

**Amanda das Neves Ribeiro**

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE FUNCIONAL DE  
ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS APÓS PROCESSAMENTO  
SEMINAL POR MICROFLUÍDICA**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina, para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências.

São Paulo

2024

**Amanda das Neves Ribeiro**

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE FUNCIONAL DE  
ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS APÓS PROCESSAMENTO  
SEMINAL POR MICROFLUÍDICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Orientador(a):**

Profa. Dra. Paula Intasqui Lopes

**Coorientador(a):**

Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

São Paulo

2024

Ribeiro, Amanda das Neves

**Avaliação da integridade funcional de espermatozoides recuperados após processamento seminal por microfluídica/**  
Amanda das Neves Ribeiro. – São Paulo, 2024.  
xvi, 39f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Urologia.

Título em inglês: Evaluation of the functional integrity of spermatozoa recovered after seminal processing by microfluidics.

1. Acrossoma; 2. Análise do Sêmen; 3. Espermatozoides; 4. Fragmentação do DNA; 5. Microfluídica; 6. Mitocôndrias.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM UROLOGIA**

**Chefe do Departamento:**

Prof. Dr. Edson Khodor Cury

**Chefe da Disciplina:**

Prof. Dr. Fernando Gonçalves de Almeida

**Coordenador(a) do Curso de Pós-graduação:**

Profa. Dra. Paula Intasqui Lopes

**Amanda das Neves Ribeiro**

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE FUNCIONAL DE  
ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS APÓS PROCESSAMENTO  
SEMINAL POR MICROFLUÍDICA**

Presidente da Banca:

Profa. Dra. Paula Intasqui Lopes

---

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Amanda Begatti Victorino Monteiro

---

Prof. Dr. Maurício Barbour Chehin

---

Prof. Dr. Augusto Azzolini de Melo

---

Profa. Dra. Mariana Pereira Antoniassi

---

## **Dedicatória**

À minha família que me inspirou na área acadêmica e me ajudou imensamente a formar meu caráter e educação. Com muito carinho intenciono meus eternos agradecimentos de forma carinhosa pois eles nunca desistiram dos meus sonhos e sempre estiveram ao meu lado.

## Agradecimentos

À orientadora desta dissertação o **Prof<sup>a</sup> Dra. Paula Intasqui Lopes**, pela orientação prestada, pelo seu incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou. Aqui lhe exprimo a minha gratidão e imenso carinho.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla**, pela sua disponibilidade nas análises laboratoriais e estatísticas, pelo seu incentivo, pelo seu apoio na elaboração deste trabalho e na apresentação no Congresso Americano de Reprodução Assistida (ASRM) que ocorreu em New Orleans, nos Estados Unidos em 2023.

As Professoras **Dra. Mariana Camargo** e **Dra. Mariana Pereira Antoniassi**, pelo incentivo e contribuição na realização deste trabalho.

Às profissionais do Laboratório de Andrologia da UNIFESP, **Valéria Barradas**, **Carolina Homs** pela ajuda diária, pela disponibilidade e pela boa vontade e paciência durante a obtenção das amostras utilizadas para este trabalho.

À **Mika Alexia Miyazaki**, **Beatriz Ribeiro**, **Joana Melin**, **Raquel Lozano** e **Renata de Carvalho**, pela amizade e ajuda ao longo de todo este trabalho, sempre me mantendo tranquila na realização dos experimentos. E muito obrigada pelas conversas e por dividirem comigo todos os momentos, sejam eles difíceis ou divertidos. Me acolheram no grupo e me sinto parte dessa família linda do laboratório.

À minha mãe **Elenice das Neves** que esteve ao meu lado me apoiando e incentivando a fazer o meu melhor, sempre com muito carinho e amor. Passamos por momentos difíceis devido a doença, mas passamos juntas por mais essa fase.

Aos **meus pais**, sem inspiração não teria de onde tirar tanta vontade de seguir com a carreira acadêmica. **Carlos Rey Perez**, meu pai postigo me incentivou grandemente nesse quesito e agradeço imensamente. **Roberto Ribeiro**, pai querido, obrigada pelo

incentivo diário e pelo seu carinho que me faz ser quem eu sou seja na vida profissional ou pessoal.

À minha prima e tia, **Érica das Neves Palotta** e **Elaine Aparecida das Neves Palotta** que me incentivaram desde o início da minha faculdade, Érica, você é minha inspiração, obrigada por ser uma irmã mais velha tão incrível em minha vida.

À minha irmã **Maria Isabel Rey das Neves**, obrigada pelo carinho e incentivo ao longo desses anos, me ajudaram muito a desenvolver minha calma e paciência.

Ao **Rodrigo Di Dario Lima**, meu companheiro, obrigada por me incentivar todos os dias e nunca me deixar desistir. Me acalmou, me ouviu e teve muita paciência, além de me acompanhar em todos os passos da pós-graduação, indo até os Estados Unidos para minha apresentação no ASRM. Agradeço imensamente sua presença em minha vida.

À **Lígia Di Dario**, minha sogra, muito obrigada pelo incentivo, carinho e ajuda em todos os momentos, principalmente nos momentos mais difíceis.

A **toda minha família** pelo carinho e incentivo.

A **todos os amigos e amigas** que de alguma, contribuíram, ou auxiliaram na elaboração do presente estudo, pela paciência, atenção e força.

Ao **Colégio Sagrado Coração de Jesus**, que me apoiou e incentivou a continuidade no mestrado juntamente com as aulas.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo financiamento do projeto de pesquisa.



*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os  
tímoneiros que entram no navio sem timão nem bússola,  
nunca tendo certeza do seu destino”.*

*(Leonardo da Vinci)*

## Resumo

**Objetivo:** O fator masculino de infertilidade pode ser uma das razões para que não haja gravidez de forma natural. Quando há necessidade de realização de técnicas de reprodução assistida, a amostra deve ser previamente processada, para remoção do plasma seminal e para seleção de espermatozoides móveis e viáveis. Diferentes técnicas podem ser utilizadas, mas pouco se sabe sobre a qualidade funcional dos espermatozoides recuperados. Por isso, o objetivo deste estudo é analisar e comparar a integridade funcional dos espermatozoides processados por gradiente de densidade descontínuo e por microfluídica. **Métodos:** Foi realizado um estudo prospectivo que incluiu trinta homens voluntários (n=30), com uma idade média de 29,8 anos, que coletaram sêmen por masturbação. Após a liquefação do sêmen, uma porção do sêmen a fresco foi utilizada para avaliar a integridade funcional dos espermatozoides (integridade acrossômica, usando coloração PNA, atividade mitocondrial, usando ensaio DAB e fragmentação de DNA pelo ensaio cometa alcalino). O volume restante foi, então, dividido igualmente em duas porções, uma utilizada para o gradiente de densidade descontínuo e a outra para o processamento por microfluídica, utilizando o dispositivo Zymot. Após o processamento, os espermatozoides selecionados foram também avaliados quanto à integridade funcional. Os dados foram comparados entre o controle (amostra a fresco), gradiente de densidade descontínuo e Zymot utilizando teste de Friedman para amostras pareadas com *post hoc* de Conover ou ANOVA de medidas repetidas com *post hoc* de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** O processamento por Zymot não levou a nenhuma alteração em relação à integridade do acrossoma dos espermatozoides quando comparado à amostra a fresco, enquanto o gradiente de densidade descontínuo levou à piora dessa variável. Por outro lado, o Zymot melhorou significativamente a atividade mitocondrial dos espermatozoides, quando comparado à amostra a fresco e aos espermatozoides recuperados por gradiente de densidade descontínuo. A fragmentação de DNA espermático não apresentou diferença significativa entre os três tratamentos. **Conclusão:** O uso do dispositivo de seleção de espermatozoides via microfluídica (Zymot) permite a seleção de espermatozoides com alta atividade mitocondrial, evitando a reação/dano do

acrossoma que ocorre durante a centrifugação em gradiente de densidade, porém não demonstra seleção de espermatozoides com menor taxa de fragmentação de DNA.

**Palavras-chave:** Acrossoma; Análise do Sêmen; Espermatozoides; Fragmentação do DNA; Microfluídica; Mitocôndrias.

## Abstract

**Objective:** Male infertility may be one of the reasons for the absence of natural pregnancy. When there is a need for assisted reproduction techniques, semen must be previously processed, for the removal of seminal plasma and the selection of motile and viable sperm. Different techniques can be used, but little is known regarding the functional quality of selected sperm. Therefore, the aim of this study is to analyze and compare the functional integrity of sperm processed by discontinuous gradient centrifugation and microfluidics. **Methods:** A prospective study was conducted, including thirty voluntary men (n=30), with an average age of 29.8 years, who collected semen through masturbation. After semen liquefaction, a portion of the raw semen was used to assess sperm functional integrity (acrosomal integrity using PNA staining, mitochondrial activity using the DAB assay, and sperm DNA fragmentation through the alkaline comet assay). The remaining volume was then equally divided into two portions, one processed by discontinuous gradient centrifugation and the other by microfluidics, using the Zymot device. After semen processing, selected sperm were evaluated for their functional integrity. Data were compared between raw semen, density gradient, and Zymot using paired Friedman with Conover *post hoc* or repeated measures ANOVA with Bonferroni *post hoc* ( $p < 0.05$ ). **Results:** Zymot did not lead to any alteration regarding sperm acrosome integrity, when compared to raw semen, whereas discontinuous gradient centrifugation significantly impaired this variable. On the other hand, Zymot led to the improvement of sperm mitochondrial activity, when compared to raw semen and sperm recovered by discontinuous gradient centrifugation. Sperm DNA fragmentation did not show a significant difference between the three treatments. **Conclusions:** The use of the microfluidic sperm selection device (Zymot) allows for the selection of sperm with high mitochondrial activity, avoiding the acrosome reaction/damage that occurs during density gradient centrifugation. However, it does not demonstrate any improvement in the selection of spermatozoa with lower rates of DNA fragmentation.

