induzidos por espécies reactivas de oxigénio, visto que a sua membrana plasmática é rica em ácidos gordos poliinsaturados, e a pequena quantidade de citoplasma contém baixas concentrações de enzimas antioxidantes. Além disso os espermatozóides têm uma capacidade limitada para reparar o ADN [Gil-Villa *et al.*, 2009; Atig *et al.*, 2012]. A peroxidação lipídica desencadeia a perda da integridade da membrana plasmática, aumentando a permeabilidade celular, inactivação das enzimas e danos estruturais no ADN levando à morte da célula [Atig *et al.*, 2012]. O plasma seminal contém grandes quantidades de antioxidantes que protegem os espermatozóides de danos no ADN e da peroxidação lipídica [Gil-Villa *et al.*, 2009] e podem ser úteis na previsão do seu potencial de fertilização [Atig *et al.*, 2012].

O tratamento oral com antioxidantes já mostrou melhorar a integridade da cromatina, levando a uma diminuição significativa da fragmentação do ADN [Greco *et al.*, 2005]. Neste trabalho foram analisadas amostras de sémén de indivíduos antes e, pelo menos, 3 meses depois do início da toma de um medicamento antioxidante, o *Ever-Fit Cardio*. Como referido anteriormente o período de 3 meses garante o completo ciclo da espermatogénese. O *Ever-Fit Cardio* é um suplemento alimentar antioxidante que fornece ao organismo quantidades adequadas de vitaminas e minerais reconhecidos pelas suas propriedades antioxidantes. Apresenta na sua composição vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (D-alfa-tocoferol), ácido fólico, vitamina B6 (cloridrato de piridoxina), betacaroteno, magnésio, zinco, selénio e luteína. No entanto, o método do

*Diff-Quik* não distinguiu diferenças ao nível da integridade da cromatina entre os espermatozóides antes e após a toma de *Ever-Fit Cardio*. Possivelmente o reduzido número de indivíduos teve influência na ausência de diferenças, apesar de que, já foi demonstrado que existem doentes em que o tratamento com antioxidantes não é eficaz, muito provavelmente devido ao metabolismo da pessoa ou a diferenças na origem dos danos na cromatina [Moskovtsev, 2008].

#### **4.4 Efeito da idade**

Nos últimos anos, vários estudos têm tentando estabelecer possíveis relações entre o envelhecimento e a reprodução masculina [Winkle *et al.*, 2009]. O aumento da esperança média de vida ao longo do último século, associado a uma idade materna e paterna superior colocam questões relativas à redução da fertilidade com o avanço da idade. O envelhecimento do sistema reprodutor masculino é causado por mudanças multifactoriais ao nível celular, molecular e endócrino. Além disso, as características individuais são muito variáveis e são fortemente influenciadas pelo estilo de vida e factores ambientais [Amaral e Ramalho-Santos, 2009].

Tendo em consideração o aumento da idade paterna, existe um interesse substancial em estudar os efeitos do envelhecimento sobre a qualidade do sémen bem como dos danos no ADN dos espermatozóides [Winkle *et al.*, 2009]. No entanto, tal como anteriormente verificado por este grupo de investigação (Sousa e Tavares *et al.*, 2009), neste trabalho a análise de espermatozóides pelo método do *Diff-Quik* não distinguiu diferenças ao nível da integridade da cromatina entre o grupo com menos idade (22 a 35 anos) e o grupo com mais idade ( $\geq 36$  anos). De facto, a maioria dos estudos não encontra diferenças na fragmentação do ADN, por vezes nem sequer nos parâmetros seminais clássicos [Winkle *et al.*, 2009]. Em trabalhos semelhantes utilizam-se indivíduos normozoospermicos como controlo. Tendo esse facto em consideração, verificou-se neste trabalho que utilizando apenas as amostras de indivíduos não normozoospermicos existe uma diminuição na integridade da cromatina no grupo com mais idade ( $\geq 36$  anos) observado pelo método do *Diff-Quik*. Os indivíduos subférteis serão, por isso, à partida mais susceptíveis a danos na cromatina com o avanço da idade.

