

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Fragmentação de DNA em espermatozoides humanos com diferentes viscosidades
no plasma seminal

Ana Paula de Souza Kussler

Orientadora: Prof. Dra. Helena von Eye Corleta

Porto Alegre, janeiro de 2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Fragmentação de DNA em espermatozoides humanos com diferentes viscosidades
no plasma seminal

Ana Paula de Souza Kussler

Orientadora: Prof. Dra. Helena von Eye Corleta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, janeiro de 2012

CIP - Catalogação na Publicação

de Souza Kussler, Ana Paula

Fragmentação de DNA em espermatozoides humanos com diferentes viscosidades no plasma seminal / Ana Paula de Souza Kussler. -- 2012.

117 f.

Orientadora: Helena von Eye Corleta.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Sêmen. 2. Espermatozoide. 3. Fragmentação do DNA. 4. Viscosidade. I. von Eye Corleta, Helena, orient. II. Título.

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar.”

William Shakespeare

Ao meu pai, exemplo de ética, respeito, e amor aos livros e a minha guerreira mãe pelo incentivo, dedicação e amor de sempre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer **a minha “pãe” Darlise e aos meus irmãos Ana Carolina e Rudy**, pelo amor, pela ajuda, pela confiança e pela paciência. E também pedir desculpas, por não ter me dedicado tanto a eles neste tempo de mestrado.

Ao meu amor **Leonardo**, por todo apoio e por estar sempre presente em todos os momentos de alegria e angústia.

Às minhas amigas amadas **Fê, Lili, Dê, Kamila, Joy**,... pelos momentos de descanso maravilhosos que vocês me propuseram e por aceitarem minha ausência quando foi necessária.

À minha querida orientadora, **professora Dra. Helena Corleta**, por ter aberto as portas e ter me acolhido como orientanda. Muito obrigada pela confiança, carinho e por ter me aceito neste grupo.

À minha grande amiga e chefe **Anita Pimentel**, por todo carinho, confiança e ajuda em todos os momentos em que precisei. Meu porto seguro na pesquisa, quem me passou todos os conhecimentos como embriologista e que espero sinceramente ter alcançado as expectativas.

Ao meu colega e amigo **Diego Alcoba**, que além da paciência, dedicação e ajuda para com este projeto, me deu o maior presente que foi a amizade, com certeza não será nessa vida que vou retribuir tudo que fez por mim.

À minha bolsista **Isabela Liu** por toda a ajuda na execução do projeto.

A **Ceres Andréia de Oliveira** por sua dedicação e ajuda fundamental com a estatística deste estudo.

Aos meus professores Ilma e Edison e as colegas e amigos do **Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular (LaGOM)** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelos momentos de alegria, amizade, ajuda e suporte nesses 2 anos de convivência, muito obrigada por terem me recebido neste grupo de pesquisa.

Ao professor **Nélson Kretzmann** pela ajuda e dedicação.

À professora **Úrsula Matte** pelo empréstimo do microscópio.

À **Gianni Curti** pela imensa paciência e por estar sempre disposta a esclarecer todas as minhas dúvidas em relação à metodologia.

À *mi eterna maestra* **Lidia Cantú**, por me ter aberto as portas da reprodução assistida e ter me feito amar esta profissão e por estar até hoje sempre disposta a me ajudar em todos os aspectos.

À professora **Jaqueline Lubianca**, por ter me dado a oportunidade de fazer o estágio docente na disciplina dela.

À **Elise Hill** por me ajudar com as imagens colocadas no artigo.

Aos médicos da clínica **Gerar** (Isa, Renato e Moretto), por todo carinho e ajuda.

Ao **Fundo de Incentivo à Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por conceder auxílio na compra dos materiais.

À **CAPES** pela bolsa de estudos, permitindo assim que eu me dedicasse ao projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: **Ciências Médicas** pela qualificação de excelência proporcionada.

Ao **Hospital de Clínicas de Porto Alegre** por seu ambiente ideal de assistência, ensino e pesquisa.

A **Deus e a Virgem Maria** por todos os momentos de proteção.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
1 Introdução	17
2 Revisão da literatura	22
2.1 Plasma Seminal e Viscosidade.....	23
2.2 Estrutura do DNA Espermático.....	30
2.3 Fragmentação do DNA Espermático	35
2.4 Fragmentação do DNA por Anomalias no Empacotamento da Cromatina	37
2.5 Fragmentação do DNA por Espécies Reativas de Oxigênio.....	39
2.6 Fragmentação do DNA por Apoptose	48
2.7 Testes para Avaliar a Fragmentação do DNA	54
2.8 Fragmentação do DNA e Parâmetros Seminais	61
2.9 Fragmentação do DNA e Resultados Reprodutivos	63
2.10 Fragmentação do DNA e Tratamentos	68
3 Justificativa.....	75
4 Objetivos	76
4.1 Objetivo principal	76
4.2 Objetivos secundários.....	76
5 Referências Bibliográficas	77
6 Artigo em inglês - FRAGMENTATION OF DNA IN HUMAN SPERM WITH DIFFERENT VISCOSITIES IN THE SEMINAL PLASMA.....	89
7 Considerações Finais.....	114
8 Anexos	115
Anexo 1- Termo de Consentimento livre e esclarecido	115

RESUMO

Introdução: Doze a 29 % dos ejaculados tem viscosidade seminal aumentada. Uma das técnicas recomendadas para diminuir a viscosidade do sêmen consiste num processo físico em que se passa o sêmen, 4 vezes, por uma seringa de 10 mL com agulha 18G. Ao fim desse processo, ter-se-ia modificado o comportamento molecular das fibrilas protéicas do esperma, tornando-o mais liquefeito, sem dano aparente a morfologia ou motilidade dos espermatozoides. Atualmente, discute-se sobre a total inocuidade desta técnica, uma vez que ela poderia provocar aumento da fragmentação do DNA dos espermatozoides. A hiperviscosidade seminal, além de reduzir a concentração e a motilidade dos espermatozoides, pode afetar a capacitação e a reação acrossômica, podendo ter implicações na integridade do DNA e no desenvolvimento embrionário normal.

Objetivo: Comparar a fragmentação do DNA de espermatozoides humanos em amostras com viscosidade diminuída, fisiológica e aumentada, e avaliar se o processo de expulsão do sêmen através da agulha e seringa altera significativamente as taxas de fragmentação do DNA dos espermatozoides. **Método:** Após a coleta e avaliação dos parâmetros seminais das amostras de sêmen, aquelas que estiverem com viscosidade aumentada passarão pelo processo de expulsão através da seringa de 10 mL com agulha 18G por 4 vezes, para diminuir a viscosidade seminal. Posteriormente, serão feitas análises da fragmentação do DNA dos espermatozoides através da técnica de TUNEL em todas as amostras. **Resultados:** A fragmentação

do DNA entre amostras com viscosidade fisiológica, diminuída e aumentada não apresentou diferença estatisticamente significativa ($P=0,857$). A fragmentação do DNA aumentou significativamente ($P=0,035$) nas amostras com viscosidade aumentada após passar na seringa e agulha quando comparadas com as mesmas amostras antes de passar pela mesma. **Conclusão:** O processo de expulsão do sêmen através de seringa e agulha visando redução da viscosidade seminal aumenta a fragmentação do DNA no espermatozoide, devendo este processo ser substituído por um processo inócuo.

PALAVRAS-CHAVE: Sêmen, espermatozoide, fragmentação do DNA, viscosidade

ABSTRACT

Background: Twelve to 29 % of the ejaculated have the semen viscosity increased. One of the techniques recommended to decrease the viscosity of semen is a physical process in which the semen passes four times through a 10mL syringe with a 18G needle. At the end of this process would have modified the molecular behavior of the protein fibrils of the sperm making it more liquefied, without apparent damage to the morphology or motility of spermatozoa. Currently, the debate is about the complete safety of this technique since it could result in increased DNA fragmentation of spermatozoa. The seminal viscosity moreover reduces the concentration and motility of sperm, can affect the capacitation and acrosome reaction which may have implications for DNA integrity and normal embryonic development. **Objective:** To compare the DNA fragmentation in human semen samples with reduced, physiological and increased viscosity and evaluate if the process of expulsion of semen through the needle and syringe significantly alter rates of sperm DNA fragmentation. **Methods:** After collecting and evaluating semen parameters of semen samples, those that are with increased viscosity will pass through the process of expulsion through the 10 mL syringe with a 18G needle four times to reduce the viscosity of semen. After that, analysis of spermatozoa DNA fragmentation through the TUNEL technique will be made in all samples. **Results:** The fragmentation of DNA between samples with physiological, reduced and

increased viscosity is not statistically significant ($P=0.857$). The DNA fragmentation increased significantly ($P=0.035$) in samples with increased viscosity after passing the syringe and needle when compared with the same samples before going through the same. **Conclusion:** The process of expulsion of semen through a syringe and needle in order to reduce the semen viscosity increases the DNA fragmentation in sperm, and this shall be replaced by a harmless process.

KEYWORDS: Semen, spermatozoa, DNA fragmentation, viscosity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Causas da fragmentação do DNA (modificado de Sakkas <i>et al.</i> 2010) (35).	35
Figura 2: Balanço do Estresse Oxidativo (modificada de Tremellen 2008) (12).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

8OHdG – 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
μmol - micromol
ART – Técnicas de Reprodução Assistida
B-HCG – Gonadotrofina Coriônica Humana
C – Celsius
CAT – Catalase
CMA3 – Cromomicina A3
CYS – Cisteína
cm – Centímetros
DFI – Índice de Fragmentação do DNA
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
DS – Fita Dupla de DNA
DTT – Ditioneitol
dUTP – Deoxiuridina Trifosfato
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
Fas – Fragmento Estimulador da Apoptose
FasL – Ligantes de Fas
FISH – Hibridização *In situ* Fluorescente
FITC – Corante Fluorescente Isotiocianato de Fluoresceína
FIV – Fertilização *In vitro*
GPX – Glutathione Peroxidase
H1 – Histona 1
H2A – Histona 2A
H2B – Histona 2B
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
H3 – Histona 3
H4 – Histona 4

His – Histidina
ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides
IIU – Inseminação Intrauterina
IL-6 – Interleucina 6
IL-8 – Interleucina 8
IMSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides Morfologicamente Seleccionados
Kb – Kilobases
KDa – Kilodaltons
MARs – Regiões de Interação da Matriz
MDA – Malondialdeído
ml – Mililitros
Mm – Milimolar
MSOME – Morfologia das Organelas dos Espermatozoides Móveis
NADPH – β -Nicotamina Adenina dinucleotídeo fosfato
NCD – Teste de Descondensação da Cromatina Nuclear
 O_2 – Dioxigênio
 $O_2^{\cdot-}$ - Ânion Superóxido
 $\cdot OH$ – Radical Hidroxila
OMS – Organização Mundial de Saúde
P1 – Protamina 1
P2 – Protamina 2
P3 – Protamina 3
P4 – Protamina 4
PB – Pares de Bases
PBS – Tampão Fosfato Salino
PSA – Antígeno Prostático Específico
 $ROO\cdot$ – Radical Peroxil
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
rSDF – Taxa de Fragmentação do DNA do Espermatozoide
SCSA – Ensaio da Estrutura da Cromatina do Espermatozoide
SCD – Teste de Dispersão da Cromatina do Espermatozoide
SDF – Fragmentação do DNA de Espermatozoides
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SOD – Superóxido Dismutase

SS – Fita Simples de DNA

TAS – Status Antioxidante Total

TdT – Terminal Deoxinucleotidil Transferase

TNP1 – Gene da Proteína de Transição 1

TNP2 – Gene da Proteína de Transição 2

TP1 – Proteína de Transição 1

TP2 – Proteína de Transição 2

TUNEL – *Terminal Deoxinucleotidil Transferase mediated dUTP Nick end labeling assay*

Zn – Zinco

Zn-T – Zinco Total

1 Introdução

As propriedades físicas do sêmen mudam radicalmente após a ejaculação. O ejaculado é inicialmente líquido, rapidamente coagula transformando-se em um material gelatinoso para então se liquefazer. A liquefação ocorre durante um período de 5 min *in vivo*, mas pode demorar 20 a 30 min *in vitro*, sendo que os fatores de coagulação derivam das vesículas seminais enquanto os fatores de liquefação provêm da próstata (1, 2).

A viscosidade do sêmen é avaliada segundo protocolo da Organização Mundial da Saúde (OMS). Aspira-se a amostra de sêmen com uma pipeta de 5 mL, permitindo assim a livre caída das gotas para observação do comprimento do filamento formado. A amostra é classificada como viscosidade aumentada quando forma-se um filamento maior que 2 cm. Outro método alternativo de avaliar a viscosidade consiste no uso de uma lâmina de vidro, onde se mergulha a ponta da mesma na amostra e, com um movimento de vaivém, observa-se a presença ou não de um aumento da viscosidade seminal (1, 3). Outros métodos mais rigorosos para avaliação da viscosidade geralmente envolvem a comparação entre a viscosidade do sêmen e da água, usando um viscosímetro de tubo capilar, onde os valores são expressos em centipoise (unidade de viscosidade), sendo este um método útil na comparação das amostras, mas fornece pouca informação quantitativa sobre as propriedades do fluxo do material (4).