**Keywords:** Acrosome; DNA fragmentation; Microfluidics; Mitochondria; Semen analysis; Spermatozoa.

## Sumário

Dedicatória .....	v
Agradecimentos .....	vi
Resumo .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Abstract .....	xi
Lista de figuras .....	xiii
Lista de tabelas .....	xiv
Lista de abreviaturas e siglas .....	xv
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
2.1 Objetivo geral .....	5
2.2 Objetivos específicos .....	5
<b>3 MÉTODOS .....</b>	<b>6</b>
3.1 Aprovação do Comitê de Ética .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2 Indivíduos .....	6
3.3 Desenho Experimental .....	6
3.4 Processamento Seminal por Gradiente de Densidade Descontínuo .....	7
3.5 Processamento Seminal por Microfluídica (zymot) .....	8
3.6 Avaliação da Integridade do Acrossoma dos Espermatozoides	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.7 Avaliação da Atividade Mitocondrial dos Espermatozoides .....	10
3.8 Avaliação da Fragmentação de DNA Espermático .....	12
3.9 Análise estatística .....	13
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>13</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>23</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>24</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>35</b>

## Lista de figuras

- Figura 1.** Fluxograma do Desenho Experimental do presente estudo.....7
- Figura 2.** Realização da técnica de gradiente de densidade descontínuo. A - Sêmen adicionado a duas camadas de diferentes densidades (de 45 a 90%). B. *Pellet* contendo os espermatozoides viáveis, utilizados para a análise de sua integridade funcional.....**E**  
**rror! Indicador não definido.**
- Figura 3.** Processamento seminal via microfluídica para seleção espermática, utilizando o dispositivo Zymot.....9
- Figura 4.** Espermatozoides corados com PNA para identificação dos acrossomas íntegros.....10
- Figura 5.** Avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozoides pelo método de 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Classe I – 100% das mitocôndrias ativas; Classe II – Mais de 50% das mitocôndrias ativas; Classe III – Menos de 50% das mitocôndrias ativas; Classe IV (não mostrada) – Ausência de mitocôndrias ativas.....11
- Figura 6.** Avaliação da fragmentação de DNA dos espermatozoides via ensaio cometa alcalino.....**Er**  
**ror! Indicador não definido.**

## Lista de tabelas

- Tabela 1.** Análise descritiva das variáveis seminais dos homens incluídos neste estudo (n=30)..... 15
- Tabela 2.** Concentração espermática em amostras a fresco, após gradiente de densidade descontínuo e após microfluídica (Zymot). Os dados foram comparados entre os tratamentos por ANOVA de medidas repetidas, com correção de Green-Geisser e *post hoc* de Bonferroni.....16
- Tabela 3.** Integridade dos espermatozoides de amostras a fresco, recuperados por gradiente de densidade descontínuo e por microfluídica (Zymot). Os dados foram comparados entre os tratamentos por Teste múltiplo não paramétrico de Friedman para amostras pareadas com *post hoc* de Conover, a não se quando descrito.....17

## Lista de abreviaturas e siglas

<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ASRM</b>	Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva
<b>BWW</b>	<i>Biggers Whitten Whittingan</i>
<b>CAAE</b>	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
<b>DAB</b>	3,3'-diaminobenzidina
<b>DFI</b>	Índice de Fragmentação de DNA Espermático
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>ICSI</b>	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide
<b>LMPA</b>	<i>Low Melting Point Agarose</i>
<b>MMP</b>	Potencial de Membrana Mitocondrial
<b>NMPA</b>	<i>Normal Melting Point Agarose</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PNA</b>	<i>Lectina Peannut Agglutinin</i>
<b>RHA</b>	Reprodução Humana Assistida
<b>SCSA</b>	<i>Sperm Chromatin Structure Assay</i>
<b>SCD</b>	<i>Sperm Chromatin Dispersion</i>
<b>TBE</b>	Tris-Ácido Bórico
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**TUNEL**      *Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling*

# 1 INTRODUÇÃO

---

A infertilidade é caracterizada pelo insucesso em se atingir uma gravidez, baseando-se no histórico médico, sexual e reprodutivo do(a) paciente, bem como em idade, achados físicos e testes diagnósticos, ou em uma combinação destes fatores, com necessidade de intervenção médica, incluindo-se, mas não limitado, ao uso de gametas ou embriões doados para que se atinja a gravidez, tanto em um indivíduo quanto em um casal (American Society for Reproductive Medicine, 2023). O fator masculino de infertilidade pode ser identificado isoladamente em 20 – 40% dos casais e pode envolver diversas variáveis, como alterações genéticas, varicocele e fatores de estilo de vida, como tabagismo (SOHRABVAND *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2020). Um dos primeiros instrumentos para avaliação do potencial fértil masculino é a análise seminal, conforme indicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2021). Entretanto, a análise seminal não fornece diagnóstico direto de infertilidade, uma vez que possui baixa sensibilidade e especificidade (WHO, 2021; PASQUALOTTO, 2007). Apesar disso, para casais que necessitam de tratamentos de Reprodução Humana Assistida (RHA), a análise seminal é utilizada para auxiliar na determinação do melhor tratamento, assim como do método mais adequado de processamento seminal (DE JONGE, 2002).

O processamento seminal tem como objetivo a seleção de espermatozoides móveis, altamente funcionais e com poucos danos ao DNA por meio de sua separação do plasma seminal e de outras células, como espermatozoides imóveis, células germinativas imaturas e leucócitos. Apesar do plasma seminal ser importante para o processo de fertilização *in vivo*, a exposição prolongada de espermatozoides ao plasma seminal *in vitro* pode levar à redução de sua motilidade, viabilidade e capacidade de sofrer reação acrossômica, reduzindo sua capacidade de fertilização. Além disso, por poder conter agentes tóxicos, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), a exposição ao plasma seminal pode levar ao aumento da fragmentação do DNA dos espermatozoides através de peroxidação lipídica (WHO, 2021; MAHADEVAN & BAKER, 1984; BEDFORD, 1983; ARAÚJO, 2014; MORTIMER, 1991; MORTIMER & MORTIMER, 1992).

Existem vários métodos de processamento seminal, como o *swim up*, gradiente de densidade descontínuo e, mais recentemente, os métodos baseados em microfluídica. O processamento feito pela técnica *swim up* é baseado na migração dos espermatozoides móveis para a parte superior da amostra, quando mantida em um ângulo de 45° (AITKEN & CLARKSON, 1998; WHO, 2010). Essa técnica é destinada a casos de astenozoospermia leve, mas não é utilizada em casos de astenozoospermia grave, oligozoospermia ou teratozoospermia (AITKEN & CLARKSON, 1998; MORTIMER, 1991; MORTIMER, 1994; WHO, 2010).

Outro processamento seminal comumente utilizado é o gradiente de densidade descontínuo, o qual é realizado a partir da formação de um gradiente com dois ou três meios de cultura com diferentes densidades. Após centrifugação da amostra, os espermatozoides móveis progressivos migram para o meio de cultura mais denso, podendo ser recuperados. Essa técnica é destinada a casos de astenozoospermia grave, teratozoospermia e oligozoospermia (HARRISON, 1976; MORTIMER *et al.*, 1986; AITKEN & CLARKSON, 1998; WHO 2021). Mortimer (1991) realizou um estudo comparativo entre as técnicas de gradiente e *swim up* em casos de pacientes com astenozoospermia e oligozoospermia. Nesse estudo, foram demonstradas maiores taxas de sobrevivência de espermatozoides e de gravidez em amostras processadas via gradiente de densidade descontínuo em comparação ao *swim up*. Por outro lado, a centrifugação do sêmen com má qualidade pode gerar danos iatrogênicos irreversíveis aos espermatozoides devido à geração de EROs pelos espermatozoides alterados e leucócitos, prejudicando a capacidade de fertilização (MORTIMER, 1991).

A técnica mais recente de processamento seminal é denominada seleção de espermatozoides por microfluídica. O principal exemplo dessa técnica é o dispositivo de separação de espermatozoides Zymot, fabricado pela *Zymot Fertility, Inc.* Esse dispositivo consiste em uma placa com uma porta de entrada, na qual a amostra seminal é adicionada, e uma câmara de concentração, com uma membrana com poros capazes de permitir a passagem apenas de espermatozoides móveis progressivos, os quais se direcionam para o meio de cultura adicionado a ela. Esses espermatozoides são, então, recuperados na porta de saída, estando prontos para serem utilizados em tratamentos de RHA. Algumas características notórias dos espermatozoides recuperados por essa técnica, de acordo com o fabricante, são

menores taxas de fragmentação de DNA, maior motilidade e melhora na morfologia dos espermatozoides selecionados. Além disso, estudos sugerem que os embriões formados por espermatozoides recuperados por Zymot apresentam melhor qualidade, quando na fase de blastocisto, e menor taxa de aneuploidia (QUINN *et al.*, 2018; ÇIL *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2014, ZAHA *et al.*, 2023, ROBLES *et al.*, 2021, ANDERSON *et al.*, 2020, TAYLOR *et al.*, 2021, PARRELLA *et al.*, 2019). Esse é um método rápido, custo efetivo e que, por não envolver a etapa de centrifugação, comumente utilizada em técnicas como gradiente de densidade descontínuo, reduz a produção iatrogênica de EROs, sendo essas grandes vantagens para a utilização dessa técnica (PAVLOVIC *et al.*, 2020; HANCOCK *et al.*, 2020; ASGHAR *et al.*, 2014). Ainda, de acordo com Alicia *et al.* (2019), essa técnica leva à redução de formação de adutos de DNA devido ao estresse oxidativo e à presença de células imaturas. Entretanto, as características funcionais dos espermatozoides recuperados por essa técnica, como integridade do acrossoma, atividade mitocondrial e integridade da cromatina, ainda não foram avaliadas.

O espermatozoide é formado por cabeça, peça intermediária e cauda. Na cabeça, está localizado o acrossoma, uma estrutura importante para a fertilização. O acrossoma contém diversas enzimas responsáveis pela penetração do espermatozoide na zona pelúcida do oócito. Para isso, é necessário que a reação acrossômica aconteça, o que depende da presença de um acrossoma íntegro e capaz de reagir a mudanças da membrana plasmática do espermatozoide, tornando-a mais fluida (BARTH & OKO, 1989; KAWAKAMI *et al.*, 1993).

Outra estrutura importante está localizada na peça intermediária dos espermatozoides, onde estão presentes as mitocôndrias. Sua principal função é sintetizar energia na forma de adenosina trifostato (ATP) via fosforilação oxidativa. Para que esse evento aconteça, é necessário que haja um potencial adequado da membrana mitocondrial (MMP), sendo esse um indicativo da funcionalidade mitocondrial e do potencial energético. A energia produzida pela mitocôndria é utilizada não só para o metabolismo do espermatozoide, mas também para a manutenção da sua motilidade, ressaltando a importância da presença de mitocôndrias íntegras e ativas para a função correta do espermatozoide (RAMALHO-

SANTOS *et al.*, 2009; AMARAL *et al.*, 2013; KASAI *et al.*, 2002; SOUSA *et al.*, 2011; MARCHETTI *et al.*, 2012; MALIC *et al.*, 2016; PAOLI *et al.*, 2011).

Por fim, é necessária a presença de uma cromatina íntegra e capaz de se descondensar após a fertilização para a transmissão correta da informação genética masculina para o embrião. Santo *et al.* (2016) realizaram uma análise com 109 pacientes inférteis apresentando variáveis seminais normais e anormais, buscando avaliar a associação entre a fragmentação do DNA dos espermatozoides e as aneuploidias embrionárias. Nesse estudo, observou-se que homens com maiores taxas de fragmentação de DNA dos espermatozoides apresentaram falhas no mecanismo de reparo do DNA das células germinativas, além de apoptose. A consequência dessa alteração foi o aumento da ocorrência de abortos ou de aneuploidias nos embriões (SANTO *et al.*, 2016). Ainda, homens com alta taxa de fragmentação de DNA dos espermatozoides apresentam menores taxas de gravidez por reprodução natural ou após técnicas de RHA e retardo do desenvolvimento embrionário (EVENSON & WIXON, 2006). Diversas técnicas para detecção de danos no DNA podem ser realizadas e, dentre os estudos que avaliaram a integridade do DNA dos espermatozoides recuperados após o processamento por Zymot, nenhum utilizou a avaliação direta da fragmentação por ensaio em eletroforese em gel de célula única, o qual é mais sensível do que os demais métodos por detectar quaisquer quebras de DNA, tanto em fita simples quanto em dupla (ALVES *et al.*, 2015; ESTEVES & AGARWAL, 2011; ANTONIASSI *et al.*, 2016).