## **Capítulo 5 - Conclusões**

## 5. Conclusões

Este trabalho permitiu estabelecer relações entre o estado da cromatina de espermatozóides humanos e vários parâmetros com relevância clínica, tendo apenas como base a observação do estado da cromatina dos espermatozóides corados pelo método do *Diff-Quik*.

Os resultados obtidos mostram a eficiência das técnicas de preparação de espermatozóides na selecção daqueles que apresentam menos danos ao nível da cromatina, e por isso com maior potencial para uso nas TRA. Verificou-se que a presença de danos na cromatina dos espermatozóides afecta a qualidade do embrião e a obtenção de uma gravidez clínica, e está também associada a uma menor taxa de fertilização. Adicionalmente, pela análise dos vários parâmetros clínicos estudados e tendo como base as observações do estado da cromatina dos espermatozóides, é de salientar a eficiência da FIV, que mostrou possuir algumas vantagens quando comparada com a ICSI visto que resulta numa maior percentagem de gravidezes.

Em relação ao estudo do varicocelo, espermatozóides de indivíduos com tal patologia possuem mais danos na cromatina quando comparados com indivíduos sem varicocelo. No entanto, a embolização do varicocelo não surtiu qualquer efeito na integridade da cromatina dos espermatozóides o que poderá querer dizer que, muito provavelmente, este tratamento não será a melhor alternativa para tratar o varicocelo ou que será preciso mais tempo para ver melhorias. O mesmo aconteceu com o estudo do tratamento oral com antioxidantes, que não forneceu indicações do ponto de vista clínico que mostrem efeitos positivos na integridade da cromatina dos espermatozóides após o tratamento. A idade parece ter influência no estado da cromatina em indivíduos não normozoospermicos, estando idades mais avançadas (a partir dos 35) associadas a um aumento dos danos na cromatina.

O método do *Diff-Quik* fornece assim informações úteis em vários aspectos clínicos, demonstrando dessa forma a sua relevância clinica. Desta forma, a sua utilização de forma rotineira nos laboratórios de andrologia, seria certamente uma mais-valia em adição aos parâmetros básicos actualmente avaliados.

## **Capítulo 6 - Bibliografía**

## 6. Bibliografia

- Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK and Evenson DP (1997) Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Experimental Cell Research*. 236: 231-237.
- Atig F, Raffa M, Ali HB, Abdelhamid K, Saad A and Ajina M (2012) Altered Antioxidant Status and Increased Lipid Per-Oxidation in Seminal Plasma of Tunisian Infertile Men. *International Journal of Biological Sciences*. 8: 139-149.
- Avendano C, Franchi A, Duran H and Oehninger S (2010) DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertility and Sterility*. 94: 549-557.
- Baazeem A, Belzile E, Ciampi A, Dohle G, Jarvi K, Salonia A, Weidner W and Zini A (2011) Varicocele and Male Factor Infertility Treatment: A New Meta-analysis and Review of the Role of Varicocele Repair. *European Urology*. 60: 796-808.
- Barroso G, Morshedi M and Oehninger S (2000) Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 15: 1338-1244.
- Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H and Guerin JF (2003) Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction*. 18: 1023-1028.
- Braude P, Bolton V and Moore S (1988) Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*. 332: 459-461.
- Cheng Y, Wong EWP and Cheng CY (2011) Cancer/testis (CT) antigens, carcinogenesis and spermatogenesis. *Landes Bioscience*. 1: 209-220.
- Chi H, Chung D, Choi S, Kim J, Kim G, Lee J, Lee H, Kim M and Roh S (2011) Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its



relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 38: 10-17.

Collins JA, Barnhart KT and Schlegel PN (2008) Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization?. *Fertility and Sterility*. 89: 823-831.

Duran EH, Morshedi M, Taylor S and Oehninger S (2002) Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Human Reproduction*. 17: 3122-3128.

Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JGH, Prinsloo E and van Rooyen LH (2000) Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. *Human Reproduction*. 15: 657-661.