A hiperviscosidade seminal ocorre em 12 a 29 % dos ejaculados. Diversas técnicas têm sido propostas para diminuir a viscosidade seminal, incluindo o tratamento enzimático com α -amilase (mais usada na reprodução assistida), α -quimiotripsina, dornase pancreática, agentes mucolíticos, diluição prévia com meio de cultura e o processo físico, no qual se faz passar o esperma, 3 a 5 vezes, por uma seringa de 5 a 10 mL (dependendo do volume espermático), com agulha de número 10 a 12 de diâmetro (18G) (5-8). No fim desse processo, ter-se-ia modificado o comportamento molecular das fibrilas protéicas desse esperma, tornando-se menos viscoso e mais liquefeito, sem dano aparente às células espermáticas no seu aspecto morfológico ou em sua motilidade, facilitando a contagem celular e a distensão (7). Atualmente, discute-se sobre a inocuidade desta técnica ao espermatozoide, ela poderia provocar o aumento da fragmentação do DNA do espermatozoide.

A hiperviscosidade do sêmen não parece ser um simples efeito mecânico (5). As moléculas responsáveis pelo comportamento reológico da hiperviscosidade podem afetar a capacitação e a reação acrossômica, pois algumas glicoproteínas de superfície, envolvidas na reação acrossômica e reconhecimento esperma-zona pelúcida não são sintetizadas pelo espermatozoide, mas são secretadas por células do trato genital masculino no líquido seminal e posteriormente incorporadas na membrana do espermatozoide (5).

As secreções da próstata e das vesículas seminais contribuem para a integridade da cromatina, onde o líquido prostático contém um cátion divalente Zn^{+2} , assim quando o espermatozoide é expelido no líquido prostático com uma elevada proporção de líquido vesicular, tem baixo teor de Zn nuclear, isso porque as

vesículas seminais secretam ligantes de Zn com alto peso molecular, reduzindo assim o teor de zinco na cromatina dos espermatozoides. A hiperviscosidade do sêmen tem sido associada à hipofunção das vesículas seminais, elevando assim a proporção de líquido prostático e conseqüentemente, aumentando o teor de zinco na cromatina dos espermatozoides, o que aumenta a estabilidade nuclear, diminuindo assim a descondensação da cromatina (9).

Há ainda o estresse oxidativo que pode ser gerado em amostras hiperviscosas devido à capacidade antioxidante ser prejudicada nas mesmas. Siciliano *et al.* (2001) observaram que uma redução da atividade da catalase e do status antioxidante total parece estar associada com hiperviscosidade seminal (10). Além disso, há ainda os níveis aumentados de MDA (malondialdeído), que consiste no produto final da peroxidação lipídica, em amostras com a viscosidade aumentada (11, 12). Este estresse oxidativo pode ter implicações profundas para a integridade do DNA e o desenvolvimento embrionário normal (5).

A etiologia do dano ao DNA do esperma é multifatorial, podendo ser devido a fatores intrínsecos, onde as principais causas são o estresse oxidativo, deficiência no empacotamento da cromatina e apoptose abortiva, ou fatores extrínsecos como drogas, tabagismo, inflamação do trato urogenital, hipertermia testicular e varicocele (4, 13).

Há vários ensaios para detecção das quebras de DNA, sendo que um dos mais utilizados consiste na técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidil transferase mediated dUTP Nick End Labeling*) a qual se baseia na incorporação de nucleotídeos (desoxiuridina biotinilada) marcados com corante fluorescente Isotiocianato de fluoresceína (FITC) na extremidade livre 3' OH, sendo uma reação

catalisada por uma enzima denominada terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) que irá polimerizar os nucleotídeos modificados nas regiões de fragmentação de DNA. A incorporação de d-UTP fluoresceína é então amplificada por várias reações enzimáticas secundárias e mensurada por citometria de fluxo ou microscópio fluorescente. Os espermatozoides examinados microscopicamente são identificados como TUNEL positivo (DNA fragmentado) devido à presença de coloração verde na cabeça do espermatozoide, determinada pela ação do corante Isotiocianato de fluoresceína, ou negativo (DNA íntegro), de acordo com a presença de coloração azul na cabeça espermática, devido à contra-coloração com o corante Hoechst 33342 (14). A vantagem consiste na detecção simultânea de quebras de fita simples e dupla (15).

Outros testes diretos para a detecção destas quebras de DNA são o ensaio COMETA e o In situ Nick translation, além de testes indiretos como o ensaio da estrutura da cromatina do espermatozoide, teste laranja de acridina, teste de descondensação da cromatina do esperma e outros menos utilizados são a medida de 8-guanosina hidroxideoxi, corante cromomicina A3, azul de tolueno e azul de anilina (16).

Geralmente, as primeiras etapas do desenvolvimento do embrião estão sob dependência das transcrições maternas e a expressão paterna, ocorre normalmente a partir da fase de 6 ± 8 células (17). O efeito paterno precoce pode ser mediado pela disfunção do centrossoma ou deficiência de fatores ativadores do oócito, por outro lado, o efeito paterno tardio pode envolver aneuploidias, danos no DNA ou empacotamento anormal da cromatina, que pode influenciar a ordenada ativação da expressão gênica paterna (18).

Devido a estes dados preocupantes sobre a fragmentação do DNA, e a escassez de informação sobre o aumento da viscosidade do sêmen, torna-se importante correlacionar a fragmentação do DNA dos espermatozoides com a viscosidade seminal e avaliar se o método mecânico de liquefação do sêmen aumenta a sua fragmentação.

2 Revisão da literatura

A infertilidade consiste na incapacidade do casal conceber após um ano de tentativas, ela permanece um problema clínico importante, com dados recentes da Europa sugerindo que um em cada quatro casais tentando conceber, enfrentam dificuldades, sendo que em 2008, o parlamento Europeu reconheceu, pela primeira vez, que a queda nas taxas de natalidade é uma causa importante do declínio da população (19-21). Atualmente a infertilidade afeta um em cada seis casais em idade reprodutiva, onde a contribuição do parceiro está emergindo como importante em muitos aspectos, sendo considerada, inclusive, uma importante questão de saúde pública. Em 20 % dos casais inférteis o problema é exclusivamente do sexo masculino, e em cerca de 30 % dos casos ele está presente associado aos fatores femininos. Embora as alterações do espermograma estejam envolvidas em metade dos casos de infertilidade, a etiologia da infertilidade masculina permanece desconhecida em até 70 % dos homens afetados (22, 23).

Atualmente, a única ferramenta aceita para estimar o potencial de um homem se tornar pai consiste no espermograma clássico como foi afirmado pela OMS, o qual avalia parâmetros como concentração, motilidade, morfologia, e vitalidade dos espermatozoides além do volume, cor, aspecto e viscosidade do sêmen (1).

As amostras com viscosidade aumentada são caracterizadas pela formação do filamento maior que 2 cm, e diversas técnicas foram estabelecidas para diminuir

a mesma, incluindo o processo físico no qual se passa o esperma, 3 a 5 vezes, por uma seringa de 5 a 10 mL (dependendo do volume espermático), com agulha de número 10 a 12 de diâmetro. Este processo facilitaria a contagem e distensão da lâmina, mas atualmente se discute a total inocuidade desta técnica (5-8).

As amostras hiperviscosas além de apresentarem concentração e motilidade diminuída, também afetam a capacitação, a reação acrossômica, a descondensação da cromatina e apresentam capacidade antioxidante prejudicada, podendo levar ao estresse oxidativo o que pode ter implicações profundas na integridade do DNA e no desenvolvimento embrionário normal (5, 9, 10).

No entanto, a patogênese e o mecanismo pelo qual a hiperviscosidade seminal é associada com a qualidade do sêmen e com o potencial de fertilização de espermatozoides ainda não são bem compreendidas (5).

2.1 Plasma Seminal e Viscosidade

Os espermatozoides humanos durante a ejaculação são suspensos no plasma seminal, o qual consiste em uma mistura heterogênea derivada do fluido testicular e epididimal e das secreções da próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais. As propriedades reológicas do sêmen mudam radicalmente após a ejaculação, onde o ejaculado primeiramente é líquido, mas rapidamente se coagula em um material gelatinoso para então se liquefazer. Esta liquefação ocorre durante um período de 5 min *in vivo*, mas pode demorar 20-30 minutos *in vitro* (4-6).

Os mecanismos bioquímicos desta coagulação e liquefação já foram estudados inúmeras vezes, concluindo-se que os fatores de coagulação derivam das vesículas seminais enquanto os fatores de liquefação provem da próstata (4).

O líquido prostático contribui com cerca de 13 a 33 % do volume total do esperma, sendo claro e levemente ácido (pH 6,5), possui alta concentração de fosfatase ácida que hidrolisa os ésteres de monofosfato orgânico, ácido cítrico que liga cátions, zinco o qual tem um papel antioxidante e antibacteriano, além do plasminogênio ativador, α -amilase e PSA (quimiotripsina) responsáveis pela lise do coágulo seminal, causando a liquefação seminal (2, 24).

A secreção das vesículas seminais corresponde a cerca de 2,0 a 2,5ml do ejaculado total, ou seja, de 46 a 80 % do volume total, sendo uma secreção gelatinosa de pH alcalino (de 7,2 a 7,6), caracterizada pela presença de frutose que é o açúcar responsável pela maior fonte de energia glicolítica utilizada pelos espermatozoides para manutenção da sua motilidade, possui também alta concentração de potássio, prostaglandinas (principalmente do grupo E), as quais são responsáveis pela indução da contração muscular e por favorecer o transporte espermático e proteínas básicas e coaguladoras as quais formam um coágulo viscoso após a ejaculação (2).

A viscosidade do sêmen consiste em um dos parâmetros avaliados pelo espermograma clássico. Segundo a OMS ela pode ser estimada, após sua liquefação, aspirando a amostra com uma pipeta de 5 mL permitindo a livre caída das gotas, observando-se a longitude do filamento formado. Em uma amostra com viscosidade normal, formam-se pequenas gotas bem definidas, enquanto uma amostra com viscosidade aumentada o filamento formado será maior que 2 cm.

Outro método alternativo consiste na introdução de uma vareta de vidro ou a ponta de uma lâmina de vidro na amostra e, com movimento de vaivém, observa-se também a longitude do filamento formado (1, 3). Há ainda, métodos de medição mais rigorosos, envolvendo a comparação entre a viscosidade do sêmen ao da água, usando um viscosímetro de tubo capilar, sendo os valores expressos em uma unidade de viscosidade denominada centipoise. Esta metodologia é útil na comparação de amostras, mas fornece pouca informação quantitativa sobre as propriedades reológicas do material, uma vez que ignora a elasticidade, tixotropia (capacidade de um gel se liquefazer à medida que lhe é aplicada uma determinada quantidade de calor ou uma força mecânica) e a natureza pseudoplástica do material (1, 4, 7).

A hiperviscosidade seminal, uma característica física que ocorre em 12-29 % dos ejaculados, dificulta a avaliação da contagem e morfologia espermática, pois os mesmos se tornam obscurecidos e também a manipulação da amostra, tal como quando usa gradiente de densidade para preparar o sêmen para tratamentos de reprodução assistida. Por este motivo, diversos métodos físicos e químicos têm sido propostos para o tratamento da amostra hiperviscosa, incluindo o tratamento com agentes mucolíticos como a solução com 4 % de α -amilase (mais usada na reprodução assistida) e esputolisina, digestão enzimática com bromalina, dornase pancreática, α -quimiotripsina, há ainda a diluição 1:1 com meio de cultura seguida de pipetagem da amostra repetidamente (1, 25). Mendeluk *et al.* (2000) mostrou uma redução da viscosidade em 44 % com tratamento com tripsina, redução de 33 % na presença de DTT (ditiotretol), 44 % com uso de α -amilase e não foram encontrados efeitos após tratamento com EDTA, DNase e com PBS indicando que o efeito da diluição não foi significativa neste experimento (6). Há também processo físico,

empregado por Amelar (1962) e preconizado pela OMS no qual se faz passar o esperma por uma seringa de 5 a 10 mL (dependendo do volume espermático) com agulha de 18G, durante 3 a 5 vezes, ao final deste processo, ter-se-ia modificado o comportamento molecular das fibrilas protéicas desse esperma, tornando-se menos viscoso e mais liquefeito, sem dano “aparente” às células espermáticas no seu aspecto morfológico ou em sua motilidade, facilitando a contagem celular e a distensão, embora seja um processo simples, rápido, eficaz e barato atualmente discute-se sua total inoquidade ao espermatozoide (6-8, 26).