Assim, apesar de técnicas de processamento seminal serem realizadas rotineiramente para potencializar a concentração de espermatozoides móveis e morfológicamente normais para a realização de técnicas de RHA, a qualidade funcional dos espermatozoides recuperados pelas novas biotecnologias existentes, como a Zymot, ainda não foi avaliada. Essa informação pode facilitar a obtenção de melhores resultados, se comparado aos resultados das técnicas de processamento seminal comumente utilizadas. Sendo assim, o presente estudo hipotetiza que os espermatozoides recuperados por Zymot possuem menor fragmentação de DNA e maiores integridade do acrossoma e atividade mitocondrial, quando comparado à amostra a fresco ou aos espermatozoides recuperados por gradiente de densidade descontínuo.

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo é analisar e comparar a integridade funcional dos espermatozoides processados por gradiente de densidade descontínuo e por microfluídica (Zymot).

### 2.2 Objetivos específicos

- Analisar e comparar a integridade acrossomal dos espermatozoides em amostras a fresco e para os diferentes tipos de processamento seminal:
  - a. Gradiente de densidade descontínuo;
  - b. Microfluídica (Zymot);
- Analisar e comparar a integridade mitocondrial dos espermatozoides em amostras a fresco e para os diferentes tipos de processamento seminal:
  - a. Gradiente de densidade descontínuo;
  - b. Microfluídica (Zymot);
- Analisar e comparar a integridade do DNA espermático em amostras a fresco e para os diferentes tipos de processamento seminal;
  - a. Gradiente de densidade descontínuo;
  - b. Microfluídica (Zymot);
- Identificar qual a melhor estratégia a ser utilizada em laboratório de reprodução humana assistida para a realização do processamento seminal, baseado na integridade funcional dos espermatozoides.

### 3.1 Aprovação do Comitê de Ética

Este estudo foi realizado no Programa de Pós-graduação em Medicina (Urologia) da Escola Paulista de Medicina (EPM)/Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unifesp (CAAE: 57.17222.0.0000.5505).

### 3.2 Indivíduos

O presente estudo incluiu trinta amostras seminais (n=30) coletadas de homens entre vinte e um e quarenta e quatro anos de idade. Os mesmos procuraram o Laboratório de Andrologia do Setor Integrado de Reprodução Humana da Disciplina de Urologia, Departamento de Cirurgia da Unifesp para investigação de infertilidade, ou se voluntariaram à pesquisa, entre o período de novembro de 2022 a setembro de 2023, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I).

Os fatores de inclusão foram homens com idade entre vinte e cinquenta anos, com amostras seminais com volume ejaculado  $\geq 1,5$  mL e concentração de espermatozoides  $\geq 9,0 \times 10^6/\text{mL}$  de sêmen. Os indivíduos incluídos neste estudo coletaram as amostras seminais em sala anexa ao Laboratório de Andrologia, por masturbação, com dois a cinco dias de abstinência ejaculatória e em recipientes de polipropileno estéreis. Os fatores de exclusão foram leucocitospermia, perda de amostra durante a coleta ou febre em um período anterior a 90 dias da coleta.

### 3.3 Desenho Experimental

Após a coleta e liquefação do sêmen, uma alíquota foi utilizada para a análise seminal, realizada no Laboratório de Andrologia da Unifesp, de acordo com as recomendações da OMS (WHO, 2021). O restante da amostra foi imediatamente encaminhado ao Laboratório de Estudos Avançados de Fertilidade (LEAF) da

Disciplina de Urologia da EPM/Unifesp, onde foi realizada a parte experimental deste estudo. Então, do volume remanescente, uma alíquota foi utilizada para avaliação da qualidade funcional dos espermatozoides da amostra a fresco, conforme descrito abaixo. O restante da amostra foi, então, dividido em duas alíquotas de mesmo volume, sendo que uma foi utilizada para a realização do processamento via gradiente de densidade descontínuo e a outra, para o processamento via microfluídica pelo método Zymot. Após o processamento seminal, os espermatozoides selecionados foram ressuspensos em meio de cultura, como detalhado abaixo, e também foram avaliados quanto à integridade funcional (Figura 1).

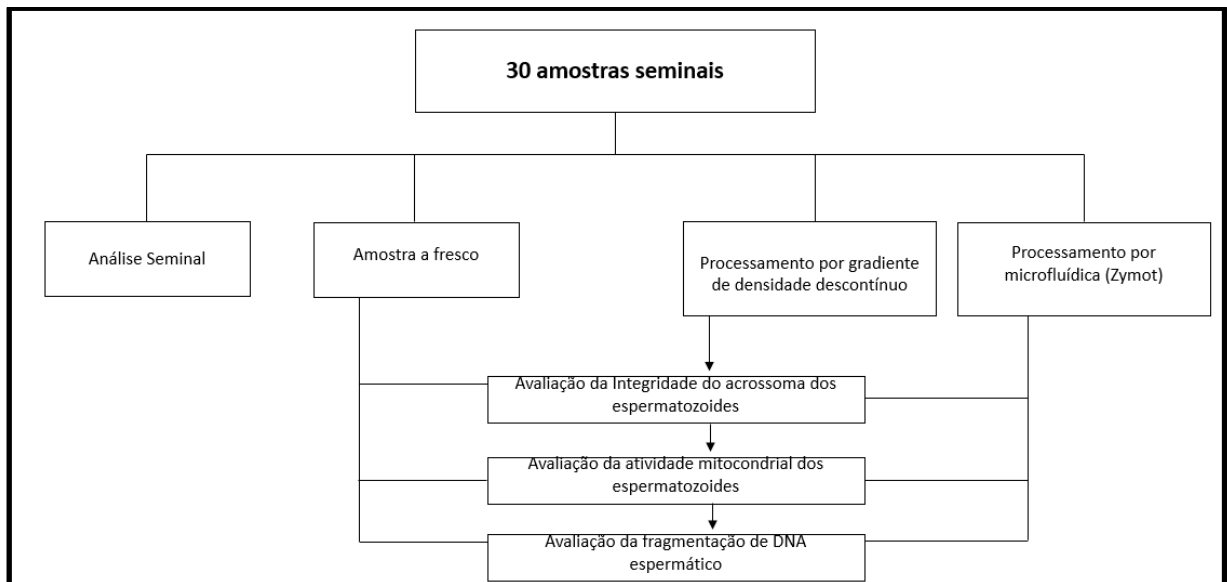


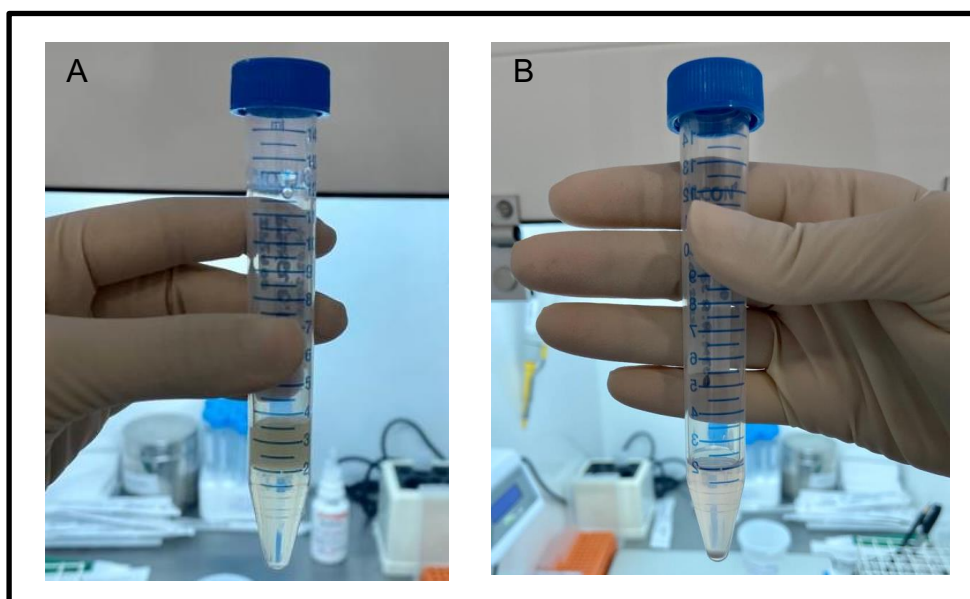
Figura 1. Fluxograma do desenho experimental do presente estudo.

### 3.4 Processamento seminal por gradiente de densidade descontínuo

Para a realização da técnica de gradiente de densidade descontínuo, 500  $\mu\text{L}$  de sêmen foram adicionados a duas camadas descontínuas (de 45 a 90%) de Percoll (GE *Healthcare*, Amersham Place, Reino Unido). Após centrifugação por dez minutos a 300 xG, os espermatozoides recuperados da camada inferior (90%) foram ressuspensos em 500  $\mu\text{L}$  de meio BWW (*Biggers Whitten Whittingan*) e, após intensa homogeneização, a amostra foi centrifugada por mais dez minutos, a 300 xG. Após a retirada do sobrenadante, o *pellet* contendo os espermatozoides viáveis foi



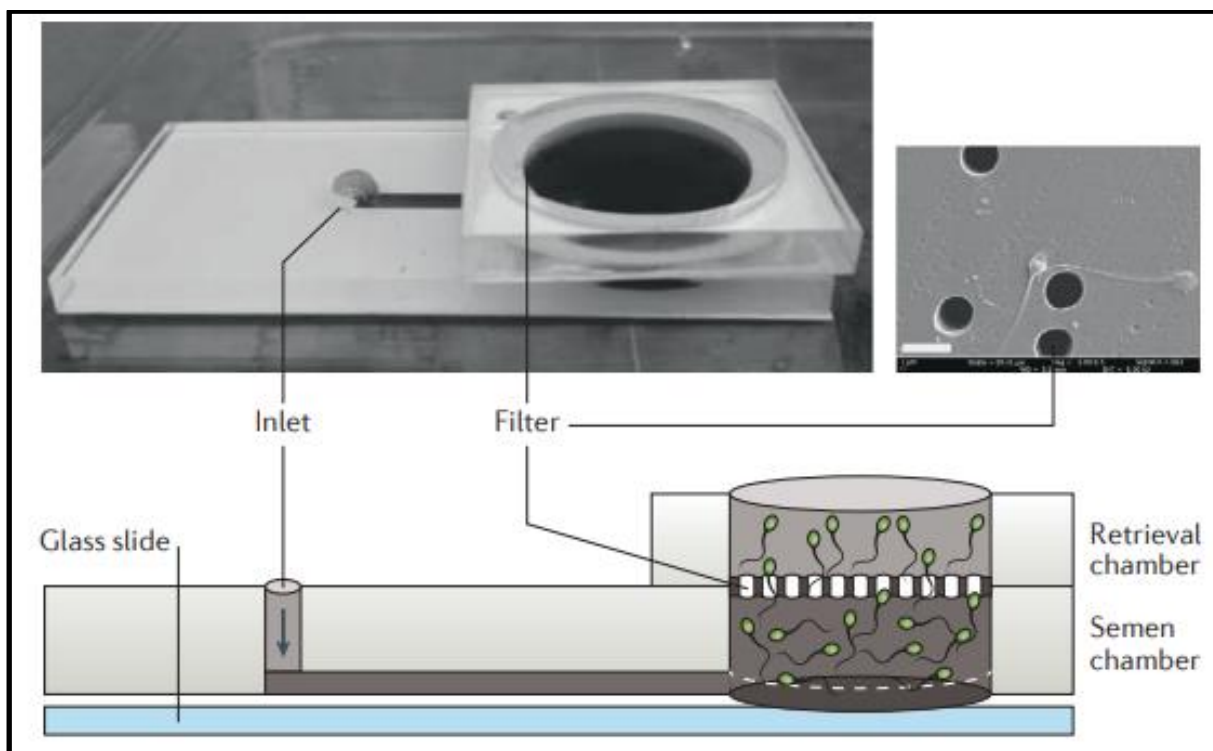
novamente ressuspensionado em 500  $\mu$ L de meio BWW e a concentração de espermatozoides recuperados foi avaliada em câmara de Neubauer (Figura 2).