Esteves SC, Miyaoka R and Agarwal A (2011) An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics*. 66: 691-700.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z and Melamed MR (1980) Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*. 210: 1131-1133.

Fox SI (2003) *Human Physiology*, 8ª Edição. McGraw-Hill, Boston. pp: 641-683.

Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F and Lenzi A (2000) Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 15: 830-839.

Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal A, Sharma R and Cadavid A (2009) Role of male factor in early recurrent embryo loss: do antioxidants have any effect?. *Fertility and Sterility*. 92: 565-571.

Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H and Darzynkiewicz Z (1993) 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. *Experimental Cell Research*. 207: 202-205.

Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S and Tesarik J (2005) Reduction of the Incidence of Sperm DNA Fragmentation by Oral Antioxidant Treatment. *Journal of Andrology*. 26: 349-353.

- Greco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG, Ubaldi F, Rienzi L and Tesarik J (2005) ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Human Reproduction*. 20: 2590-2594.
- Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Schill WB and Kruger TF (2003) DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reproductive Biomedicine Online*. 7: 477-484.
- Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill W and Kruger TF (2004) Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and Sterility*. 81: 965-972.
- Host E, Lindenberg S and Smidt-Jensen S (2000) DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization in vitro in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 79: 189-193.
- Huang C, Lin DP, Tsao H, Cheng T, Liu C and Lee M (2005) Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertility and Sterility*. 84: 130-140.
- Huang X and Sha J (2011) Proteomics of spermatogenesis: from protein lists to understanding the regulation of male fertility and infertility. *Asian Journal of Andrology*. 13: 18-23.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA and Aitken RJ (2000) DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology*. 21: 33-44.
- Jan SZ, Hamer G, Repping S, Rooij DG, van Pelt AMM and Vormer TL (2012) Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. In press.
- Jonge C and Barratt C (2006) The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration, 1ª Edição. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp: 14-20.

- Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET and Evenson DP (2003) Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*. 80: 895-902.
- Li C and Zhou X (2012) Gene transcripts in spermatozoa: Markers of male infertility. *Clinica Chimica Acta*. In press.
- Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ and Hwu YM. (2008) Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertility and Sterility*. 90: 352-359.
- Lopata A, McMaster R, McBain JC and Johnston WI (1978) In-vitro fertilization of preovulatory human eggs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 52: 339-342.
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J and Casper RF (1998) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*. 69: 528-532.
- Massart A, Lissens W, Tournaye H and Stouffs K (2012) Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian Journal of Andrology*. 14: 40-48.
- Moon KH, Cho SJ, Kim KS, Park S and Park S (2012) Recurrent Varicoceles: Causes and Treatment Using Angiography and Magnification Assisted Subinguinal Varicocelectomy. *Yonsei Medical Journal*. 53: 723-728.
- Morris ID, Ilott S, Dixon L and Brison DR (2002) The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction*. 17: 990-998.
- Moskovtsev SI (2008) Management of patients with high sperm DNA damage. *Indian Journal of Medical Research*. 127: 101-3.

- Mota PC and Ramalho-Santos J (2006) Comparison between different markers for sperm quality in the cat: Diff-Quik as a simple optical technique to assess changes in the DNA of feline epididymal sperm. *Theriogenology*. 65: 1360-1375.
- Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G and Baldi E (2003) Spontaneous DNA Fragmentation in Swim-Up Selected Human Spermatozoa During Long Term Incubation. *Journal of Andrology*. 24: 253-262.
- Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Tocci V, Failli P, Forti G and Baldi E (2008) Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters. *Human Reproduction*. 23: 1035-1043.
- Muriel L, Garrido N, Fernández JL, Remohí J, Pellicer A, de los Santos MJ and Meseguer M (2006) Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*. 85: 371-383.
- Natali A and Turek PJ (2011) An Assessment of New Sperm Tests for Male Infertility. *Urology*. 77: 1027-1034.
- O'Brien J and Zini A (2005) Sperm DNA Integrity and Male Infertility. *Urology*. 65: 16-22.
- Palermo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem AC (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 340: 17-18.
- Rajender S, Avery K and Agarwal A (2011) Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research*. 727: 62-71.
- Ramalho-Santos J, Amaral A, Sousa AP, Rodrigues AS, Martins L, Baptista M, Mota PC, Tavares R, Amaral S and Gamboa S (2007) Probing the Structure and Function of Mammalian Sperm using Optical and Fluorescence Microscopy. In *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*. FORMATEX, Extremadura. pp: 394-402.