As causas para esta alta viscosidade residual não são bem explicadas, mas não parece ser um simples efeito mecânico, consistindo em uma condição que pode seriamente comprometer as características físicas e químicas do fluido seminal podendo ter um impacto importante na função do espermatozoide. As amostras hiperviscosas são caracterizadas por concentração e motilidade reduzidas, prevenindo assim progressão normal do espermatozoide pelo trato genital feminino. As moléculas que são responsáveis pelo comportamento reológico da hiperviscosidade podem afetar a reação acrossômica, a capacitação, o reconhecimento espermatozoide-zona pelúcida e fusão, pois algumas das glicoproteínas da superfície do espermatozoide não são sintetizadas por esta célula em si, mas são secretadas pelas células do trato genital masculino, logo elas são transportadas pelo fluido seminal e depois incorporadas na membrana dos espermatozoides, podendo este mecanismo, pelo qual estas proteínas se movem *in vivo* ser responsável por uma proporção significativa das mudanças na superfície do espermatozoide que ocorrem durante a ejaculação (5, 6, 25).

Levando-se em conta que as secreções da próstata e das vesículas seminais contribuem para a integridade da cromatina do espermatozoide, pois o líquido

prostático contem um cátion bivalente Zn^{2+} . Assim, quando os espermatozoides são expelidos no líquido prostático com uma elevada proporção de líquido vesicular, apresentam baixo teor de zinco nuclear, isto porque as vesículas seminais secretam ligantes de Zn de alto peso molecular, o que reduz o teor de Zn na cromatina dos espermatozoides facilitando sua descondensação (5). Gonzales *et al.* (1993) relacionou hiperviscosidade a níveis normais de fosfatase ácida (marcador da próstata) e baixo teor de frutose, ou seja, hipofunção das vesículas seminais, resultando em um aumento da proporção de líquido prostático e conseqüentemente o teor de Zn disponível para a cromatina dos espermatozoides se torna aumentado, diminuindo assim o descondensamento da mesma e aumentando a instabilidade nuclear, podendo ser outro fator para a infertilidade masculina (27). Este achado vai a favor do encontrado por Gopalkrishnan *et al.* (2000) que comparou a integridade da cromatina dos espermatozoides através do Teste de Descondensação da Cromatina Nuclear (NCD) usando 1 % de SDS e 6 mM de EDTA em amostras com viscosidade normal e aumentada, relatando que 30 % das amostras do grupo controle apresentaram NCD normal contra 13 % das amostras hiperviscosas, o que foi estatisticamente significativo indicando que a viscosidade normal não indica NCD normal, mas hiperviscosidade pode indicar descondensação anormal da cromatina (9).

Por outro lado, Lzanaty *et al.* (2004) analisou a presença de frutose, α -glicosidase, PSA e zinco no plasma seminal de amostras hiperviscosas, onde a atividade da α -glicosidase, do PSA e do zinco foram significativamente menores nas amostras com viscosidade alta em comparação as amostras com viscosidade normal e ao olhar a quantidade total dos marcadores bioquímicos por ejaculado, o total de frutose foi significativamente maior nas amostras com viscosidade

aumentada. Isso indica que a hiper função das vesículas seminais consiste em um fator importante em causar a hiperviscosidade e que a diminuição da atividade do epidídimo (α -glicosidade como marcador) e/ou das concentrações dos produtos da próstata também podem contribuir para uma viscosidade anormal do ejaculado (28). Este achado também é apoiado por outro estudo que verificou que a concentração de zinco total (Zn-T) no ejaculado foi significativamente baixo em amostras com hiperviscosidade, podendo reduzir a capacidade antioxidante e reduzir seu papel protetor contra o acúmulo de metais pesados (24). Já um estudo de Siciliano *et al.* (2001) não apresentou diferenças nas concentrações de zinco e frutose seminal entre amostras com viscosidade normal e aumentada (10).

A hiperviscosidade também foi relacionada à presença de anticorpos antiespermáticos e a cultura bacteriológica positiva sendo uma das causas mais freqüentes a prostatite (7, 9). Elia *et al.* (2009) mostrou uma maior prevalência de hiperviscosidade leve no grupo de pacientes com cultura positiva do sêmen (grupo A) sendo que em todos estes a hiperviscosidade foi resolvida completamente após tratamento, já no grupo B (pacientes com mais de 1×10^6 leucócitos e/ou sinais inflamatórios observados por ecografia) e C (cultura negativa e sem sinais inflamatórios) onde apresentavam predominância de hiperviscosidade severa, em 48 % dos pacientes o tratamento foi ineficaz, concluindo que casos de hiperviscosidade suave podem resultar de infecções facilmente tratáveis e inflamação, mas hiperviscosidade severa ainda é desconhecido, parecendo ser não devido a um único fator patogênico, mas a vários fatores (bioquímicos, enzimáticos e genéticos) que agem em sinergia (25).

Em 2001, Siciliano *et al.* investigou a capacidade antioxidante enzimática e não enzimática em amostras hiperviscosas constatando que tanto as amostras

astenozoospermicas hiperviscosas, quanto as oligoastenozoospermicas hiperviscosas apresentaram uma diminuição na atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e o status antioxidante total (TAS), como SOD também estava diminuído em amostras com viscosidade normal, constatou-se que a redução da atividade da CAT e TAS parece estar associada com hiperviscosidade seminal, demonstrando pela primeira vez um grave comprometimento do sistema antioxidante de baixo e alto peso molecular no sêmen com hiperviscosidade (10). Um estudo para complementar estes achados foi feito em 2008 por Aydemir *et al.* o qual revelou através da correlação de Pearson, uma relação positiva significativa entre hiperviscosidade e os níveis de MDA (malondialdeído - produto da peroxidação lipídica) no plasma seminal e nos espermatozoides de indivíduos inférteis. Neste mesmo estudo a hiperviscosidade foi correlacionada positivamente, mas fracamente com níveis da proteína carbonil no plasma seminal e nos espermatozoides, ambos marcadores do estresse oxidativo sugerindo que a viscosidade do fluido seminal seja influenciada pelos produtos do dano oxidativo no plasma seminal (11).

Todos os achados acima comentados podem ter influência na concentração e motilidade diminuída nas amostras com viscosidade aumentada e, conseqüentemente, nas taxas de fertilização e gravidez. Como verificado por Esfandiari *et al.* (2008), foram encontradas menores taxas de fertilização após FIV em pacientes com hiperviscosidade do que no grupo controle, e, quando a hiperviscosidade foi estratificada, pacientes com hiperviscosidade grave apresentaram menores taxas de fertilização do que aqueles com hiperviscosidade moderada (17,4 vs 58,4 %, respectivamente). Este problema foi atenuado por ICSI, concluindo-se que estas menores taxas em FIV parecem ser devido a menor motilidade. As taxas de clivagem e qualidade embrionária foram semelhantes entre

os grupos, mas o β -hCG, taxa de gravidez clínica e taxa de implantação foi significativamente maior no grupo controle, já nos casais com hiperviscosidade moderada e grave, as taxas de gravidez clínica e de implantação foram comparáveis, no entanto, o número de embriões congelados foi menor em casais com hiperviscosidade grave (5). Em 2006, este mesmo autor havia feito outro trabalho comparando um grupo com viscosidade aumentada e um com viscosidade normal (controle) em ciclos de IIU revelando maiores taxas de aborto (62,5 %) nos casais com viscosidade aumentada (29).

2.2 Estrutura do DNA Espermático

A espermatogênese consiste em um processo de diferenciação, desde a espermatogônia até o espermatozoide, que ao total dura 74 dias nos homens. Seus dois principais eventos são a espermatocitogênese e a espermiogênese. A espermatocitogênese começa com a proliferação das espermatogônias por mitose, as quais originam também por mitose os espermatócitos primários, estes através da primeira divisão meiótica originam os espermatócitos secundários que ficam com metade do material genético (23 cromossomos), os espermatócitos secundários passam pela segunda divisão meiótica originando então as espermatídes. Já a espermiogênese consiste no processo de diferenciação, de transformação ou de metamorfose, de uma espermatíde redonda em espermatozoide (2).

O DNA nuclear das células somáticas se encontra acondicionado em torno de um octâmero de histonas e embalado em um nucleossomo para então ser mais enrolado em um solenóide, este tipo de empacotamento acrescenta histonas, o que aumenta o volume da cromatina. Já o núcleo das células espermáticas não

apresenta volume para este tipo de embalagem e, portanto, devem ser submetidos a um tipo diferente de empacotamento. A cromatina dos espermatozoides de mamíferos é completamente diferente da de células somáticas, ela apresenta uma estrutura única, altamente organizada, condensada e compactada, permitindo assim, a proteção do genoma paterno durante o transporte através do trato reprodutivo masculino e feminino e sua posterior entrega ao oócito em boas condições. O DNA do espermatozoide de mamíferos é o DNA eucariótico mais fortemente compactado. A estrutura da cromatina dos espermatozoides foi desenvolvida para ser extremamente resistente sob condições que poderiam prejudicar o DNA, mas ao mesmo tempo, deve ter a propriedade para rapidamente fazer o DNA estar disponível para o ooplasma (23, 30).

Primeiramente, nos espermatozoides há o nucleossoma (unidade básica da cromatina), que consiste em 146 pares de bases de DNA enroladas ao redor de um octâmetro central de histonas. Estas são proteínas nucleares básicas, ricas em arginina e lisina, ligadas ao DNA graças à interação de seus radicais amina com os radicais fosfato do DNA, são as principais proteínas nucleares do nucleossoma, incluindo duas moléculas de H2A, H2B, H3 e H4, havendo ainda uma quinta histona (H1) que protege fragmentos adicionais de DNA ligando nucleossomas vizinhos, mais especificadamente, as histonas H3 e H4 formam dois dímeros H3-H4 associados em um tetrâmero, o DNA envolve este tetrâmero, formando uma partícula tetramérica. As histonas H2A e H2B formam dois heterodímeros associados em cada lado da partícula tetramérica para formar um nucleossoma. Durante a espermiogênese, a cromatina dos espermatozoides passa por uma série de modificações, onde o primeiro acontecimento importante consiste na hiperacetilação das histonas para facilitar a desmontagem do nucleossoma. Durante

este processo o DNA sofre remodelação e concomitante ao processo de desmontagem do nucleossoma o DNA do esperma é extensivamente complexado com proteínas de transição (TPs) (2, 31, 32).

Estas proteínas de transição consistem em um grupo de proteínas ricas em arginina e lisina que por sua vez são substituídas por protaminas e sua expressão presume-se ser para regular mudanças na cromatina ocorridas como parte do processo de condensação. As principais TPs são TP1 e TP2, ambas codificadas por cópias únicas dos genes Tnp1 e Tnp2 respectivamente. A TP1 consiste em uma proteína de 6,2 kDa com numerosos aminoácidos básicos como arginina e lisina mas não cisteína, e apresenta uma importante propriedade de desestabilizar o DNA. A TP2 apresenta o tamanho de 13kDa e contém resíduos básicos de prolina, serina, arginina, lisina e cisteína e seu gene (Tnp2) está intimamente ligado aos dois genes da protamina (31).

Ao final da espermiogênese estas proteínas de transição são substituídas por protaminas, as quais são as proteínas nucleares mais abundantes no espermatozoide. Sem esquecer que nem todo o DNA no núcleo do esperma se encontra organizado em uma estrutura de nucleoprotamina, pois algumas regiões da cromatina retêm um pouco do seu conteúdo original de histonas, levando a estrutura do nucleossoma menos compactado, ficando o DNA na cromatina do esperma humano dividida em uma fração de nucleohistona e uma fração de nucleoprotamina, com 15 % do DNA vinculado a histonas e 85 % do DNA vinculado a protaminas. (23, 30, 32)

Estas são proteínas com aproximadamente metade do tamanho das histonas (5-8 kDa) e com alto conteúdo de aminoácidos com carga positiva (arginina e

cisteína), principalmente a arginina que consiste ser o componente predominante (48 % em protaminas humanas), esta arginina traz a abundância de carga positiva dos grupos NH_3^+ (amina) para as protaminas, estes grupos neutralizam as cargas negativas dos grupos fosfatos da cadeia do DNA e, assim, permitem um alto grau de compactação das fibras adjacentes da cromatina. As fitas do DNA dos espermatozoides maduros são fortemente enroladas em torno das moléculas de protamina (cerca de 50kb por protamina), formando um toróide, o qual é ainda mais compactado e estabilizado, pelas pontes dissulfeto entre as protaminas, desse modo, comprimindo o DNA do esperma em um sexto do volume ocupado pelo núcleo das células somáticas. Estas pontes dissulfeto são formadas através da oxidação dos grupos tióis dos resíduos de cisteína das protaminas, quando ocorre a conversão das pontes $-\text{SH}$ para $-\text{S-S}-$ após a passagem dos espermatozoides da cabeça a cauda do epidídimo (23, 30, 32).

No núcleo espermático, a cromatina está organizada em domínios “loop” que estão ligados a cada 20-120kb de comprimento a uma estrutura protéica denominada matriz nuclear, esta matriz organiza a cromatina em “loops” funcionais do DNA que ajudam a regular a replicação do DNA e transcrição de genes. Esta estrutura de domínio “loop” está presente em toda a cromatina de espermatozoides e há evidências, de que cada protamina toroidal contém um único domínio loop de DNA e, entre cada protamina toroidal, está um segmento de cromatina sensível a nucleases, que consiste no local de ligação do DNA denominado região de interação da matriz (MARs) (33).