**Figura 2. Realização da técnica de gradiente de densidade descontínuo. A - Sêmen adicionado a duas camadas de diferentes densidades (de 45 a 90%). B. *Pellet* contendo os espermatozoides viáveis, utilizados para a análise de sua integridade funcional.**

### **3.5 Processamento seminal por microfluídica (Zymot)**

Para a realização da microfluídica, 500  $\mu$ L de sêmen a fresco foram adicionados à porta de entrada da placa de microfluídica, a qual está conectada a uma câmara de concentração na parte inferior do *chip*. As câmaras são separadas na parte superior e inferior por um filtro microporoso de 8  $\mu$ m. A placa de microfluídica foi, então, mantida a 37 °C por 30 minutos na estufa, e, após esse tempo, os espermatozoides viáveis foram recuperados na porta de saída e depositados em um microtubo demarcado com a identificação do paciente. O volume recuperado foi ressuspensionado em 500  $\mu$ L de meio BWW e a concentração de espermatozoides recuperados foi avaliada em câmara de Neubauer (Figura 3).



**Figura 3. Processamento seminal via microfluídica para seleção espermática, utilizando o dispositivo Zymot.**

Tradução do Inglês para o Português - *Glass slide* = lâmina de vidro; *Inlet* = entrada; *Filter* = filtro; *Retrieval chamber* = câmara de recuperação; *Semen chamber* = câmara seminal.

Fonte: NOSRATI, R., *et al.*, 2017.

### 3.6 Avaliação da integridade do acrossoma dos espermatozoides

A integridade do acrossoma foi avaliada por meio da ligação da lectina PNA (*Peannut agglutinin*) (BLUMER *et al.*, 2012) a glicoproteínas presentes na membrana acrossomal externa (ROTH *et al.*, 1998). Inicialmente, foram preparados dois esfregaços com 15  $\mu$ L de sêmen em lâminas de microscopia (Perfecta, São Paulo, Brasil), as quais foram mantidas a temperatura ambiente para secarem. Então, as lâminas foram fixadas em metanol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) por quinze minutos e foram novamente mantidas a temperatura ambiente para secarem. Em seguida, essas foram recobertas com solução de coloração 60  $\mu$ g/mL de PNA (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) em PBS (137 mM NaCl [Labsynth, São Paulo, Brasil]; 2,7 mM KCl [Sigma-Aldrich]; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [Sigma-Aldrich]; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [Sigma-Aldrich]) e mantidas no escuro por trinta minutos. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas com água Milli-Q e analisadas em microscópio Olympus BX-51, com módulo

de epifluorescência e equipado com filtro de excitação de 490 nm e emissão de 520 nm (Olympus, Japão).

Duzentas células por amostra foram classificadas de acordo com a integridade acrossomal (acrossoma íntegro ou não íntegro), em magnificação de 1.000 vezes (imersão), conforme visualizado na Figura 4. A variável porcentagem de espermatozoides com acrossomas íntegros de cada tratamento foi utilizada para a análise estatística.

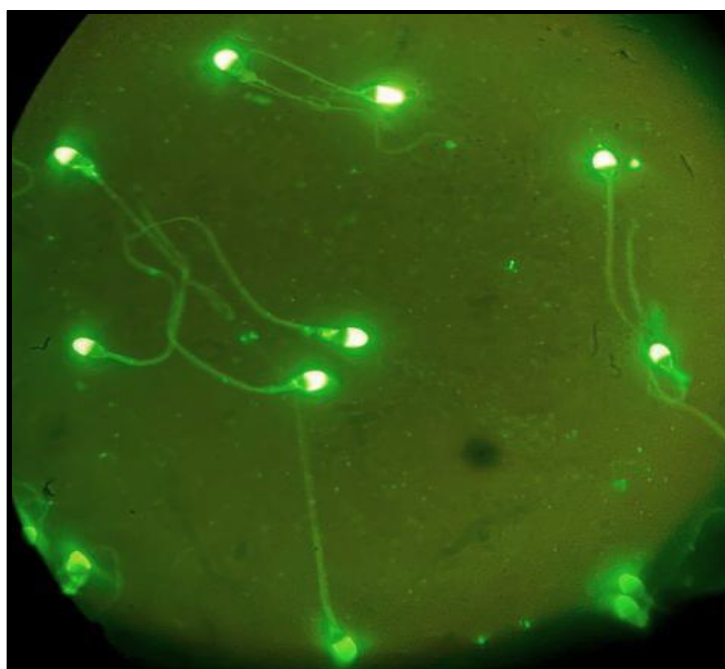


Figura 4. Espermatozoides corados com PNA para identificação dos acrossomas íntegros.

### 3.7 Avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozoides

A atividade mitocondrial foi avaliada utilizando o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (BLUMER *et al.* 2008; LACERDA *et al.*, 2011; FARIELLO *et al.*, 2012a; FARIELLO *et al.*, 2012b; RESTELLI *et al.*, 2009; FARIELLO *et. al.*, 2009; DA SILVA *et al.*, 2010). Esse teste tem como base a oxidação do DAB pelo complexo do citocromo C e na sua consequente deposição na peça intermediária do espermatozoide (HRUDKA, 1987). Para isso, uma alíquota de sêmen fresco foi diluída em uma solução 1 mg/mL de DAB (GE *Healthcare*) em PBS, em uma proporção de 1:1 a 1:5 (v:v) sêmen/corante, dependendo da concentração de espermatozoides. A

amostra foi, então, incubada por uma hora em banho-maria a 37 °C, no escuro. Após o período de incubação, foi preparado dois esfregaços de 15 µL em lâminas de microscopia (Perfecta). Depois de secas, as lâminas foram fixadas em uma solução 10% (v:v) formaldeído (Carlo Erba *Reagents*, Val de Reuil, França) em água por dez minutos e deixadas a temperatura ambiente para secarem.

Duzentas células por amostra foram analisadas em microscópio Olympus BX-51 com contraste de fase (Olympus), em magnificação de 1.000 vezes (imersão). Essas células foram classificadas em: classe I (100% da peça intermediária corada), classe II (mais de 50% da peça intermediária corada), classe III (menos de 50% da peça intermediária corada) e classe IV (ausência de coloração da peça intermediária) (HRUDKA,1987) (Figura 5). As classes I e II de cada amostra foram, então, somadas para a obtenção da variável “Alta atividade mitocondrial”, a qual foi utilizada para a análise estatística.



**Figura 5. Avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozoides pelo método de 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Classe I – 100% das mitocôndrias ativas; Classe II – Mais de 50% das mitocôndrias ativas; Classe III – Menos de 50% das mitocôndrias ativas; Classe IV (não mostrada) – Ausência de mitocôndrias ativas.**

### 3.8 Avaliação da fragmentação de DNA espermático

Primeiramente, duas lâminas (Perfecta) por amostra foram preparadas previamente com 1.000 µL de agarose *normal melting point* (NMPA) 1% (p:v) em TBE (0,1 M Tris [GE Healthcare]; 0,083 M ácido bórico [Carlo Erba Reagents]; 0,001 M Na<sub>2</sub>-EDTA [Carlo Erba Reagents]). Em cada lâmina, foram adicionados 100 µL de uma alíquota de sêmen fresco ou após processamento seminal diluído em agarose *low melting point* (LMPA) 0,75% (p:v) em TBE para uma concentração final de espermatozoides de 1x10<sup>6</sup>/mL de LMPA. As lâminas foram cobertas por lamínulas (Precision Glass Line, China) e mantidas a 4 °C para solidificar. Após dez minutos, as lamínulas foram removidas e 300 µL de LMPA foram adicionados. Então, as lâminas foram novamente cobertas por lamínulas e mantidas por dez minutos a 4 °C. Após a remoção das lamínulas, as lâminas foram cobertas com 1.000 µL de solução de lise gelada (100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; 10 mM Tris [GE Healthcare]; 2,5 M NaCl [Sigma-Aldrich]; 2% (v:v) Triton X-100 [Sigma-Aldrich]; 4 mM ditioneitol – DTT [GE Healthcare]; pH=11,0) e mantidas por uma hora a 4 °C. Em seguida, esse procedimento foi repetido e as lâminas permaneceram por mais uma hora a 4 °C. As lâminas foram, então, lavadas com água Milli-Q (2 x 5 minutos) e, em seguida, imersas em solução alcalina de eletroforese (300 mM NaOH [Carlo Erba Reagents]; 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA [Carlo Erba Reagents]; pH>13,0), por vinte minutos. A eletroforese foi realizada por vinte minutos a 1,5 V/cm e a uma intensidade de corrente máxima de 270 mA. Em seguida, as lâminas foram lavadas com TBE (2 x 3 minutos) e fixadas (3 x 2 minutos) em etanol (LabSynth). Posteriormente, as lâminas foram coradas com solução de SYBR<sup>®</sup> Green (SYBR<sup>®</sup> Green II RNA gel stain, 10.000 vezes em DMSO, Sigma-Aldrich) diluído 1:10.000 (v:v) em TBE por quarenta minutos. As lâminas foram, então, lavadas com TBE para remoção da coloração de fundo.

Um total de duzentos espermatozoides por amostra foi observado no microscópio de epifluorescência Olympus BX-51 (Olympus), com filtro de excitação de 490 nm e emissão de 520 nm, em magnificação de 400 vezes (imersão) (Figura 6). As células foram analisadas utilizando-se o *software* Komet 6.0.1 (Andor Technology, Ulster, Reino Unido). Para a análise estatística, foi utilizada a mediana da variável

*Comet tail* (porcentagem de DNA na cauda do cometa, correspondente à porcentagem de DNA fragmentado).

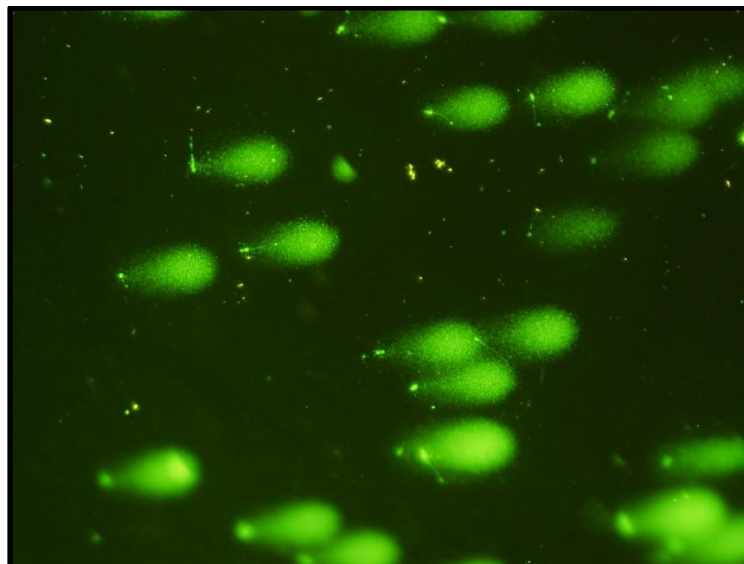


Figura 6. Avaliação da fragmentação de DNA dos espermatozoides via ensaio cometa alcalino.