- Sailer BL, Jost LK and Evenson DP (1995) Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *Journal of Andrology*. 16: 80-87.
- Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG and Bianchi U (2000) The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Human Reproduction*. 15: 1112-1116.
- Seli E and Sakkas D (2005) Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Human Reproduction*. 11: 337-349.
- Smamsi MB, Kumar R and Dada R (2008) Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian Journal of Medical Research*. pp: 115-123.
- Smit M, Romijn JC, Wildhagen MF, Veldhoven JLM, Weber RFA and Dohle GR (2010) Decreased Sperm DNA Fragmentation After Surgical Varicocele is Associated With Increased Pregnancy Rate. *The Journal of Urology*. 183: 270-274.
- Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I and Castro A (2006) Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Human Reproduction*. 21: 986-993.
- Sousa AP, Amaral A, Baptista M, Tavares R, Campo PC, Peregrín PC, Freitas A, Paiva A, Almeida-Santos T and Ramalho-Santos J (2011) Not All Sperm Are Equal: Functional Mitochondria Characterize a Subpopulation of Human Sperm with Better Fertilization Potential. *Plos one*. 6: e18112.
- Sousa APM, Tavares RS, de la Calle JFV, Figueiredo H, Almeida V, Almeida-Santos T and Ramalho-Santos J (2009) Dual use of Diff-Quik-like stains for the simultaneous evaluation of human sperm morphology and chromatin status. *Human Reproduction*. 24: 28-36.

- Sun JG, Jurisicova A and Casper RF (1997) Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Human Reproduction*. 56: 602-607.
- Tavalaee M, Razavi S and Nasr-Esfahani MH (2008) Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertility and Sterility*. 91: 1119-1126.
- Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ and Friedman S (1984) A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertility and Sterility*. 42: 87-91.
- Tesarik J, Greco E and Mendoza C (2004) Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reproduction*. 19: 611-615.
- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M and Sakkas D (2001) Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Human Reproduction*. 16: 2160-2165.
- Varum S, Bento C, Sousa AP, Gomes-Santos CS, Henriques P, Almeida-Santos T, Teodósio C, Paiva A and Ramalho-Santos J (2007) Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. *Fertility and Sterility*. 87: 572-583.
- Vavouri T and Lehner B (2011) Chromatin Organization in Sperm May Be the Major Functional Consequence of Base Composition Variation in the Human Genome. *Plos Genetics*. 7: e1002036.
- Velez de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Jimenez C, Wittemer C and Thonneau P (2008) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertility and Sterility*. 90: 1792-1799.

- WHO (2010). World Health Organization Laboratory Manual for the Examination of Human Semen, 5<sup>a</sup> Edição. World Health Organization Press, Geneva, Switzerland.
- Winkle T, Rosenbusch B, Gagsteiger F & Paiss T and Zoller N (2009) The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 26: 41-46.
- Yap DB, Walker DC, Prentice LM, McKinney S, Turashvili G, Mooslehner-Allen K, Algara TR, Fee J, Tassigny XA, Colledge WH and Aparicio S (2011) MII5 Is Required for Normal Spermatogenesis. *Plos one*. 6: e27127.
- Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A and Casper RF (2001) Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Human Reproduction*. 16(9) pp. 1950-1953.
- Zini A, Meriano J, Kader K, Jarvi K, Laskin CA and Cadesky K (2005) Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Human Reproduction*. 20(12): 3476-3480.
- Zini A and Sigman M (2009) Are Tests of Sperm DNA Damage Clinically Useful? Pros and Cons. *Journal of Andrology*. 30: 219-229.