Há dois tipos de protaminas conhecidas como protamina P1 e a família P2. A protamina P1 se encontra presente em todas as espécies de mamíferos, é sintetizada como uma proteína madura e forma o componente principal do DNA do

espermatozoide ligado a protaminas. As protaminas P2 se encontram presentes somente em algumas espécies de mamíferos como homem, camundongo e garanhão e os componentes desta família são gerados por proteólise de um precursor codificado por um único gene. Esta protamina P2 é formada pelos componentes P2, P3 e P4, que diferem somente pela extensão N-terminal de 1-4 resíduos, embora o componente P2 é o mais abundante. Sob condições normais, o espermatozoide humano fértil e saudável expressa P1 e P2 em quantidades quase idênticas (relação P1/P2 de aproximadamente 1), apesar disto, suas funções podem diferir: 1º) ao contrário da P1, as protaminas P2 são proteínas dedo de zinco com um motivo Cys2-His2; 2º) como já comentado as P2 são expressas somente em alguns mamíferos, enquanto P1 invariavelmente se encontra em todos os mamíferos, indicando uma função mais básica e conservada para P1 e uma função acessória para P2; e, 3º) alterações nas protaminas P1 e P2 em pacientes inférteis impacta diferentemente na integridade do DNA (15, 30-32, 34).

Durante este processo de protaminação, a remodelação da cromatina se torna facilitada pela atividade das nucleases endógenas como a enzima Topoisomerase II, a qual introduz cortes transitórios na dupla fita do DNA, permitindo a passagem de uma dupla fita através de outra e vedando-a subsequentemente. Estes cortes temporários no DNA do espermatozoide servem para aliviar o estresse torsional, resultante do super enrolamento e são normalmente reparados, por esta mesma enzima, antes de completar a espermiogênese e a ejaculação, no estágio de espermátide. Caso estes cortes não sejam reparados, o DNA espermático fragmentado pode estar presente no ejaculado (16, 23).

2.3 Fragmentação do DNA Espermático

A integridade total do DNA do espermatozoide geralmente define-se como a ausência de cortes no DNA ou quebras de fita simples (ss), quebras de fita dupla (ds) e modificações químicas do DNA e desempenha um papel fundamental na manutenção do potencial reprodutivo humano. Sendo inclusive salientado, que o chamado efeito paterno na incapacidade de conceber basicamente é atribuível a anomalias na organização da cromatina do espermatozoide. Dentre as quebras, as ds são as mais mutagênicas, pois no estágio de prónucleo no zigoto, os dois genomas são separados e por isso, informações do molde (*template*) de DNA para reparação livre de erros das quebras ds está ausente (15, 16).

Os danos ao DNA do espermatozoide podem ocorrer dentro dos testículos, epidídimo ou ejaculado e sua etiologia é de origem multifatorial, como mostrado na figura 1 (35), podendo ser devido a fatores extrínsecos e intrínsecos (13, 35, 36).

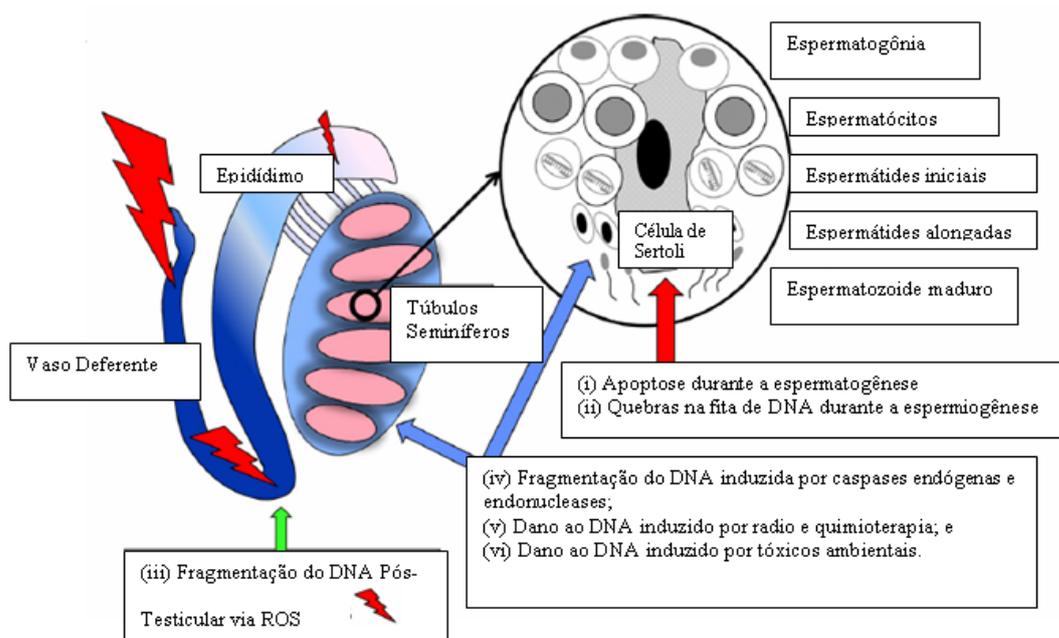


Figura 1: Causas da fragmentação do DNA (modificado de Sakkas *et al.* 2010) (35).

Uma grande variedade de exposições a agentes físicos como radiação e calor, ou a produtos químicos, incluindo drogas terapêuticas como quimioterápicos e tóxicos ambientais, como pesticidas, metais, componentes do fumo ou de poluentes atmosféricos podem atingir as células germinativas masculinas, há ainda as condições fisiopatológicas, inflamação do trato genital, câncer e varicocele. Pelo menos algumas destas exposições, atingem diretamente o DNA, enquanto outras induzem o estresse oxidativo, formando adutos de DNA (pedaço de DNA covalentemente ligado a um produto químico) e danos no DNA (23, 37).

A idade consiste em outro fator importante como relatado em 2007 por Vagnini *et al.* que dividiu os homens em 3 grupos de idade (grupo I: ≤ 35 anos, grupo II: 36-39 anos e grupo III: ≥ 40 anos) e visualizou que a fragmentação do DNA avaliado por TUNEL foi significativamente menor no grupo I do que no II e III, não havendo diferenças entre o grupo II e o grupo III, concluindo que a fragmentação do DNA aumenta com a idade (38). Este estudo permanece controverso, Nijs *et al.* (2011), não verificaram correlação entre a idade, concentração, motilidade e fragmentação do DNA espermático. Também encontraram diferença estatisticamente significativa de qualquer idade com potencial de fertilização (FIV ou ICSI), gravidez e taxa de bebês em casa (39). Mesmo causas iatrogênicas como a criopreservação de espermatozoides tem sido associada a danos no DNA, como verificado por Thomson *et al.* (2009), que relataram aumento da fragmentação do DNA nas amostras criopreservadas, indicando que a via predominante deste aumento consiste no estresse oxidativo (40). Outro trabalho apoiando esta teoria encontrou um aumento estatisticamente significativo nos níveis de fragmentação do DNA após o descongelamento das amostras (de $16,9 \% \pm 14,3 \%$ em amostras cruas para $30,4 \% \pm 15,6 \%$), sendo que em 30 dos 70 casos analisados (42,8 %) o valor da

fragmentação do DNA aumentou de um nível normal para um anormal (41). Os mecanismos moleculares exatos pelos quais essas condições acima danificam o DNA do esperma e/ou alteram a cromatina, não são completamente compreendidos, entretanto atualmente há três principais teorias: 1) anomalias no empacotamento da cromatina, 2) espécies reativas de oxigênio (ROS) e 3) apoptose (23).

2.4 Fragmentação do DNA por Anomalias no Empacotamento da Cromatina

Conforme relatado acima, a remodelação da cromatina é facilitada pelo afrouxamento da cromatina, coordenado pela hiperacetilação das histonas e pela ativação da enzima topoisomerase II que introduz cortes temporários na dupla fita, que são normalmente reparados por esta mesma enzima. A persistência destes cortes endógenos indica anomalias na espermatogênese e um processo de maturação incompleta durante a espermiogênese, mostrado pelas mudanças na expressão da DNA topoisomerase II e nos padrões de localização os quais são consistentes com o envolvimento desta enzima na mediação das modificações do DNA e na alteração da cromatina durante a espermatogênese (23, 35, 42).

Homens inférteis têm aumento na proporção de histonas para protaminas, quando comparados com controles férteis, esta proporção alterada, que consiste em empacotamento anormal da cromatina, aumenta a susceptibilidade do DNA do espermatozoide ao estresse externo, devido à menor compactação da cromatina. Além disso, a deficiência completa da protamina tem sido demonstrada em cerca de 5-15 % dos homens inférteis (13, 43). Um estudo conduzido por Nasr-Esfahani *et al.* em 2005 destacou a ligação entre a deficiência de protamina (medida pela positividade da cromomicina A3-CMA3) e danos ao DNA do espermatozoide, onde a

baixa protaminação que resultou em menor taxa de fertilização por ICSI (44). Outro trabalho recente de Tarozzi *et al.* (2009), comparou protaminação por cromomicina A3 (CMA3), fragmentação do DNA por TUNEL, capacidade antioxidante e resultado de reprodução assistida, onde apresentou uma relação altamente positiva entre CMA3 e fragmentação do DNA. Em FIV houve uma correlação negativa significativa entre a taxa de fertilização e positividade CMA3 (baixa protaminação), não havendo gestações no grupo de FIV com alta positividade de CMA3, já em ICSI a baixa protaminação não afetou a taxa de fertilização, houve também correlação negativa entre baixa protaminação e capacidade antioxidante do plasma seminal concluindo-se que uma consequência potencial da baixa protaminação pode ser a maior susceptibilidade ao dano no DNA (45).

Outro trabalho realizado por Tavalae, Razari e Nasr-Esfahani (2009), mostrou correlação significativa entre positividade CMA3 (baixa protaminação), fragmentação do DNA, morfologia espermática anormal e taxa de fertilização tanto em FIV quanto em ICSI, quando foi comparado os dados entre pacientes com alta ou baixa positividade CMA3 (ponto de corte de 40 %), além da morfologia e da taxa de fertilização, a qualidade dos embriões transferidos também foi significativamente diferente entre os grupos. Outro achado importante encontrado foi a correlação negativa entre fragmentação e metilação global do DNA, mas entre metilação, fertilização e positividade CMA3 não houve correlação significativa e por isso, os autores salientaram que os processos de metilação e protaminação são fenômenos diferentes, um ocorrendo antes e outro durante a espermiogênese (46).

Além da diminuição na protaminação, outro ponto importante é a relação entre P1/P2, onde a ideal é igual a 1. Recentemente Garcia-Peiro *et al.* (2011) compararam a relação P1/P2, a fragmentação do DNA (SDF) e a taxa de

fragmentação do DNA (rSDF- medida entre dois pontos de tempo consecutivos) que foi avaliada nas amostras a 37°C no tempo 0, 8 e 24 horas após o descongelamento entre 3 grupos patológicos (genoma reorganizado, varicocele clínica e varicocele subclínica) e um grupo controle, relatando que entre os 3 grupos patológicos não houve diferenças significativas na relação P1/P2, embora no grupo de varicocele clínica esta proporção foi maior, foi achado também que nos grupos de pacientes exibindo patologias a proporção P1/P2 e a fragmentação do DNA foi maior quando comparado com o grupo controle. Correlacionou-se ainda, a proporção de P1/P2 a fragmentação do DNA (SDF) no tempo 0 e uma correlação mais forte foi detectada entre a proporção de P1/P2 e fragmentação do DNA (rSDF) em 8 horas, concluindo-se que quando a proporção P1/P2 se encontra alterada, a fragmentação do DNA também se torna aumentada, indicando que qualquer desequilíbrio na proporção P1/P2, pode deixar o espermatozoide mais suscetível a estressores (34).

2.5 Fragmentação do DNA por Espécies Reativas de Oxigênio

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produtos do metabolismo celular normal, pois a maior parte da energia do corpo é produzida pela reação enzimática controlada de oxigênio com hidrogênio. Na fosforilação oxidativa, que ocorre na mitocôndria, existe a redução enzimática do oxigênio para produzir energia, formando os radicais livres. Um radical livre é definido como uma molécula de oxigênio contendo um ou mais elétrons desemparelhados em orbitais atômicos ou moleculares. Como exemplo, a adição de um elétron para o di-oxigênio (O_2), forma o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que consiste na principal forma de ROS, já este ânion pode ser direta ou indiretamente convertido em ROS secundário, como radical hidroxila ($\cdot OH$), radical peroxil (ROO^{\cdot}) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Há ainda,

uma sub-classe de radicais livres derivados do nitrogênio, que inclui óxido nítrico, peroxinitrito, ânion nitrosil e ácido peroxinitroso. Embora o termo ROS e radicais livres são usados como sinônimos, torna-se importante frisar que nem todas as ROS são radicais livres, um exemplo consiste no peróxido de hidrogênio que é uma ROS mas não um radical livre, já que não contem elétrons desemparelhados (12, 15, 36).