### 3.9 Análise Estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o *software online* JASP (Amsterdã, Holanda, [jasp-stats.org](http://jasp-stats.org)). Para comparação das variáveis entre os tratamentos (controle - amostra a fresco x gradiente de densidade descontínuo x Zymot), primeiramente, a normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. Amostras que não apresentaram normalidade foram transformadas pela raiz quadrada ou por seu valor logarítmico. Apenas fragmentação de DNA e concentração de espermatozoides apresentaram normalidade após a transformação. Nesses casos, os dados transformados foram, então, avaliados quanto à esfericidade pelo teste de Mauchly. Fragmentação de DNA dos espermatozoides apresentou esfericidade e os tratamentos foram comparados pelo teste de ANOVA de medidas repetidas. Concentração de espermatozoides, por outro lado, não apresentou esfericidade e, por isso, os tratamentos foram comparados pelo teste de ANOVA de medidas repetidas com correção de Greenhouse-Geisser. Em ambos os casos, quando uma diferença significativa foi observada, os tratamentos foram comparados pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

Todas as outras variáveis foram comparadas pelo teste múltiplo não paramétrico de Friedman para amostras pareadas. Quando foi observada diferença significativa no teste de Friedman, os tratamentos foram comparados pelo teste *post hoc* de Conover. Para todos os casos, um erro alfa de 5% foi adotado.

## 4 RESULTADOS

---

A média de idade dos homens incluídos neste estudo foi de 29 anos, com um desvio padrão de 5,21 anos. Os dados descritivos das amostras incluídas neste estudo estão demonstrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Análise descritiva das variáveis seminais dos homens incluídos neste estudo (n=30).

	<b>Média; DP</b>
	<b>Mínimo - Máximo</b>
<b>Volume (mL)</b>	3,61; 1,7 1,5 – 8,3
<b>Concentração de espermatozoides (<math>\times 10^6/\text{mL}</math>)</b>	79,94; 59,5 9,6 – 247,5
<b>Motilidade progressiva rápida (%)</b>	12,0; 8,0 0 – 29,0
<b>Motilidade progressiva lenta (%)</b>	46,0; 10,0 2,0 – 58,0
<b>Motilidade não progressiva (%)</b>	5,0; 2,0 3,0 – 9,0
<b>Imotilidade (%)</b>	37,0; 7,0 21,0 – 51,0

DP – Desvio padrão

Após o processamento seminal, tanto por gradiente de densidade descontínuo quanto por Zymot, houve uma redução na concentração dos espermatozoides, o que é um padrão esperado, devido à função do processamento de selecionar apenas os espermatozoides viáveis. Por outro lado, não houve diferença significativa entre as amostras seminais provenientes de gradiente de densidade descontínuo e microfluídica (Tabela 2).



**Tabela 2.** Concentração espermática em amostras a fresco, após gradiente de densidade descontínuo e após microfluídica (Zymot). Os dados foram comparados entre os tratamentos por ANOVA de medidas repetidas, com correção de Greenhouse-Geisser e *post hoc* de Bonferroni.

	Fresco	Gradiente	Microfluídica	p
<b>Concentração de espermatozoides (x10<sup>6</sup>/mL)</b>	79,94; 59,5 <sup>a</sup>	10,66; 9,6 <sup>b</sup>	14,37; 14,3 <sup>b</sup>	<0,001
Média; DP	58,6 - 101,2	7,2 - 14,1	9,2 - 19,5	
IC 95%				

DP - Desvio padrão

IC – Intervalo de confiança de 95% da média

Letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Em relação à qualidade funcional dos espermatozoides recuperados, o gradiente de densidade descontínuo reduziu a porcentagem de espermatozoides com acrossomas íntegros em comparação à amostra a fresco e à amostra após o Zymot. A porcentagem de acrossomas íntegros não diferiu entre o processamento por Zymot e a amostra a fresco (Tabela 3). Ainda, o processamento por microfluídica (Zymot) selecionou mais espermatozoides com alta atividade mitocondrial quando comparado à amostra a fresco e ao gradiente de densidade descontínuo. Por outro lado, a atividade mitocondrial dos espermatozoides não diferiu entre a amostra a fresco e após o processamento por gradiente de densidade descontínuo (Tabela 3). Em relação à fragmentação do DNA dos espermatozoides, não foi observada diferença significativa entre amostras seminais a fresco, gradiente de densidade descontínuo e microfluídica (Tabela 3).

**Tabela 3.** Integridade funcional dos espermatozoides de amostras a fresco, recuperados por gradiente de densidade descontínuo e por microfluídica (Zymot). Os dados foram comparados entre os tratamentos por Teste múltiplo não paramétrico de Friedman para amostras pareadas com *post hoc* de Conover, a não ser quando descrito.

	<b>Fresco</b>	<b>Gradiente</b>	<b>Microfluídica</b>	<b>p</b>
<b>Integridade do acrossoma (%)</b> Média; DP IC 95%	79,98; 9,3 <sup>a</sup> 76,6 - 83,4	62,55; 11,7 <sup>b</sup> 58,3 - 66,8	77,05; 17,6 <sup>a</sup> 70,7 - 83,4	<0,001
<b>Alta atividade mitocondrial (%)</b> Média; DP IC 95%	63,31; 11,9 <sup>a</sup> 59,0 - 67,6	58,05; 19,3 <sup>a</sup> 51,1 - 65,0	88,68; 9,6 <sup>b</sup> 85,2 - 92,1	<0,001
<b>Fragmentação do DNA (% DNA na cauda) *</b> Média; DP IC 95%	32,21; 22,0 23,9 - 40,5	40,40; 21,6 32,3 - 48,6	37,19; 24,9 27,6 - 46,8	0,246

DP - Desvio padrão

IC – Intervalo de confiança de 95% da média

\* - Tratamentos comparados por ANOVA de medidas repetidas com *post hoc* de Bonferroni

Letras diferentes representam diferença significativa (p<0,05)

## 5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

---

De forma natural, o corpo masculino tende a selecionar os melhores espermatozoides para a fertilização do ócito. Então, para que esse processo fosse mimetizado no laboratório de forma *in vitro*, diversas técnicas de processamento seminal foram criadas para tratamentos de RHA, incluindo a microfluídica, a qual passou a ser mais utilizada recentemente (VAUGHAN & SAKKAS, 2019). Estudos demonstraram que amostras seminais processadas por gradiente de densidade descontínuo e microfluídica não diferiram em relação às taxas de fertilização. Entretanto, a utilização da separação seminal com a microfluídica teve melhores taxas de blastocisto e de gravidez clínica em comparação ao gradiente, principalmente quando realizada Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (ICSI). Ainda, foi demonstrado que o fato da amostra passar por um processo de centrifugação pode acarretar em danos no DNA espermático e, conseqüentemente, em efeitos negativos a longo prazo nas taxas de formação de embrião (ZAHA *et al.*, 2023; PASQUALOTTO *et al.*, 2000; WAGNER *et al.*, 2018; ALVAREZ *et al.*, 1987). Segundo Anderson *et al.* (2020) e Taylor *et al.* (2021), a utilização da Zymot como exemplar de processamento via microfluídica promove bons resultados em relação a taxa de euploidia quando comparado com as amostras seminais processadas via gradiente de densidade descontínuo. Apesar de ambas as técnicas apresentarem a mesma taxa de gravidez, a taxa de euploidia nos embriões formados é maior com o preparo seminal via microfluídica (Tsuji *et al.*, 2022). Em outros estudos, foi observado que houve diferença significativa tanto nas taxas de blastocistos quanto nas taxas de euploidias, sendo as melhores taxas provenientes do ciclo de microfluídica em comparação com o gradiente de densidade descontínuo (ROBLES *et al.*, 2021).

Em um estudo de Parrella *et al.* (2018a), sete casais realizaram o seu tratamento com a seleção espermática via gradiente de densidade descontínuo, resultando em taxa de fertilização de 60,4% em 5 embriões euploides, porém, posteriormente, duas gestações resultaram em aborto. Após esses ciclos, os casais passaram por nova tentativa, em sete ciclos de ICSI, porém, dessa vez, utilizando a microfluídica para seleção dos espermatozoides. Foi obtida uma taxa de fertilização

de 67,1% em 7 blastocistos euploides, resultando em 5 gestações em curso. Keating *et al.* (2021a) realizaram um estudo similar ao de Parrella *et al.* (2018a) e encontraram maiores taxas de fertilização nos casos processados com microfluídica (75,9%), em comparação com o gradiente de densidade descontínuo (58,4%). Identificaram, também, maior taxa de blastocistos euploides, de implantação e de gravidez clínica em andamento para os ciclos realizados com microfluídica. Já com o gradiente, foram obtidas apenas duas gestações clínicas, as quais resultaram em aborto gestacional. Esses dados demonstram que a microfluídica teve melhores resultados quando comparada com o gradiente (KEATING *et al.*, 2021b; KOCUR *et al.*, 2022a; PALMEROLA, 2020). Tavares *et al.* (2020) relataram em seu estudo com microfluídica melhoria nas taxas de implantação e desenvolvimento embrionário em comparação com as amostras provenientes de gradiente de densidade descontínuo para ciclos submetidos a ICSI. De acordo com Kokur *et al.* (2022b), as amostras seminais processadas via microfluídica obtiveram melhores resultados para qualidade de blastocisto, porém em relação às taxas de blastocisto e fertilização não houve diferença significativa entre os grupos de microfluídica e *swim up*.

Apesar de vários resultados terem sido obtidos em relação aos desfechos embrionários em amostras seminais selecionadas por microfluídica, poucos estudos foram realizados para avaliar a qualidade funcional dos espermatozoides selecionados por essa técnica e esses apresentam diversos vieses e falhas metodológicas. Esse conhecimento é importante, uma vez que alterações significativas na qualidade funcional dos espermatozoides estão envolvidas na infertilidade masculina (LARSEN-COOK *et al.*, 2003; CHUA *et al.*, 2023; BLUMER *et al.*, 2008).

Assim, o presente estudo analisou a diferença na integridade funcional dos espermatozoides após dois tipos de processamento seminal comumente realizados em laboratórios de RHA, sendo eles o gradiente de densidade descontínuo e a microfluídica (SAMUEL *et al.*, 2018). A hipótese deste estudo foi, portanto, que o processamento seminal por microfluídica seleciona os espermatozoides com melhor integridade funcional em comparação ao gradiente de densidade descontínuo, devido à ausência de centrifugação, demonstrando um avanço na biotecnologia na área da RHA. Essa hipótese foi testada a partir da amostra a fresco de trinta pacientes

voluntários, avaliadas em relação às variáveis seminais macroscópicas e microscópicas. Em seguida, os processamentos seminais foram realizados selecionando apenas os espermatozoides móveis e viáveis. Na terceira etapa, foram realizados os testes funcionais dos espermatozoides na amostra a fresco e após os dois processamentos: (1) Integridade do acrossoma, (2) Atividade mitocondrial e (3) Fragmentação de DNA. Os resultados mostraram que efetivamente a microfluídica seleciona espermatozoides com maior atividade mitocondrial se comparado com o gradiente de densidade descontínuo e com a amostra a fresco. Por outro lado, a integridade do acrossoma dos espermatozoides é afetada pelo gradiente de densidade descontínuo, mas não pela microfluídica. Surpreendentemente, nenhuma das técnicas de processamento seminal alterou a fragmentação do DNA dos espermatozoides.

Esse é o primeiro estudo que avaliou a integridade do acrossoma e a atividade mitocondrial dos espermatozoides recuperados por microfluídica. Vigolo *et al.* (2022) demonstraram, em amostras descongeladas de cavalos não castrados, que o Zymot também aumentou a porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro, bem como o potencial de membrana mitocondrial, além de ter aumentado a integridade e a funcionalidade da membrana plasmática. Gonzalez-Castro & Carnevale (2019) também encontraram que espermatozoides de cavalos selecionados por microfluídica, com um método diferente do Zymot, apresentam maior integridade da membrana plasmática, avaliada por ensaio hiposmótico.

Em relação à fragmentação de DNA dos espermatozoides, os resultados encontrados no presente estudo contrastam com a literatura. Os estudos citados anteriormente em cavalos demonstraram diminuição na fragmentação do DNA dos espermatozoides em comparação às amostras não processadas e ao gradiente de densidade descontínuo. Em humanos, diversos estudos também demonstraram redução na fragmentação de DNA dos espermatozoides, tanto em comparação à amostra a fresco quanto quando comparado a outras técnicas de processamento seminal (PARRELLA *et al.*, 2018b; GONZALEZ-CASTRO & CARNEVALE, 2019; TAVARES *et al.*, 2020; MORISHITA *et al.*, 2022; VIGOLO *et al.*, 2022, KOKUR *et al.*, 2022b).

Parrella *et al.* (2017) compararam o gradiente de densidade descontínuo e a microfluídica, com um dispositivo diferente do Zymot, e demonstraram que ambos os métodos reduziram a fragmentação do DNA dos espermatozoides. A técnica utilizada nesse estudo para sua avaliação foi o *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL), o qual analisa a estrutura da cromatina e detecta principalmente fragmentação de DNA causada por apoptose. Entretanto, as amostras seminais processadas via microfluídica tiveram a maior redução, inclusive em amostras utilizadas para ICSI. Por outro lado, quando comparados os processamentos via microfluídica e gradiente de densidade descontínuo + *swim up*, foi observado que ambos os processamentos melhoram a integridade do DNA espermático, avaliado por TUNEL, quando comparado à amostra a fresco, mas que essa não difere entre os processamentos (LAGUNOV *et al.*, 2020). Tavares *et al.* (2020) também encontraram menor fragmentação de DNA de espermatozoides após microfluídica em comparação ao gradiente de densidade descontínuo em ciclos de ICSI e Kocur *et al.* (2022b), em comparação ao *swim up*.

Em um estudo recente, uma análise entre três processamentos seminais foi realizada e a seleção espermática via gradiente de densidade descontínuo foi a que menos promoveu melhorias na amostra, assim como observado no presente estudo. Em relação ao *swim up*, foi observada melhoria em relação à fragmentação de DNA espermático, em comparação às amostras a fresco. Entretanto, a microfluídica foi a técnica que mais melhorou a qualidade da amostra seminal, identificando uma fragmentação de DNA dos espermatozoides mínima nas amostras processadas. O método que foi utilizado para a avaliação da fragmentação de DNA espermático foi o *Sperm Chromatin Dispersion* (SCD) pelo kit *HaloSperm*<sup>®</sup> (Halotech, Madri, Espanha), uma técnica rápida e utilizada com frequência nos laboratórios de RHA, em que há a dispersão da cromatina após desnaturação e o DNA íntegro forma um halo no entorno da cabeça dos espermatozoides (HENTHORN & ANDERSON, 2022). Outro estudo também observou menor fragmentação de DNA dos espermatozoides, avaliada por SCD, após a microfluídica, em comparação ao *swim up* (GARCIA *et al.*, 2022).

Outro método de avaliação da fragmentação do DNA dos espermatozoides que é comumente utilizado em clínicas de RHA é o *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA). Cohen *et al.* (2020) Mantravadi & Rao (2021) e Rodge *et al.* (2019)

demonstraram, utilizando esse método, que o índice de fragmentação de DNA (DFI) foi menor nas amostras processadas via microfluídica do que nas não processadas.

Quinn *et al.* (2018, 2022) contrapõem em seus artigos que, apesar de haver uma melhora na taxa de fragmentação de DNA espermático após a seleção por microfluídica, isso não se reflete em um impacto claro nos resultados clínicos. Portanto, os autores afirmam que a microfluídica tem bons resultados e que essa técnica poderia ser aplicável na rotina do laboratório de RHA, mas que a seleção de espermatozoides por microfluídica tem uma performance similar ao gradiente de densidade descontínuo nos resultados de RHA.

Apesar do presente estudo diferir da literatura e demonstrar que não há diminuição significativa na fragmentação do DNA dos espermatozoides após o Zymot, é importante ressaltar que o método de avaliação da fragmentação utilizado aqui é mais sensível do que os demais testes utilizados, devido a sua capacidade de detectar quebras de fita de DNA simples ou dupla (GARCIA *et al.*, 2022). Apesar disso, o processamento seminal via microfluídica teve vantagens, uma vez que selecionou espermatozoides com maior atividade mitocondrial, sem afetar a integridade acrossômica, resultando na utilização da microfluídica como um bom método de seleção de espermatozoides em laboratórios de RHA.

A principal limitação deste estudo deve-se ao número reduzido de amostras avaliadas. Apesar disso, esse estudo é inovador, pois a avaliação funcional dos espermatozoides não é comumente realizada em ambiente laboratorial de clínicas de RHA e na literatura. Os resultados aqui obtidos permitem um melhor entendimento sobre o efeito das técnicas de processamento seminal sobre os espermatozoides.

## 6 CONCLUSÕES

---

O processamento seminal via microfluídica permite a seleção de espermatozoides com alta atividade mitocondrial, evitando a reação/dano ao acrossoma do espermatozoide que ocorre durante a centrifugação em gradiente de densidade descontínuo. Entretanto, o gradiente de densidade descontínuo e a microfluídica não reduziram a taxa de fragmentação de DNA espermático. Apesar disso, a microfluídica mostrou-se um melhor método de seleção de espermatozoides do que o gradiente de densidade descontínuo, o qual reduziu a integridade do acrossoma dos espermatozoides.



## 7 REFERÊNCIAS

---

- AITKEN R.J., CLARKSON J. S. Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Defining the Efficacy of Sperm Preparation Techniques. **Journal of Andrology**. 1998. 9:367-376.
- ALICIA, B. *et al.* Sperm DNA Fragmentation (SDF) Was Most Effectively by Improved by a Sperm Separation Device Compared to Different Gradient and Swim-up Methods. **Fertility and Sterility**. 2019. Vol. 111, Issue 4, Suplemento E15.
- ALVAREZ, J.F., TOUCHSTONE, J.C., BLASCO, L., STOREY, B.T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **J Androl**. 1987. Vol. 8, 338 – 48 p.
- ALVES, M. B. R. *et al.* Investigando a compactação e a fragmentação não induzida do DNA espermático: refinamento da avaliação espermática – parte 1. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, 2015. V. 39, n. 2, 263-269 p.
- AMARAL A., LOURENÇO, B., MARQUES, M., RAMALHO-SANTOS, J. Mitochondria functionality and sperm quality. **Reproduction**. 2013. V. 146, 163–174 p.
- ANDERSON, A. R., KASA, E., TAYLOR, D., WILLIAMS, E., BHAKTA, S. A., BALTHAZAR, U. Euploidy rates and pregnancy outcomes using the *zymot* device for sperm preparation. **Fertility and Sterility**. 2020, V. 114(3), Suplemento, E43-E44.
- ANTONIASSI, M. P., INTASQUI, P., CAMARGO, M., ZYLBERSZTEIN, D. S., COARVALHO, V. M., CARDOZO, K. H. M., BERTOLLA, R. P. Analysis of the functional aspects and seminal plasma proteomic profile of sperm from smokers. **BJU Int**. 2016. 118:814–822.
- ARAÚJO, A. M. S. Plasma Seminal (Revisão). **PUBVET**. 2014, 8(18), Ed. 267, Art. 1775.

- ASRM, 2023. **American Society for Reproductive Medicine**. Disponível em [\(https://www.asrm.org/practice-guidance/practice-committee-documents/denitions-of-infertility/](https://www.asrm.org/practice-guidance/practice-committee-documents/denitions-of-infertility/), último acesso em 01 de junho de 2024 às 23h35).
- ASGHAR, W. *et al.* Selection of Functional Human Sperm with Higher DNA Integrity and Fewer Reactive Oxygen Species. **Adv. Healthcare Mater.** 2014.
- BARROS, B. M., SANTOS, T. F., CARVALHO, C. Infertilidade Masculina de Origem Genética: Uma Revisão Sistemática. **Rev Ciên Saúde**. Pindamonhangama, SP. 2020. 2: 20-27.
- BARTH, A.D., OKO, R.J.; Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Estados Unidos: **Iowa University Press**. 1989, 285 p.
- BEDFORD, J. M. Significance of the Need for Sperm Capacitation Before Fertilization in Eutherian Mammals. **Biol Reprod**. 1983.28:108-120.
- BLUMER, C.G., FARIELLO, R.M., RESTELLI, A.E., SPAINE, D.M., BERTOLLA, R. P., CEDENHO, A. P. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. **Fertil Steril**. 2008. 90(5):1716–22.
- BLUMER, C. G., RESTELLI A.E., GIUDICE, P. T. D., SOLER, T. B., FRAIETTA, R., NICHI, M., BERTOLLA, R.P., CEDENHO, A. P. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. **BJU Int**. 2012.109(2):259–65.
- CHUA, S. C.; YOVICH, S. J., HINCHLIFFE, P. M., YOVICH, J. L. The sperm DNA fragmentation assay with SDF level less than 15% provides a useful prediction for clinical pregnancy and live birth for women aged under 40 years. **Journal of Personalized Medicine**. 2023. Vol. 13:1079.
- ÇIL, N., KABUKÇU, C., ÇABUS, U., TURAN, T., METE, G. A. Retrospective comparison of the semen preparation techniques for intrauterine insemination: Swim-up versus gradient method. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**. 2022. Vol. 51(3).

- COHEN, M., BASTUBA, A., CAMPBELL, P. Microfluidic sperm separation device dramatically lowers DFI. **Fertility and Sterility**. 2020. Vol. 113, Issue 4, Suplemento E44.
- DA SILVA, B. F., BORRELLI, M. J., FARIELLO, R. M., RESTELLI, A. E.; DEL GIUDICE, P. T., SPAINE, D. M. *et al.* Is sperm cryopreservation an option for fertility preservation in patients with spinal cord injury-induced anejaculation? **Fertil Steril**. 2020. 94(2):564–73.
- DE JONGE, C. The Clinical value of sperm nuclear DNA assessment. **Human Fertility**. 2002. 5: 51-53.
- ESTEVEZ, S. C., AGARWAL, A. Novos Conceitos em Infertilidade Masculina. **International Braz J Urol**. 2011. 07-19 p.
- EVENSON D., WIXON, R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. **Reprod Biomed Online**. 2006. 12(4):466-72
- FARIELLO, R. M.; DEL GIUDICE, P. T.; SPAINE, D.M.; FRAIETTA, R.; BERTOLLA, R. P.; CEDENHO, A. P. Effect of leukocytospermia and processing by discontinuous density gradient on sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity. **J Assist Reprod Genet**. 2009. 26(2–3):151–7.
- FARIELLO, R. M., PARIZ, J. R., SPAINE, D. M., GOZZO, F. C., PILAU, E. J., FRAIETTA, R. *et al.* Effect of smoking on the functional aspects of sperm and seminal plasma protein profiles in patients with varicocele. **Hum Reprod Oxf Engl**. 2012a. 27(11):3140–9.
- FARIELLO, R.M., PARIZ, J. R., SPAINE, D. M., CEDENHOM A.P., BERTOLLA, R.P., FRAIETTA, R. Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. **BJU Int**. 2012b. 110(6):863–7.
- GARCIA, M.L.P., SANTOS, J.M., VILORIA, T., ORTEGA-JAEN, D., MARTIN, A., SANTOS, M.J. Microfluidic-based device selects sperm with less DNA damage and higher motility, what else? **Hybrid Annual Meeting os the ESHRE**., 2022. 3-6 p.