Quantidades baixas de radicais livres no espermatozoide desempenham um papel importante no funcionamento normal da célula espermática, pois o peróxido de hidrogênio estimula a reação acrossômica, a capacitação, a hiperativação do espermatozoide e a fusão no oócito, ajudando no trânsito do espermatozoide através do cópulo e zona pelúcida e também causando a fosforilação da tirosina, que aumenta a ligação da membrana do espermatozoide à proteína ZP3. No entanto, quando uma quantidade excessiva de ROS é produzida, oprimindo o sistema antioxidante, ou quando ocorre a diminuição destes agentes antioxidantes do plasma seminal e do aparelho reprodutor masculino acaba gerando o estresse oxidativo, causando danos às células, pois os radicais livres como procuram participar de reações químicas para isentá-las de seus elétrons desemparelhados, resultam na oxidação dos lipídios das membranas, aminoácidos em proteínas e hidratos de carbono nos ácidos nucleicos (12, 15, 23).

O corpo humano desenvolveu várias estratégias antioxidantes para se proteger de danos ROS, permitindo assim que o metabolismo oxidativo normal ocorra sem danificar as células, enquanto ainda permite a resposta celular normal mediada por ROS, como a destruição de agentes infecciosos e sinalização intracelular. O plasma seminal e os espermatozoides em si são bem dotados com uma série de protetores antioxidantes. O superóxido dismutase (SOD) (presente em espermatozoides e no plasma seminal) e a catalase são antioxidantes enzimáticos

que inativam o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, convertendo-os em água e oxigênio, o último membro da tríade antioxidante enzimática é a glutathione peroxidase (GPX) a qual provem de uma família de antioxidantes (GPX 1-5) que estão envolvidos na redução de hidroperóxidos usando glutathione como doadora de elétrons. Os GPXs estão localizados dentro dos testículos, próstata, vesículas seminais, canal deferente, epidídimo, plasma seminal e nos espermatozoides e desempenham um papel importante de proteção contra o ataque oxidativo, como mostrado quando foi realizada a exclusão de GPX5 em camundongos que provocou um estado de estresse oxidativo que influenciou a incidência de aborto e defeitos de nascimento (12, 47).

Já os antioxidantes não enzimáticos de massa molecular baixa presentes no sêmen incluem o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathione, aminoácidos (taurina e hipotaurina), albumina, carnitina, carotenóides, flavonóides, ácido úrico e protasomos. Estes agentes atuam, principalmente, neutralizando diretamente a atividade dos radicais livres ativados quimicamente, mas também eles podem fornecer proteção por dois outros mecanismos: a albumina pode interceptar os radicais livres, tornando-se oxidada em si, poupando dessa forma o espermatozoide e alternativamente, organelas extracelulares (prostasomos) secretadas pela próstata podem fundir-se com leucócitos dentro do sêmen e reduzir sua produção de radicais livres. A capacidade antioxidante do plasma seminal e a forte compactação da cromatina dos espermatozoides são os únicos mecanismos de defesa das células germinativas masculinas contra os radicais livres (12, 47).

Artigos tem mostrado a importância do sistema antioxidante como o trabalho (já comentando) de Tarozzi *et al.* (2009), que relacionou, fragmentação do DNA, estado de protaminação e capacidade antioxidante, onde foi encontrada uma

correlação negativa entre baixa protaminação (avaliada por cromomicina A3) e a capacidade antioxidante do plasma seminal, concluindo-se que além da baixa protaminação levar ao aumento da susceptibilidade ao dano no DNA, a atividade defeituosa do sistema antioxidante está envolvida na alteração do empacotamento da cromatina durante a espermatogênese (45). Outro trabalho, realizado por Muratori *et al.* em 2003, onde 2 mM de mercaptosuccinato foi utilizado (tratamento em 4 e 24 horas) para inibir a atividade de GPX, mostrou aumento no desenvolvimento da fragmentação do DNA em ambos os tempos, ressalta-se ainda que as amostras utilizadas foram selecionadas por *swim up*, permitindo desta maneira excluir os contaminantes, concluindo-se assim que além de ROS estar envolvido no fenômeno de fragmentação do DNA, eles derivam dos espermatozoides (48).

Interessantemente, em 2009 Navarrete Gomez *et al.* realizaram um estudo para determinar se explantes tubários humanos ou o fluido tubário exercem efeito protetor contra ROS, seus resultados preliminares foram que explantes tubários diminuiriam a fragmentação do DNA do espermatozoide durante a incubação a 37°C, enquanto fluido tubário não provocou efeito, outro achado foi que o fluido tubário impede a fragmentação do DNA do espermatozoide induzida por leucócitos ativados por forbol-12-miristato-13-acetato, enquanto explantes tubários não provocaram efeito, concluindo-se que isso pode estar relacionado a um possível efeito antioxidante das células das trompas que neutralizaria ROS produzidos por espermatozoides, enquanto a falta de efeito protetor de explantes tubários sobre a fragmentação do DNA induzida por leucócitos ativados, pode estar relacionada a danos celulares tubários induzidos por ROS produzidos por leucócitos, o que pode inativar as defesas antioxidantes enzimáticas nestas células (49).

Dentro do sêmen existem duas fontes principais de produção de radicais livres: os leucócitos e o espermatozoide. A grande maioria das amostras de sêmen contem leucócitos, sendo neutrófilo o tipo predominante, estas células desempenham um importante papel na imunovigilância e remoção fagocitária de espermatozoides anormais e como a produção de ROS consiste em um dos principais mecanismos pelos quais os neutrófilos destroem os patógenos, não é de se estranhar, portanto, que estas células têm o potencial de causar estresse oxidativo, principalmente os leucócitos ativados (mecanismo que opera quando há inflamação no tecido), recrutados e ativados por interleucinas (IL-6 e IL-8). Os leucócitos ativados são capazes de produzir cem vezes mais ROS do que os leucócitos inativos e ainda possuem a capacidade de produzir mil vezes mais ROS que espermatozoides (12, 15).

Um trabalho feito em 2010 por Henkel *et al.* demonstrou que pacientes que não apresentaram leucocitospermia apresentaram tendência de menor deficiência de protamina (avaliado por cromomicina A3), também foi mostrado que leucocitospermia não apresentou qualquer efeito na motilidade espermática, fragmentação do DNA e produção de ROS mas, quando o ponto de corte para os leucócitos foi reduzido (de 1×10^6 para $0,5 \times 10^6$), então houve uma correlação entre espermatozoides CMA3 positivos e presença de leucócitos seminais, foi achado ainda uma significativa correlação positiva entre condensação pobre da cromatina (positividade CMA3) e produção de ROS pelos espermatozoides, sugerindo então que o dano ao DNA deve ser atribuído a uma ação direta de leucócitos e ROS, ao invés de uma influência indireta pela condensação perturbada da cromatina e que aparentemente o estresse oxidativo causado por leucócitos e pelas próprias células espermáticas também pode levar a condensação perturbada da cromatina (50).

A capacidade dos espermatozoides de produzir ROS está inversamente correlacionada com o seu estado de maturação, pois durante a espermatogênese, há uma perda de citoplasma para permitir que o espermatozoide tenha sua forma condensada e alongada. As células espermáticas imaturas teratozoospermicas, as quais não completaram a extrusão do citoplasma, são caracterizadas pela presença de excesso de resíduos citoplasmáticos na peça intermediária. Estes resíduos são ricos em enzimas citoplasmáticas como ácido láctico desidrogenase, creatina quinase e a glicose-6-fosfato-desidrogenase, sendo esta última uma enzima que controla a taxa de fluxo de glicose e produção intracelular de β -nicotamina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) através do desvio da hexose monofosfato. A NADPH é usada como combustível para a geração de ROS via NADPH oxidase localizada na membrana de espermatozoides e a presença de uma NADPH oxidase cálcio dependente chamada NOX5 foi confirmada no espermatozoide. Como resultado, o espermatozoide teratozoospermico produz maiores quantidades de ROS comparado com o morfologicamente normal (12, 16).

Há ainda outras fontes de ROS como criopreservação e centrifugação da amostra, estilo de vida, infecções, exposição ambiental entre outros, como mostrado na figura 2 (12). Para apoiar esta teoria, Aitken *et al.* (2010) fizeram um trabalho correlacionando dano oxidativo, medido pela formação de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8OHdG) com métodos de preparação do sêmen e a relação do dano oxidativo e com viabilidade celular, além de relacionar fragmentação do DNA com dano oxidativo. Os pesquisadores encontraram que em suspensões de espermatozoides não fracionados houve relação entre fragmentação do DNA e 8OHdG sugerindo que uma proporção significativa dos danos no DNA vistos nestas células são oxidativamente induzidos. A vitalidade foi correlacionada com

fragmentação do DNA, mas não com 8OHdG, já a centrifugação por gradiente Percoll® e Puresperm® melhorou a porcentagem de células móveis e viáveis, quando a população inteira de espermatozoides foi considerada, essa melhora na motilidade e vitalidade refletiu na diminuição de células com fragmentação do DNA, mas a porcentagem de células 8OHdG permaneceu inalterada. Curiosamente, quando apenas as células viáveis foram consideradas, fracionamento com Percoll® aumentou a porcentagem de células positivas 8OHdG, resultando na população de pacientes, um aumento significativo na fragmentação do DNA, sugerindo um impacto estimulante da centrifugação com Percoll® e Puresperm® na formação de 8OHdG. Importante ressaltar que neste estudo, para retirar o viés da centrifugação, amostras não fracionadas também foram centrifugadas pelo mesmo tempo. Foi proposto então, que são as forças de cisalhamento geradas na superfície do esperma através da submissão a centrifugação através de gradiente de densidade que aciona a geração de radicais livres e dano oxidativo ao DNA (51).

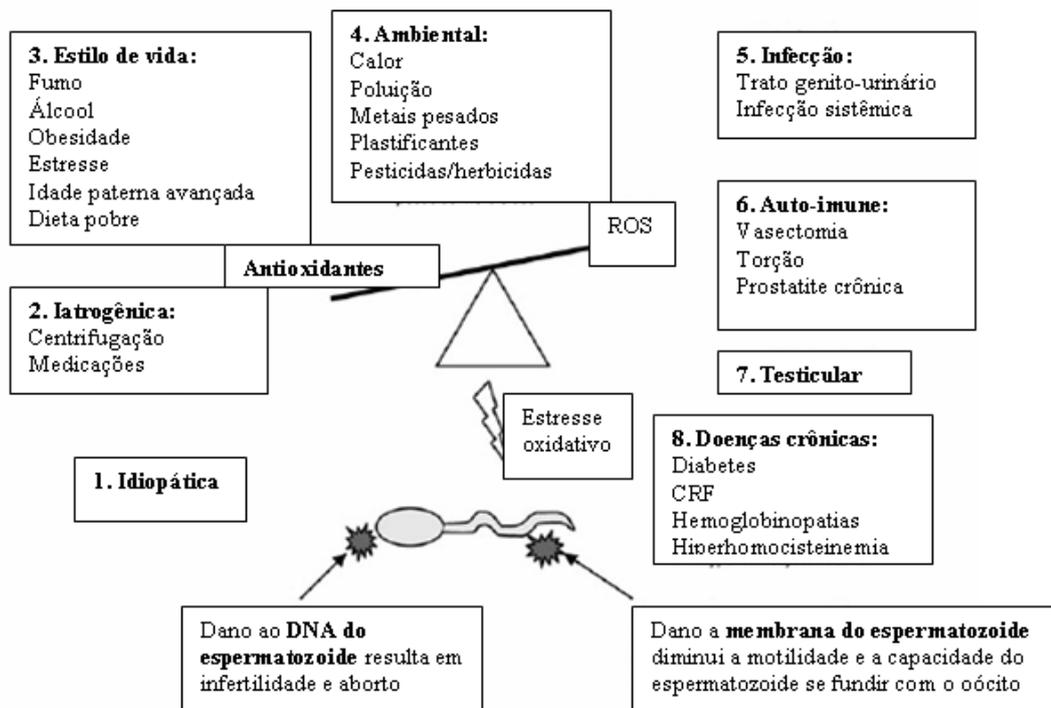


Figura 2: Balanço do Estresse Oxidativo (modificada de Tremellen 2008) (12).

Aproximadamente 25-40 % dos pacientes inférteis tem sêmen com alto nível de ROS e estresse oxidativo. A susceptibilidade dos espermatozoides ao ataque por radicais livres decorre da presença de alvos para este ataque, a abundância de ácidos graxos poliinsaturados na membrana plasmática destas células. Estes ácidos graxos são necessários para a fluidez na membrana, exigidas para a motilidade e para os eventos de fusão da membrana associados com a fertilização, particularmente exocitose acrossomal e fusão com o oolema. No espermatozoide humano, 50 % do ácido graxo, corresponde ao ácido docosa-hexaenóico, com seis ligações duplas por molécula, como ácidos graxos altamente insaturados são particularmente propensos ao ataque oxidativo, pois a natureza conjugada das ligações duplas facilita os processos como abstração de hidrogênio, o qual inicia a

cascata de peroxidação lipídica. Este último pode também ser promovido pela presença de metais de transição como o ferro e o cobre (presentes no plasma seminal), que pode variar seu estado de valência, ganhando ou perdendo elétrons. Estes metais podem promover a capacidade de ROS atacar outro substrato importante, o DNA presente no núcleo e nas mitocôndrias. No DNA nuclear, os radicais livres ligam-se em reações de abstração de hidrogênio com a unidade ribose e induzindo a formação de adutos nas bases do DNA, desestabilizando a estrutura do DNA e pode resultar na formação de quebras nas fitas simples e dupla do DNA. ROS ainda pode gerar primeiramente a diminuição da fluidez na membrana, diminuição na motilidade espermática, redução da capacidade fecundante, recombinação aberrante, modificação de bases, produção de lugares livres de bases, deleções, deslocamento do quadro de leitura, *crosslink*, rearranjos cromossômicos, empacotamento defeituoso e um aumento de ROS pode mudar a estrutura terciária e a expressão de proteínas, proteínas receptoras de membrana e proteínas de transporte de membrana, resultando na perturbação do equilíbrio iônico (15, 52).

Tunc e Tremellen em 2009 investigaram a possível ligação entre fragmentação do DNA relacionada ao estresse oxidativo, metilação do DNA do esperma e homocisteína sérica (a via folato-homocisteína é responsável pela geração de doadores de metila). Não foi encontrada correlação entre homocisteína sérica e metilação do DNA, mas, um aumento estatisticamente significativo da fragmentação do DNA (medida por TUNEL) e produção de ROS (medida pelo teste nitrozul de tetrazólio) no grupo de pacientes inférteis quando comparado ao grupo controle, e uma correlação negativa entre fragmentação do DNA e metilação do DNA. Uma correlação negativa semelhante foi encontrada entre a metilação do DNA

e produção de ROS, juntamente com uma correlação positiva entre fragmentação do DNA e ROS, sugerindo que o dano oxidativo ao DNA do espermatozoide é pelo menos em parte, responsável pela hipometilação global do DNA do esperma (53).

Gil-Villa *et al.* (2010), interessadamente ao realizar um trabalho para verificar diferenças entre casais com abortos recorrentes e a população em geral, encontraram nos homens provenientes dos casais com aborto recorrente, alterações na concentração, motilidade, morfologia bem como maior produção de TBARs (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), o qual consiste em um marcador de peroxidação lipídica e menor capacidade antioxidante do plasma seminal. Concluindo que neste estudo os agentes antioxidantes apresentaram impacto sobre os parâmetros seminais, mas não no núcleo da célula, permitindo que o oócito seja fertilizado, mas possivelmente os componentes celulares do espermatozoide foram alterados e como resultado o produto da fertilização não foi capaz de se desenvolver (54).

2.6 Fragmentação do DNA por Apoptose

A apoptose definida como morte celular programada, é baseada em um mecanismo genético que induz a uma série de alterações celulares, morfológicas e bioquímicas, levando a célula ao suicídio. Ela ocorre em condições fisiológicas, como no desenvolvimento embrionário normal para permitir a forma definitiva de tecidos e ao longo da vida para descartar as células que são inúteis ou potencialmente perigosas como, células velhas, infectadas, danificadas ou mutantes. Durante a apoptose as células sofrem modificações características na forma, sendo o encolhimento a característica morfológica mais importante e por isso este processo

foi originalmente conhecido como “necrose de encolhimento”, e sua característica bioquímica mais importante consiste na ativação de endonucleases Cálcio/Magnésico dependentes, que quebram o DNA de maneira específica em unidades nucleosomais de cerca de 185 pb (55).

Mas outras características celulares típicas da apoptose são as seguintes: condensação da cromatina, alargamento mitocondrial, núcleos fragmentados, irregulares ou alargados, cromatina fragmentada ou marginada, citoplasma com organelas agregadas e mudanças irregulares na membrana plasmática. A apoptose então é caracterizada por uma variedade de mudanças, resultando no reconhecimento especial e fagocitose de células apoptóticas, estas células são tomadas rapidamente e degradadas por células fagocíticas vizinhas, antes de seu conteúdo intracelular vazar para o espaço extracelular, este processo de remoção denomina-se eferocitose. As células mortas que passam para as etapas finais de apoptose mostram moléculas fagocíticas, como a fosfatidilserina, em sua superfície celular. Esta fosfatidilserina, normalmente é encontrada na superfície citosólica da membrana plasmática, mas durante a apoptose é redistribuída para a superfície extracelular por uma hipotética proteína conhecida como *scramblase*. Estas moléculas marcam a célula para a fagocitose. Células que possuem receptores adequados, como os macrófagos, reconhecem o fagócito e reorganiza seu citoesqueleto para fagocitar a célula. A remoção destas células ocorre de forma ordenada, sem induzir uma resposta inflamatória (43, 55-57).

A apoptose é regulada principalmente pela ativação de cisteína proteases chamadas caspases, as quais clivam com alta especificidade no lado carboxila dos resíduos aspartato. Elas são proteases cisteinil-aspartato-específicas produzidas como zimógenos inativos, tem de um domínio NH₂ terminal, uma subunidade

pequena de 10 kDa e uma subunidade grande de 20 kDa. As caspases iniciadoras incluem as caspases 2, 8, 9 e 10, as quais ativam as caspases efetoras 3, 6 e 7. A caspase 3 é considerada a mais importante das caspases efetoras, pois ela que decide o destino da célula na cascata da apoptose, onde a célula não pode ser revertida de volta ao estado normal, portanto, sua ativação marca o “ponto de não retorno” na apoptose (43, 56).

Os receptores de morte de superfície celular como receptor 1 de fator de necrose tumoral e a proteína de superfície celular Fas (proteína de membrana do tipo I denominada fragmento estimulador da apoptose), são ativados por ligante, que no caso de Fas é o Fas ligante (FasL) resultando na ativação proteolítica das caspases, na destruição das proteínas vitais e finalmente na morte celular. As proteínas de choque térmico, o supressor de tumor p53, o fator nuclear kappa B e a família de proteínas Bcl-2 (Bcl-x, Bcl-w, Bak, BID, Bad e Bax) também tem se mostrado reguladores de apoptose. Como exemplo, a proteína Bax, uma pró-proteína de membrana mitocondrial é capaz de abrir os poros de transição de permeabilidade mitocondrial resultando no inchaço mitocondrial e a liberação do citocromo c, que uma vez liberado no citoplasma, leva a ativação das caspases, que, por sua vez, ativam endonucleases específicas (exemplo a DNase), resultando na fragmentação do DNA (40, 42, 43, 56).

Nos testículos, a apoptose pode ser postulada para ter duas funções durante a espermatogênese, primeiramente às células germinativas se expandem clonalmente por muitas rodadas de mitoses antes de sofrer os passos de diferenciação que resultam em espermatozoides maduros. Esta expansão clonal é excessiva e exige um mecanismo para controlar o número de células germinativas que as células de Sertoli têm capacidade de suportar, portanto, a apoptose controla

a superprodução de gametas masculinos e restringe nos níveis normais de proliferação de modo que eles não superem a capacidade de suporte das células de Sertoli. O outro papel consiste na redução seletiva de espermatozoides anormais. A apoptose de células germinativas testiculares, que afeta principalmente as espermatogônias e espermatócitos, ocorre normalmente e continuamente ao longo da vida, onde aproximadamente 50-60 % de todas as células germinativas que entram em meiose I sofrem apoptose, sendo fagocitadas e eliminadas pelas células de Sertoli (31, 35, 42, 43).

Sabe-se que no estado normal, as células de Sertoli podem iniciar e regular a apoptose das células germinativas conduzidas pelo sistema Fas, expressando os ligantes de Fas (FasL), sinalizando a morte de células germinativas Fas positiva e que em homens com parâmetros seminais normais, a porcentagem de espermatozoides Fas positivos é menor que 10 %, mas em homens com parâmetros do sêmen reduzidos esta porcentagem pode ser alta como 50 %. Vários estudos descobriram que outros marcadores apoptóticos como Bcl-x, p53, fosfatidilserina e caspases também estão presentes no ejaculado humano e mostram relações distintas com parâmetros anormais do sêmen. Postula-se então, que os espermatozoides em homens sub-férteis que foram destinados a apoptose, escapam deste processo, não ocorrendo a retenção correta dos espermatozoides através de apoptose. Portanto a produção de espermatozoides ejaculados que possuem marcadores apoptóticos indicam que em alguns homens com parâmetros seminais anormais, uma “apoptose abortiva” ocorreu. O resultado final consiste na produção de espermatozoides que possuem uma série de anomalias como retenção citoplasmática, empacotamento anormal da cromatina e quebras na fita de DNA e

estes espermatozoides anormais podem ser mais suscetíveis a fatores ambientais e ao ataque oxidativo (42, 43, 56).

O fracasso na limpeza destes espermatozoides pode ser devido ao mau funcionamento em vários níveis, primeiro pode ser postulado que em homens oligozoospermicos, em que a espermatogênese é reduzida, não podem ser produzidos espermatozoides suficientes para desencadear a ação de síntese de FasL das células de Sertoli. Outro problema seria na ativação de apoptose mediada por Fas, podendo ser inerente a um paciente em particular ou pode ser devido a falta de sincronização entre a apoptose e a espermatogênese, caso em que, apesar da apoptose ser iniciada, o espermatozoide vai passar pela espermiogênese e não terminar a apoptose (42).

Há vários fatores que podem levar a indução de apoptose em espermatozoides humanos como a alta concentração de ROS que oprimem a célula levando a mesma a apoptose, infecções por *Mycoplasma* e *Clamídia*, doenças como câncer de testículo e linfoma de Hodking (56). Há ainda a criopreservação que foi associada com a ativação das caspases 3, 8 e 9 e com aumento da translocação de fosfatidilserina, Thomson *et al.* (2009) relataram aumento na fragmentação do DNA, danos nas bases oxidativas e ativação das caspases, no processo de criopreservação, embora nas amostras frescas a porcentagem de fragmentação do DNA foi altamente correlacionada positivamente com a porcentagem de células exibindo caspases ativadas, após a criopreservação estes dois parâmetros foram efetivamente correlacionados negativamente. Descobriu-se também que a adição de um inibidor da caspase ao meio crioprotetor não apresentou efeito sobre a motilidade e vitalidade pós descongelamento, mas também era incapaz de reduzir o montante dos prejuízos sofridos pelo DNA durante a criopreservação. Os autores

concluíram que provavelmente, a ativação de caspases e o processo de apoptose não são responsáveis pelo aumento dos danos ao DNA durante a criopreservação e que a via predominante é a de ROS (40).

O trabalho feito por Gandini *et al.* em 2000, comparou amostras seminais a fresco (grupo A1), espermatozoides após *swim-up* (grupo A2), pacientes inférteis com oligoastenozoospermia (grupo B), portadores de doença de Hodking (grupo C1) e pacientes com seminoma e câncer testicular (grupo C2) empregando a técnica TUNEL e microscopia eletrônica. Foi demonstrado um aumento estatisticamente significativo nos valores percentuais de apoptose nos espermatozoides dos grupos B, C1 e C2 quando comparado ao grupo A1, a porcentagem de apoptose nos grupos C1 e C2 em comparação com o grupo B, não foi estatisticamente significativa. A microscopia eletrônica mostrou padrões de apoptose característicos em um numero maior de espermatozoides nos grupos B, C1 e C2 em comparação com o grupo controle A. As características apoptóticas foram núcleos irregulares, alargados ou fragmentados, a cromatina estava parcialmente interrompida pela presença de vacúolos nucleares, em alguns casos apareceu periférica, perto do envelope nuclear ou em um padrão de condensação incompleta, envelope nuclear irregular ou alargado, produção excessiva de membrana na região pós acrossomal, acrossoma ondulado, vazio, ampliado ou ausente, mitocôndrias escassas, a gota citoplasmática estava condensada e ocupada por lisossomos autofágicos e a membrana plasmática irregular, com evaginações ou endocitada formando inúmeras vesículas, entre outras alterações (55).

Outro estudo realizado por Sakkas *et al.* (2002), investigou a relação entre dano ao DNA e marcadores apoptóticos (Fas, Bcl-x e p53) em homens com parâmetros de sêmen normais e anormais. Foi achado que as amostras de sêmen

que apresentavam concentração e morfologia pobres eram mais propensas a apresentar níveis elevados de positividade TUNEL (fragmentação do DNA e expressão Fas e p53, já Bcl-x não apresentou relação com concentração, motilidade ou morfologia). Verificou-se uma correlação negativa entre positividade Fas, p53 e TUNEL e concentração de motilidade dos espermatozoides, confirmando que homens com parâmetros seminais anormais têm maiores níveis de expressão de Fas, em seus espermatozoides ejaculados, mas quando foi avaliada se a expressão de TUNEL era evidente nas mesmas amostras que tinham a expressão alta de Fas ou Bcl-x, não se encontrou relação estrita, concluindo-se que os danos ao DNA não mostram necessariamente marcadores apoptóticos distintos (58).