- GONZALEZ-CASTRO, R. A., CARNEVALE, E. M. Use of microfluidics to sort stallion for intracytoplasmic sperm injection. **Elsevier**. 2019. V. 202:1-9.
- HANCOCK, K. *et al.* Microfluidic Sperm Selection Enhances ICSI Outcomes by Selecting Spermatozoa with the Highest Chromatin Integrity. Perelman and Claudia Cohen Center for Reproductive Medicine, Weill Cornell Medicine, New York, New York, USA, 2020. (<https://zymotfertility.com/wp-content/uploads/2020/01/ESHRE-2019-Palermo-ICSI-Outcomes.pdf> último acesso em 30/01/2020).
- HARRISON, R.A.P. A highly efficient method for washing mammalian spermatozoa. **J Reprod Fertil**. 1976. V. 48:347–353.
- HENTHORN, D., ANDERSON, A. DNA fragmentation with three different preparation methods. **Fertility and Sterility**. 2022.118(5), Suplemento E27.
- HRUDKA F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **Int J Androl**.1987. 10(6):809–28.
- JOHN, J. C. S.; JOKHI, R. P.; BARRATT, C. L. R. The impact of mitochondrial genetics on male infertility. **International Journal of Andrology**. 2005. V. 28 (2):65-73.
- KASAI T. *et al.* Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. **Asian J Androl**. 2002. V.4:97–103, 2002.
- KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.A.; MAHI-BROWN, C.A.; OVERSTREET, J.W. Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. **Biology of Reproduction**. 1993. V. 48:841-845.
- KEATING D., TAVARES, D.R., ROSENWAKS, Z., PALERMO, G. D., A sperm selection technique to improve embryo ploidy. **Fertility and Sterility**. 2021a. V. 116 (3), Suplemento, p. e137,.

- KEATING D., TAVARES, D.R., ROSENWAKS, Z., PALERMO, G. D. Utilizing spermatozoa with the highest genomic integrity enhances ICSI outcome. **Fertility and Sterility**. 2021b. Vol. 116 (3), Suplemento, p. e67-e68.
- KOCUR, O. M., XIE, P., CHEUNG, S., SOUNESS, S., MCKNIGHT, M., ROSENWAKS, Z., PALERMO, G. D. Can a sperm technique improve embryo ploidy? **Andrology**. 2022a. V.11(8): 1605-1612,
- KOCUR, O. M., XIE, P., CHEUNG, S., SOUNESS, S., ROSENWAKS, Z., PALERMO, G. D. Assessing the integrity of the male gamete genome to improve ART clinical outcomes. **Human Reproduction**. 2022b. V. 37, Suplemento 1,
- LACERDA, J. I., DEL GIUDICE, P. T., DA SILVA, B. F., NICHI, M., FARIELLO, R. M.; FRAIETTA, R. *et al.* Adolescent varicocele: improved sperm function after varicocelectomy. **Fertil Steril**. 2011. 95(3): 994–9.
- LAGUNOV, A., SCHOOLCRAFT, W.B., SWAIN, J. E. Impact of commercially available sperm separation device (*zymot multi*) on sperm DNA quality compared to density gradient separation with *swim up*. **Fertility and Sterility**. 2020. Vol. 114 (3), Suplemento E139.
- LARSEN-COOK, K. L., BRANNIAN, J. D., HANSEN, K. A., KARPERSON, K. M., AAMOLD, E. T., EVENSON, D. P. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. **Fertility and Sterility**. Outubro 2003. Vol. 80(4).
- MAHADEVAN, M., BAKER, G. Assessment and preparation of semen for in vitro fertilization. In: Clinical In Vitro Fertilization Edited by: Wood C, Trounson A. **Springer-Verlag**, 1984, Berlin. 83-97p.
- MALIC, V. S., GOLOB, B., IHAN, A., KOPITAR, A. N., KOLBEZEN, M., ZORN, B.; Sperm DNA. fragmentation and mitochondrial membrane potential combined are better for predicting natural conception than standard sperm parameters. **Fertil Steril**. 2016. 105:637–644, ed. 631.

- MANTRAVADI, K., RAO, D.G. Can microfluidic sperm sorting help separation of sperms with good quality DNA? **Fertility and Sterility**. 2021. 116(3): Suplemento E287, 2021.
- MARCHETTI, P.; BALLOT, C.; JOUY, N.; THOMAS, P.; MARCHETTI, C. Influence of mitochondrial membrane potential of spermatozoa on in vitro fertilisation outcome. **Andrologia**. 2012. 44:136–141.
- MORISHITA, N., MIURA, M., KOBAYASHI, Y., MATSUNAGA, R., MAEDA, T. OCHI, M., HORIUCHI, T. Male age is associated with sperm DNA integrity: Selection of high DNA integrity sperm by microfluidics sorting is critical outcomes in older patients. **Hybrid Annual Meeting of the ESHRE**. 2022. 37: 3-6, Suplemento 1.
- MORTIMER, D., PANDYA, I. J., SAWERS, R. S. Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, 1986. 78: 93- 102.
- MORTIMER, D. In-vitro fertilization. **Human Reproduction**. 1991. 6(2):173-176.
- MORTIMER D., MORTIMER S.T. Methods of sperm preparation for assisted reproduction. **Ann Acad Med Singap**. 1992. 21(4):517–24.
- MORTIMER, D. Laboratory standards in routine clinical andrology. **Reproductive Medicine Review**, 1994. 3:97-111.
- NOSRATI, R., GRAHAM, P. J., ZHANG, B., RIORDON, J., LAGUNOV, A., HANNAM, T.G., ESCOBEDO, C., JARVI, K., SINTON, D. Microfluidics for sperm analyses and selection. **Nature Reviews Urology**. 2017. Vol. 14 (12).
- PALMEROLA, K. L. Superior sperm selection? Microfluidic sperm sorting improves euploid embryo ongoing pregnancy rate compared to density gradient centrifugation. **ASRM**, 2020.
- PAOLI, D., GALLO, M., RIZZO, F., BALDI, E., FRANCAVILLA, S., LENZI, A., LOMBARDO, F., GANDINI, L. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. **Fertil Steril**. 2011. V. 95: 2315–2319.

- PASQUALOTTO, F. F., SHARMA R. K., NELSON, D. R., THOMAS J. A. J., AGARRWAL, A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. **Fertility and sterility**. 2000. 73:459-64.
- PASQUALOTTO, F. F. Investigação e reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** 2007. 29 (2).
- PARRELLA, A., PEREIRA, N., CHOW, S., ROSENWAKS, Z., PALERMO, G. D. Selection os spermatozoa with higher chromatin integrity through a microfluidic device. **Congresso ESHRE**. 2017.
- PARRELLA, A., CHOI, D., KEATING, D., ROSENWAKS, Z., PALERMO, G.D. A microfluidic device for selecting the most progressively motile spermatozoa yields a higher rate of euploid embryos. **Fertility and Sterility**. 2018a.110(4): Supplement, e342.
- PARRELLA, A., XIE, P., KEATING, D., ROSENWAKS, Z., PALERMO, G.D., Microfluidic selection of spermatozoa retains chromatin integrity and yields higher pregnancy rates. **Fertility and Sterility**. Vol. 110, Issue 4, Suplemento, p. e343, 2018b.
- PARRELLA, A., KEATING, D., CHEUNG, S., XIE, P., STEWART, J.D., ROSENWAKS, Z., PALERMO, G.D. A treatment approach for couples with disrupted sperm DNA integrity and recurrent ART failure. **Journal of Assisted Reproductive and Genetics**. 2019. 36:2057–2066.
- PAVLOVIC, Z. J. *et. Al.* Microfluidic Sperm SOrting Vs. Density Gradiente: A Preliminary Analysis Examing EMbryo Grade And Pregnancy Outcomes In IVF-ICSI Cycles Usiring Varying Sperm Selection Methods. **Vios Fertility Institute**. 2020, Chicago. 550 p.(<https://zymotfertility.com/how-it-works>  ltimo acesso em [30/01/2020](https://zymotfertility.com/how-it-works)).
- QUINN, M.M., JALALIAN, L., RIBEIRO, S., ONA, K., DEMIRCI, U., CEDARS, M.I., ROSEN, M.P. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA

- damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. **Hum Reprod**. 2018. 33:1388–1393.
- QUINN, M.M., RIBEIRO, S., JUAREZ-HERNANDEZ, F., SIMBULAN., R.K., JALALIAN, L., CERDARS, M.I., ROSEN, M.P. Microfluidic preparation of spermatozoa for ICSI produces similar embryo quality to density-gradient centrifugation: a pragmatic randomized controlled trial. **Human Reproduction**, 2022. 37(7):1406–1413.
- RAMALHO-SANTOS, J., VARUM, S., AMARAL, S., MOTA, P.C., SOUSA, A. P., AMARAL, A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. **Hum Reprod Update**. 2009. 15:553–572.
- RESELLI, A. E., BERTOLLA, R. P., SPAINE, D. M., MIOTTO, A. J., BORRELLI, M. J., CEDENHO, A. P. Quality and functional aspects of sperm retrieved through assisted ejaculation in men with spinal cord injury. **Fertil Steril**. 2009. 91(3):819–25.
- ROBLES, A., RESHEF, E.A., PROSSER, R.W., FORMAN, E.J., WILLIAMS, Z. Does microfluid sperm sorting improve embryo development and euploidy rates in patients undergoing ICSI? **Fertility and Sterility**. 2021. 116(3), Suplemento E141.
- RODGE, D.M., VERMILYEA, M., O’LEARY, S. R., WITTMIER, S., WEN, A., RINGLER, G., BAEK, K., MARRS, R. Microfluidic sperm selection by the zymot sperm separation device concentrates sperm with significantly less DNA damage for subsequent ART procedures. **ESHRE**, 2019.
- ROTH, T. L.; WEISS, R. B.; BUFF, J. L.; BUSH, L. M.; WILDT, D. E.; BUSH, M. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). **Biol Reprod**. 1998. 58(2):475–82.
- SAMUEL, R.; FENG, H.; DESPAIN, D.; JENKINS, T.; GALE, B. Microfluidic-based sperm sorting & analysis for treatment of male infertility. **Translational Andrology and Urology**. 2018. V. 7, Supplement 3.