Interessantemente, um estudo que investigou o impacto da idade na expressão de biomarcadores de apoptose (translocação da fosfatidilserina) em ejaculados de homens saudáveis constatou que a porcentagem de espermatozoides vivos com translocação de fosfatidilserina foram significativamente maiores com o avançar da idade e embora tenha havido uma tendência para aumento dos níveis de fragmentação do DNA com o avançar da idade, estes resultados não foram estatisticamente significativos. A distribuição dos dados de apoptose e da fragmentação do DNA demonstraram um “break” natural com a aproximação dos 40 anos de idade, que parece representar um limite do impacto significativo da idade (59).

2.7 Testes para Avaliar a Fragmentação do DNA

Há duas décadas o manual da OMS preconiza que o espermograma clássico consista (seja a) na única ferramenta para estimar o potencial de um homem se

tornar pai. No entanto, o valor preditivo das medidas realizadas no espermograma são difíceis de determinar devido a sua natureza subjetiva, alta variabilidade intra e inter observador e a inerente heterogeneidade do sêmen humano. Embora estas análises possam descrever aspectos importantes das funções dos testículos e espermatozoides, elas não abordam a integridade do material genético do gameta masculino. Concomitante a isto, cerca de 15 % dos casais com fator de infertilidade masculina apresentam um espermograma normal, apontando claramente para a necessidade de marcadores com maior acurácia para predizer a chance de uma gravidez bem sucedida, quer através da concepção natural ou pela reprodução assistida (21-23, 36).

Nos últimos anos, o avanço rápido da biologia molecular, tem levado ao desenvolvimento de numerosas técnicas para avaliar vários aspectos do DNA e da qualidade da cromatina. Os testes são divididos em diretos, os quais medem os danos reais, ou seja, o dano indicado por ensaios que não submetam a condições que irão induzir danos e os testes indiretos os quais medem os danos potenciais, pois os espermatozoides são submetidos a condições de desnaturação. Entre os ensaios diretos estão TUNEL, ensaio cometa neutro e o In situ Nick translation, e entre o indiretos estão o cometa alcalino, ensaio da estrutura da cromatina do esperma (SCSA) e Teste de dispersão da cromatina do esperma (SCD) (36).

O ensaio cometa, também chamado de ensaio de eletroforese em gel de célula única, é uma técnica muito sensível para detectar danos diretos ao DNA e mede a resposta em células individuais. As células são colocadas em gel de agarose e tratadas para destruir a membrana plasmática e nuclear e digerir as proteínas, um campo eletroforético é então aplicado para causar a migração do DNA danificado através da agarose, as células são então coradas com corantes

fluorescentes ligados ao DNA e analisadas com software específico. Os pequenos fragmentos de DNA, fita simples ou dupla (DNA de baixo peso molecular), irão migrar mais rápido durante a eletroforese - dando a característica da cauda cometa - e os segmentos de DNA intactos, com alto peso molecular, não irão migrar - permanecerão na cabeça do cometa. O software analisa o comprimento da cauda, a intensidade da mesma e a densidade da cabeça. O ensaio cometa é classificado como neutro ou alcalino, dependendo do tipo de dano que está sendo investigado. O ensaio cometa alcalino, desnatura o DNA, identificando tanto quebras de fita simples como de fita dupla, além dos locais álcali lábeis. Os fragmentos álcali lábeis são abundantes em espermatozoides, o que diminui a sensibilidade do ensaio, pois podem levar a superestimação de quebras verdadeiras do DNA. Já o ensaio cometa neutro não desnatura o DNA, detecta somente quebras de fita dupla, sendo muito mais sensível para identificar danos ao DNA relacionados à infertilidade. As vantagens desta técnica são a necessidade de um número pequeno de células e sua sensibilidade, no entanto apresenta desvantagens como ser trabalhosa, requerer software específico, não ser padronizada e pode identificar quebras sem importância (13, 15, 16, 23).

A técnica de TUNEL, *Terminal Deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick end labeling assay*, se baseia na incorporação de nucleotídeos dUTP (deoxiuridina trifosfato) marcados com o corante fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC) na região livre 3' OH em quebras de fita simples e dupla para criar um sinal que aumenta com o número de quebras do DNA. Essa reação é catalisada pela enzima terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) que polimeriza os nucleotídeos modificados nas regiões de fragmentação do DNA. A incorporação de dUTP é então amplificada por várias reações enzimáticas secundárias e mensurada

por citometria de fluxo ou microscópio de fluorescência (15). Os espermatozoides examinados microscopicamente são identificados como TUNEL positivo (DNA fragmentado) devido à presença de coloração verde na cabeça do espermatozoide, determinada pela ação do corante isotiocianato de fluoresceína, ou negativo (DNA íntegro), de acordo com a presença de coloração azul na cabeça espermática, devido à contra-coloração com o corante Hoechst 33342. A técnica de TUNEL pode detectar simultaneamente quebras de fita simples e dupla e sua popularidade é justificada pela boa qualidade dos parâmetros de controle, como uma baixa variabilidade intra e inter observador, além de ter uma boa estabilidade ao longo do tempo. Devido a sua especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade, esta técnica é amplamente utilizada para avaliar a fragmentação do DNA do esperma e seu valor como um indicador de fertilidade masculina e como prognóstico em ciclos de reprodução assistida tem sido demonstrado (13, 16).

Este teste, entretanto, apresenta algumas limitações e desvantagens, pois, o grau de dano ao DNA dentro da célula não pode ser quantificado, revelando somente o número de células dentro de uma população com dano ao DNA, pela observação ser visual, a coloração do fundo diminui a eficiência do ensaio, não há limiares padronizados e o protocolo do ensaio é variável. O teste ainda é caro e demorado (13, 16).

Muratori *et al.* (2000) acharam uma correlação linear positiva entre citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, ou seja, a taxa da população com DNA fragmentado foi correspondida por ambas as técnicas (60). Já Dominguez-Fandos *et al.* em 2007 embora tenham achado uma correlação boa entre as duas técnicas, a média de resultados por citômetro de fluxo foi 2,6 vezes maior que a obtida por microscópio (39,7 % ± 23,1 % versus 15,3 ± 10,3 % respectivamente) (61).

Sergerie *et al.* (2005) avaliaram variações no grau de fragmentação do DNA durante um período de 6 meses entre doadores férteis e pacientes, demonstrando que em doadores a média da fragmentação do DNA foi de 13,18 % com variação intra indivíduo pequena (3,79 %) em comparação com a variação entre indivíduos (17,56 %), já em pacientes a média da fragmentação do DNA foi de 22,44 % com variação intra indivíduo de 4,43 % e entre indivíduos de 29,48 %. Os autores concluíram que a fragmentação de DNA dentro do mesmo paciente é estável, indicando que o ensaio TUNEL pode fornecer uma medida de referência de qualidade do sêmen de um indivíduo (62).

Outro teste com tanta importância quanto os acima referidos é o SCSA (ensaio da estrutura da cromatina do esperma) baseado na premissa de que o DNA do esperma com estrutura da cromatina anormal é mais propenso a desnaturação por ácido ou calor. Usando as propriedades metacromáticas da laranja de acridina, o SCSA mede a susceptibilidade do DNA do espermatozoide a desnaturação *in situ* induzida por ácido ou calor, ao quantificar essa mudança metacromática de verde (quando o corante é associado ao DNA normal) para vermelho (associado com DNA desnaturado) após o tratamento com ácido ou calor, por citômetro de fluxo, o grau de desnaturação do DNA é determinado. O SCSA precisamente estima a porcentagem de dano na cromatina do esperma expressado como DFI (índice de fragmentação do DNA), com um ponto de corte de 30 % para diferenciar amostras férteis de inférteis. O problema desta técnica é que exige equipamentos caros e não proporciona muita informação sobre a extensão do dano ao DNA (23, 31).

Um teste relativamente novo é o ensaio de dispersão da cromatina do esperma (SCD), que analisa a fragmentação do DNA de forma simples, barata e rápida. Neste teste, os espermatozoides, são imersos em uma matriz de agarose em

uma lâmina, tratadas com uma solução ácida para desnaturar e depois tratadas com um tampão de lise para remover as membranas plasmáticas e proteínas, os núcleos deproteinizados dos espermatozoides com DNA não fragmentado mostram halos estendidos de dispersão do DNA, enquanto os espermatozoides que produzem um halo muito pequeno ou não apresentam halo, apresentam DNA fragmentado, como monitorado por microscópio fluorescente ou de luz. Seu ponto de corte também é 30 % e sua desvantagem é que não apresenta informações sobre a extensão do dano ao DNA, pois a quantificação da porcentagem de espermatozoides com núcleos dispersos ou não dispersos é subjetiva (23, 31).

Existem outros testes menos utilizados como o In situ Nick translation (forma modificada de TUNEL, que utiliza uma enzima modelo dependente), a coloração laranja de acridina (método simplificado de SCSA que depende de interpretação visual) e a detecção das quebras de DNA por FISH. Atualmente há ainda testes que avaliam os adutos de DNA como o marcador oxidativo 8-OHdG, a cromomicina A3 que avalia protaminação e anexina V (anticoagulante) que se liga preferencialmente aos fosfolípidos carregados negativamente como a fosfatidilserina, sendo utilizado como teste para apoptose (36, 43).

Em 2006, Chohan *et al.* compararam diferentes testes, concluindo que SCSA, TUNEL e SCD têm níveis similares de fragmentação do DNA em espermatozoides de homens inférteis e doadores, apresentando uma correlação significativa, com o teste laranja de acridina não foi observada essa correlação. Os autores então concluíram que SCSA, TUNEL e SCD detectam com sucesso a fragmentação do DNA, apresentando resultados, precisão e sensibilidade semelhantes, por outro lado, o teste laranja de acridina está associado com maior variabilidade (14).

O valor preditivo de um teste de fragmentação do DNA consiste na soma de fatores como: 1) se a fragmentação ocorre em DNA fita simples ou dupla (fita simples melhor prognóstico), 2) porcentagem de espermatozoides com dano no DNA, pois quanto maior a porcentagem de espermatozoides afetados, menor a probabilidade que um espermatozoide com DNA intacto fertilize o oócito, 3) grau de fragmentação por espermatozoide (quanto maior o dano menor a chance de ele ser reparado), 4) danos primários ou secundários, 5) tipo de teste usado (direto ou indireto), 6) se o dano afeta sequências codificantes (probabilidade relativamente baixa, pois mais de 90 % do DNA consiste de sequências não codificantes), 7) capacidade de o oócito reparar o dano, 8) capacidade de o embrião reparar o dano, 9) número de oócitos em metáfase II e 10) processamento da amostra. Por causa destes fatores Lewis *et al.* (2008) consideraram que a busca de um limiar clínico de valor único é inadequado, sendo o objetivo estabelecer intervalos discretos, como o recomendado por estes pesquisadores de 15 a 25 % ao invés de um único valor. Ainda é importante lembrar que embora o Comitê de práticas da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) de 2006, tenha aceitado que o DNA do espermatozoide fragmentado é mais comum em homens inférteis e que pode contribuir para o pobre desempenho reprodutivo, ainda não há papel comprovado para testes de rotina da integridade do DNA na avaliação da infertilidade, e concluíram que os dados atuais são apenas suficientes para sugerir ao invés de confirmar uma associação entre testes de DNA do espermatozoide e resultados em ART (técnicas de reprodução assistida) (36). Esta não indicação para uso de rotina dos testes foi apoiada por Collins *et al.* em uma revisão feita em 2008 (63).

2.8 Fragmentação do DNA e Parâmetros Seminais

Os parâmetros de análise do sêmen preconizados pela OMS são a concentração, motilidade e morfologia espermática sua análise permite a separação das amostras de sêmen em normais (ou de referência) e anormais. As diferenças nos níveis de dano ao DNA em espermatozoides entre homens férteis e inférteis sugerem que o dano ao DNA pode ser usado como um preditor do potencial de fertilidade. Neste momento, pouco é sabido do nível de dano ao DNA encontrado em espermatozoides humanos e a relação entre danos ao DNA e parâmetros do sêmen permanece controversa, pois enquanto alguns estudos relatam apenas uma fraca ou nenhuma correlação entre os parâmetros convencionais e dano ao DNA, outros indicam que espermatozoides de pacientes com parâmetros de sêmen anormal apresentam níveis aumentados de dano ao DNA. Há inúmeros estudos mostrando relação dos principais parâmetros seminais (concentração, motilidade e morfologia) com fragmentação do DNA, enquanto outros estudos mostram relação de apenas um ou dois dos parâmetros, havendo ainda aqueles que não encontraram relação com nenhum dos mesmos. Abaixo seguem estudos relevantes que encontraram (ou não) estas associações (19, 64).