- SANTO, M. D. *et al.* Analysis of Sperm DNA Fragmentation and Aneuploidy in 109 Infertile Patients: Are the Two Parameters Correlated? **Imedpub Journals: Gynecology & Obstetrics Case Report**. Itália,2016. 1-5 p.
- SOHRABVAND, F. *et al.* Frequency and epidemiologic aspects of male infertility. **Acta Med Iran**. 2015.53(4):231-5.
- SOUSA, A. P. *et al.* Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. **PLoS One**. 2011, V. 6, e18112.
- ST JOHN, J., BOWLES, E.J., AMARAL, A. Sperm mitochondria and fertilisation. **Society of Reproduction and Fertility**. 2006. 65:399-416.
- TAVARES, D., WANG., J., HADDAD, M., XIE, P., KEATING, D., ROSENWAKS, Z., PALERMO, G. ICSI outcomes using spermatozoa with optimal genomic integrity. **ASRM 2020 Virtual Scientific Congress & Expo**. 2020.
- TAYLOR, T.H., PATRICK, J.L., MANNS, J.N., WHELAN III, J., CLAYBORNE, A., KATZ, S. Outcomes os oocytes ICSI'D with sperm processed with either density gradient preparation or the *zymot* preparation device; a prospective randomized study utilizing sibling oocytes. **Fertility and Sterility**. Vol. 116, Issue 3, Suplemento, E42, 2021.
- TRAVIS, A.J., FOSTER, J.A., ROSENBAUM, N.A., VISCONTI, P.E., GERTON, G.L., KOPF, G.S., MOSS, S.B. Targeting of a germ cell specific type I hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheat of murine spermatozoa. **Mol Biol Cell**. V.9, p. 263-276, 1998.
- TSUJI, H., KITASAKA, H., FUKUNAGA, N., ASADA, Y. Fertilization rate and embryonic development after intracytoplasmatic sperm injection (ICSI) using a microfluidic sperm selection device without centrifugation. **ESHRE**, 2022.
- VAUGHAN, D.A.; SAKKAS, D. Sperm selection methods in the 21st century. **Biol. Reprod**. 2019. 101:1076–1082.

- VIGOLO, V., GAUTIER, C., FALOMO, M. E., AURICH, C. Selection of frozen-thawed stallion semen by microfluidic technology. **Reproduction in Domestic Animals**. 2022. 58(3):443-443.
- WAGNER, H., CHENG, J. W., KO, E. Y. Role of reactive oxygen species in male infertility: An update review of literature. **Arab Journal of Urology**. 2018. 16:35-43.
- WANG, M.; SUN, J.; WANG, LI; GAO, X.; LU, X.; WU, Z.; WANG, Y; LIU, K.; TAO, J.; WU, Y. Assessment of density gradient centrifugation (DGC) and sperm chromatindisperson (SCD) measurements in couples with male factor infertility undergoing ICSI. **J Assist Reprod Genet**. 2014. 31:1655–1663.
- WHO (2010). Laboratory biosafety manual, 3rd ed. Geneva, World Health Organization  
(<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44261/9789241547789-por.pdf?ua=1>, último acesso em 29 janeiro 2021).
- WHO (2021). Laboratory biosafety manual, 4rd ed. Geneva, World Health Organization. (<https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311>, último acesso em 02 de junho de 2024)
- ZAHA, I.; NAGHI, P.; STEFAN, L.; BUNESCU, C.; RADU, M.; MURESAN, M. E.; SANDOR, M.; SACHELARIE, L.; HUNIADI, A. Comparative Study of Sperm Selection Techniques for Pregnancy Rates in an Unselected IVF-ICSI Population. **Journal of Personalized Medicine**. 2023. Romênia, 13:619.

**ANEXO 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unifesp**

Ao Comitê de Ensino, Pesquisa e Extensão  
Hospital São Paulo – Hospital Universitário da Unifesp

Prezados Professores,

Solicito autorização para a realização do estudo com o título Avaliação da Integridade Funcional de Espermatozoides Recuperados após Processamento Seminal por Microfluídica do(a) aluno(a) Amanda das Neves Ribeiro matriculado(a) no curso de Urologia (mestrado) da Unifesp, sob orientação do Prof. <sup>a</sup> Dra. Paula Intasqui Lopes, para obtenção do título de Mestrado.

O estudo será realizado no Laboratório de Andrologia do Setor Integrado de Reprodução Humana da Disciplina de Urologia, Departamento de Cirurgia da UNIFESP.

Declaro cumprir os requisitos da CNS 466/12 nos termos de confidencialidade e compromisso de tornar público os resultados, garantindo a citação do Hospital São Paulo – Hospital universitário da Unifesp, caso seja pertinente.

Atenciosamente,

Assinatura e Carimbo do Pesquisador Principal /Orientador

Assinatura e Carimbo do Chefe da Unidade/Setor/Ambulatório onde será realizado o estudo

Assinatura e Carimbo do Chefe da Disciplina/Departamento do estudo envolvido

De acordo:

Assinatura e Carimbo do Aluno Pesquisador

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

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título do Projeto de Pesquisa: Avaliação da Integridade Funcional de Espermatozoides Recuperados após Processamento Seminal por Microfluídica.

Pesquisador Responsável: Paula Intasqui Lopes

Local onde será realizada a pesquisa: Programa de Pós-graduação em Medicina (Urologia), UNIFESP, São Paulo.

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, da pesquisa acima especificada. O convite está sendo feito a você porque precisamos de voluntários para a realização do presente estudo. Possivelmente teremos uma melhoria nos avanços tecnológicos na área da reprodução humana assistida, podendo também apresentar uma grande melhora na qualidade da amostra seminal para os procedimentos de fertilização in-vitro. Sua contribuição é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade.

Antes de decidir se você quer participar, é importante que você entenda porquê essa pesquisa está sendo realizada, todos os procedimentos envolvidos, os possíveis benefícios, riscos e desconfortos que serão descritos e explicados abaixo.

A qualquer momento, antes, durante e depois da pesquisa, você poderá solicitar maiores esclarecimentos, recusar-se a participar ou desistir de participar. Em todos esses casos você não será prejudicado, penalizado ou responsabilizado de nenhuma forma.

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Paula Intasqui Lopes, no telefone celular (11) 3396-0600, no endereço Rua Botucatu, 740, Vila Clementino, São Paulo-SP e e-mail [paula.intasqui@unifesp.br](mailto:paula.intasqui@unifesp.br). Este estudo foi analisado por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) que é um órgão que protege o bem-estar dos participantes de pesquisas. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, visando garantir a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar dos participantes de pesquisas. Caso você tenha dúvidas e/ou perguntas sobre seus direitos como participante deste

estudo ou se estiver insatisfeito com a maneira como o estudo está sendo realizado, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo, situado na Rua Botucatu, 740, 5. andar (sala 557) CEP 04023-900, Vila Clementino, São Paulo/SP, telefones (11) 5571-1062 ou (11) 5539-7162, de segunda a sexta, das 08:00 às 13:00hs ou pelo e-mail [cep@unifesp.br](mailto:cep@unifesp.br).

Todas as informações coletadas neste estudo serão confidenciais (seu nome jamais será divulgado). Somente o pesquisador e/ou equipe de pesquisa terão conhecimento de sua identidade e nos comprometemos a mantê-la em sigilo. Os dados coletados serão utilizados apenas para esta pesquisa.

Para maiores informações sobre os direitos dos participantes de pesquisa, leia a **Cartilha dos Direitos dos Participantes de Pesquisa** elaborada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep), que está disponível para leitura no site: [http://conselho.saude.gov.br/images/comissoes/conep/img/boletins/Cartilha\\_Direitos\\_Participantes\\_de\\_Pesquisa\\_2020.pdf](http://conselho.saude.gov.br/images/comissoes/conep/img/boletins/Cartilha_Direitos_Participantes_de_Pesquisa_2020.pdf)

Após ser apresentado(a) e esclarecido(a) sobre as informações da pesquisa, no caso de aceitar fazer parte como voluntário(a), você deverá rubricar todas as páginas e assinar ao final deste documento elaborado em duas vias. Cada via também será rubricada em todas as páginas e assinada pelo pesquisador responsável, devendo uma via ficar com você, para que possa consultá-la sempre que necessário.

## **INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ PRECISA SABER SOBRE A PESQUISA**

- ✓ **Justificativa para realização da pesquisa:** O processamento seminal por *Zymot* seleciona espermatozoides com melhor integridade funcional do que o gradiente de densidade descontínuo demonstrando um avanço na biotecnologia na área da reprodução humana assistida.
- ✓ **Objetivos da pesquisa:** O objetivo deste estudo é analisar e comparar a integridade funcional dos espermatozoides processados por gradiente de densidade descontínuo e por microfluídica.
- ✓ **População da pesquisa:** Serão coletadas amostras seminais de cinquenta homens entre vinte e cinquenta anos que procurarem o Laboratório de

Andrologia do Setor Integrado de Reprodução Humana da Disciplina de Urologia, Departamento de Cirurgia da UNIFESP para investigar a infertilidade, ou como voluntários de pesquisa. Os fatores de inclusão são: homens com volume ejaculado  $\geq 1,5\text{mL}$  e concentração de espermatozoide  $\geq 20 \times 10^6/\text{mL}$  de sêmen. Os indivíduos incluídos neste estudo coletarão as amostras seminais por masturbação, com dois a cinco dias de abstinência ejaculatória e em recipientes de polipropileno estéreis.

- ✓ **Procedimentos aos quais será submetido(a):** O participante será recrutado para a pesquisa, ele deverá aceitar de forma voluntária participar e preencher o questionário com suas informações pessoais. O mesmo será levado a sala de coleta de material biológico, para que seja realizada a coleta da amostra seminal, nesse local receberá todas as instruções e materiais para a realização da coleta. O motivo desse procedimento será para a pesquisa da Avaliação da Integridade Funcional de Espermatozoides Recuperados após Processamento Seminal por Microfluídica. Um espermograma será feito como controle e outro após processamento seminal para obtermos os resultados da pesquisa, além de outros testes para avaliação da integridade do DNA espermático e após sua utilização, o material biológico será descartado.
- ✓ **Riscos em participar da pesquisa:** No presente estudo há riscos mínimos aos pacientes, tais como possível medo, desconforto e constrangimento ao realizarem a etapa de coleta seminal.
- ✓ **Benefícios em participar da pesquisa:** Os benefícios sobressaem aos possíveis riscos nesse projeto, devido as melhorias e avanços nas tecnologias que poderão ser descobertas com esse estudo. Ajudando em maior conhecimento e melhoras no procedimento de reprodução humana assistida, além de receber o resultado do estudo e sua análise seminal.
- ✓ **Privacidade e confidencialidade:** Os dados dos participantes, tais como prontuários, respostas de questionários e resultados de exames serão tratados de forma a garantir a privacidade e a confiabilidade. Os dados pessoais não serão divulgados e os dados da pesquisa a serem divulgados ou publicados não permitirão a identificação do participante.

- ✓ **Acesso a resultados parciais ou finais da pesquisa:** O participante tem o direito, caso solicite, a ter acesso aos resultados da pesquisa.
- ✓ **Custos envolvidos pela participação da pesquisa:** a participação na pesquisa não pode envolver custos ao participante, tampouco compensações financeiras. Se houver gastos, como de transporte e alimentação, eles deverão ser ressarcidos pelo pesquisador responsável.
- ✓ **Danos e indenizações:** Se ocorrer qualquer problema ou dano pessoal durante ou após os procedimentos aos quais o Sr. (Sra.) será submetido(a), lhe será garantido o direito a tratamento imediato e gratuito pelo pesquisador, não excluindo a possibilidade de indenização determinada por lei, se o dano for decorrente da pesquisa.