Em 2003, Benchaib *et al.* relataram uma correlação significativa negativa entre fragmentação do DNA e concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides (17). Borini *et al.* em 2006 também encontraram esta correlação antes e após centrifugação por gradiente descontinuo (65). Um estudo feito por Irvine *et al.* (2000), que embora tenha encontrado relação entre os três parâmetros, concluíram que o atributo que refletiu com mais exatidão a incidência de dano ao DNA foi a concentração de espermatozoides, pois com base neste critério sozinho, 25 % da variância no dano ao DNA poderia ser explicada (19). Moskovtsek *et al.*

(2009) também relataram que pacientes oligoastenoterazoospermicos apresentavam dano ao DNA significativamente mais alto, assim como taxa de fragmentação do DNA maior que 30 % com maior frequência, quando comparados com pacientes normozoospermicos e com pacientes com alteração em um ou dois parâmetros do sêmen. Além disso, o grupo com dano ao DNA alto (30 %) mostrou diferenças significativas em todos os parâmetros do sêmen, com exceção do volume, quando comparado com o grupo de dano ao DNA moderado (entre 15 e 30 %) e baixo (menor que 15 %) (64).

Sakkas *et al.* (2002) verificaram que amostras com alta positividade TUNEL foram mais propensas a ter uma baixa porcentagem de formas normais e baixa concentração de espermatozoides (58). No trabalho de Muratori *et al.* (2000) além da correlação negativa entre fragmentação do DNA, vitalidade, motilidade e morfologia antes e depois do *swim-up*, foi verificado que entre os defeitos morfológicos, somente anomalias de cauda corresponderam a fragmentação do DNA (60). A correlação entre fragmentação do DNA, motilidade e morfologia também foi encontrada em outros trabalhos (46, 50, 66).

Daris *et al.* (2010), além das anomalias na cauda acima citadas, encontraram que o percentual de cabeças macrocéfalas, microcéfalas, alongadas, defeitos nucleares, e cabeças amorfas foram maiores no grupo com o grau de fragmentação maior que 20 %, foi também demonstrado que cabeças alongadas apresentaram correlação significativa com falha de fertilização em ICSI (67). Interessantemente, Avendano *et al.* (2009) em todas as amostras de pacientes inférteis observaram espermatozoides com morfologia normal e com fragmentação do DNA (com alta proporção de células TUNEL positivas), enquanto que no grupo de pacientes férteis não se encontrou fragmentação do DNA em espermatozoides com morfologia

normal; no grupo sub-fertil, somente uma amostra, este grupo de pesquisadores também correlacionaram teratozoospermia moderada e grave (defeitos predominantes na cabeça) com fragmentação do DNA (68).

Um trabalho comparando parâmetros seminais com fragmentação do DNA avaliada por TUNEL em 1633 pacientes correlacionou fragmentação do DNA a idade, tempo de abstinência (correlação positiva), contagem total de espermatozoides móveis (correlação inversa), vitalidade (correlação negativa), porcentagem de formas atípicas (correlação positiva), pescoço anormal (correlação positiva) e caudas enroladas (correlação positiva), no entanto não foi observada correlação entre a taxa de TUNEL e número de espermatozoides móveis e atípicos por ejaculado, motilidade progressiva após uma hora, número de espermatozoides com peça basal anormal ou flagelo circular, volume do sêmen, concentração espermática, pH, morfologia da cabeça, acrossoma e peça intermediária, variação dos fatores de aglutinação dos espermatozoides e presença de células polinucleares e leucócitos no ejaculado (69).

Há ainda, trabalhos que não encontraram correlação entre fragmentação do DNA em espermatozoides e parâmetros seminais (39, 54).

2.9 Fragmentação do DNA e Resultados Reprodutivos

A integridade do genoma paterno desempenha um papel fundamental na manutenção do potencial reprodutivo humano, o impacto do genoma paterno alterado na concepção certamente é pelo menos tão importante quanto o do genoma materno. Afirma-se que o impacto biológico de uma estrutura anormal da cromatina de espermatozoides depende dos efeitos combinados da extensão dos

danos ao DNA nos espermatozoides e da capacidade do oócito de reparar este dano, desta maneira, o problema da reduzida integridade do DNA do espermatozoide, consiste em um resultado de infertilidade mista (16, 43).

Na presença de espermatozoides com DNA danificado os oócitos maduros são capazes de acionar mecanismos funcionais de reparo deste DNA. Em particular, o oócito é plenamente capaz de reparar quebras no DNA de fita simples, no entanto, se um alto nível de quebras de fita dupla está presente, a capacidade da célula é sobrecarregada e o oócito pode produzir “erros”, gerando mutações genéticas que, mais tarde, podem bloquear ou alterar o desenvolvimento do embrião levando ao bloqueio embrionário ou a abortos precoces. Esta capacidade limitada de reparo é um fator dependente da idade da mulher, pode variar entre as pacientes, e na mesma paciente pode variar de oócito para oócito ou mesmo entre coortes diferentes de oócitos. Em um estudo realizado por Ahmadi e Ng (1999) verificou-se que o desenvolvimento embrionário e fetal de camundongos é muito relacionado ao grau de dano, tendo o oócito capacidade de reparar o dano do DNA do espermatozoide quando este é menor que 8 % (35, 65). A capacidade de o oócito reparar o dano do DNA do espermatozoide foi estudada recentemente por Meseguer *et al.* (2011) que quantificaram a fragmentação do DNA no resultado reprodutivo. Em ciclos com oócitos de pacientes inférteis ou doados a fragmentação do DNA apresentou efeito negativo nas taxas de gestação apenas nos oócitos de mulheres inférteis. Este resultado foi independente da seleção embrionária demonstrando que a qualidade do oócito condicionou o efeito da fragmentação do DNA, pois com oócitos doados a fragmentação do DNA não teve impacto negativo para obtenção de gravidez, concluindo que o processo pelo qual o espermatozoide fertiliza o oócito não parece ser condicionado pelos níveis de fragmentação do DNA (70). Esbert *et*

al. (2011), concluíram que dano ao DNA não foi correlacionado a resultados de FIV e ICSI com oócitos próprios ou doados, entretanto a fragmentação do DNA foi maior em pacientes com ciclos cancelados (não transferência), com menos de 50 % de embriões de boa qualidade e nos abortamentos (71).

A falta de correlação entre a taxa de fertilização e a alta taxa de fragmentação do DNA encontrada pela maioria dos autores sugere que o dano ao DNA do espermatozoide, embora não impeça a fertilização, pode afetar a formação de blastocisto e a taxa de implantação, este achado foi mostrado por Tesarik, Greco e Mendonza (2004). Estes autores relataram que a influência do genoma paterno pode acontecer precoce ou tardiamente no desenvolvimento embrionário, o efeito paterno inicial no desenvolvimento embrionário ocorre antes da ativação do genoma embrionário sendo mediado pela disfunção do centrossoma ou deficiência de fatores ativadores do oócito, já os efeitos paternos tardios podem envolver aneuploidias no espermatozoide, danos no DNA ou empacotamento anormal da cromatina, que pode influenciar a ordenada ativação da expressão gênica paterna (18).

É aceito que as primeiras etapas do desenvolvimento embrionário estão sob dependência das transcrições maternas, enquanto a expressão dos genes paternos começa no estágio de 4-8 células, momento em que o genoma embrionário é ativado. A atividade transcricional começa e o genoma paterno inicia sua contribuição significativa para a função do embrião, sendo nesta fase que as alterações do DNA paterno, podem manifestar-se, prejudicando o desenvolvimento do embrião, taxa de implantação e gravidez (16). Estes fatos são apoiados por estudos que não encontraram correlação entre a fragmentação do DNA e taxa de fertilização (em ICSI e/ou FIV), e estudos onde foi encontrada correlação entre a fragmentação e a taxa de gravidez (66, 67, 72).

Uma meta-análise realizada por Evenson e Wixon em 2006 para investigar a relação entre fragmentação do DNA por SCSA e taxa de gravidez indicou que pacientes eram 7,1 vezes mais provável de alcançar a gravidez se a taxa de fragmentação fosse menor que 30 %, quando a rotina de FIV foi analisada, os casais eram 2 vezes mais prováveis de alcançar a gravidez se a taxa de fragmentação fosse menor que 30 %, já em rotinas de FIV e/ou ICSI, indicou uma tendência onde os pacientes eram 1,8 vezes mais provável de alcançar a gravidez com este mesmo valor de taxa de fragmentação acima citado. Os autores concluíram que se o homem apresenta fragmentação de DNA acima de 30 % (quando avaliado por SCSA), IU não deve ser considerada, aconselhando o casal a ir para tratamentos de FIV ou ICSI (73). Este relação de fragmentação do DNA e gravidez foi apoiada uma revisão sistemática de 13 estudos envolvendo 2161 ciclos de FIV e ICSI (63).

Infelizmente, há controvérsias quanto à influência do espermatozoide com DNA danificado sobre as taxas de fertilização. O trabalho realizado por Tavalae, Razari e Nasr-Esfahani (2009) correlacionou fragmentação do DNA e taxa de fertilização em ICSI, mas não em FIV e não encontrou relação da fragmentação com qualidade embrionária e gravidez, justificando que o achado da fertilização pode ser devido à baixa qualidade dos espermatozoides usados na ICSI, que provavelmente tenham uma maior proporção de espermatozoides com DNA fragmentado (46). Este achado indica que esta fragmentação pode impedir o início ou a conclusão da descondensação nuclear do espermatozoide, causando transtornos na formação do pronúcleo masculino, levando a falha na fertilização (21, 42).

Um importante estudo realizado por Benchaib et al. (2003), mostrou que a taxa de fertilização em ICSI foi significativamente maior para uma fragmentação do DNA abaixo de 10 % (avaliado por TUNEL), para FIV não foi encontrada diferenças,

quando a fragmentação foi superior a 10 %, o percentual de embriões atingindo o estágio de blastocisto foi sempre inferior a 50 % (quando a fragmentação era menor que 10 % o percentual de blastocistos foi de 80 %). Nenhuma gravidez foi obtida quando a fragmentação do DNA foi superior a 20 % e, através deste achado, muitas clínicas de reprodução utilizam este valor como referência para fragmentação do DNA (17). Este valor limiar foi apoiado em 2005 por Sergerie *et al.* que encontraram que o ponto de corte de 20 % de fragmentação apresenta 96,5 % de sensibilidade e 89,4 % de especificidade (22).

Importante lembrar que com o emprego de ICSI, quando o embriologista seleciona subjetivamente o espermatozoide a ser injetado, a competência funcional dos espermatozoides em termos destas células se capacitarem, do acrossomo reagir e penetrar na zona pelúcida ou fundir com a membrana vitelina do oócito não é avaliada nem necessária, pois a ICSI ignora o processo de seleção natural permitindo que espermatozoides com dano no DNA fertilizem o oócito. Em FIV, a competência do espermatozoide é um pré-requisito para a fertilização, ocorre a “seleção natural”, em que espermatozoides morfologicamente anômalos, com motilidade baixa e danos ao DNA possuem menor aptidão para fertilização dos oócitos. Estes conceitos são apoiados por outros estudos indicando que a zona pelúcida pode ser capaz de identificar os espermatozoides geneticamente alterados (15, 36).

Contrariamente, Borini *et al.* (2006), encontraram uma leve correlação entre fragmentação do DNA e taxa de fertilização em FIV, mas não entre fragmentação do DNA, gravidez e aborto, enquanto que com a ICSI não houve correlação entre fragmentação do DNA e taxa de fertilização, mas havendo diferença altamente significativa entre fragmentação do DNA, taxa de gravidez e aborto (65). A relação

entre fragmentação do DNA e aborto é apoiada por outros estudos, indicando que o dano ao DNA do espermatozoide pode levar ao desenvolvimento anormal e implantação comprometida do embrião (74, 75).

Foi proposto que os danos ao DNA do espermatozoide são promutagênicos e podem dar origem a mutações após a fertilização de oócitos como tentativas de reparar o dano antes do início da primeira clivagem, qualquer mutação que ocorra neste ponto, pode ser fixado na linha germinativa, podendo ser responsável pela indução de doenças. Nos estágios finais da espermatogênese e maturação no epidídimo, os mecanismos de reparo do DNA foram desligados, resultando em uma instabilidade genética das células germinativas masculinas, especialmente no cromossomo Y, podendo também causar doenças. Devido a esta falta de consenso entre a fragmentação do DNA e resultados reprodutivos e o que esta fragmentação poderia gerar na prole, estudos maiores e mais profundos se fazem necessários (23, 66).

2.10 Fragmentação do DNA e Tratamentos

Levando em consideração o impacto da fragmentação do DNA em espermatozoides no resultado reprodutivo, o desenvolvimento e a aplicação correta de métodos de tratamento e estratégias para minimizar os danos do DNA são essenciais (16).

Entre as estratégias há o preparo adequado do sêmen pela técnica de centrifugação por gradiente de densidade e *swim-up*. A centrifugação por gradiente de densidade consiste no método mais aplicado em tratamentos de reprodução assistida. É uma técnica rápida, exigindo 20 minutos de centrifugação contra uma

média de uma hora de incubação por *swim-up*, relativamente simples de preparar e fácil de executar sob condições estéreis, sendo facilmente aplicado na rotina clínica. A maioria dos trabalhos mostra melhora na fragmentação do DNA por esta técnica, como o trabalho realizado por Brahem *et al.* (2011), que utilizou três gradientes com concentrações de 90, 70 e 50 % e confirmou uma diminuição significativa da taxa de espermatozoides com DNA fragmentado, melhora na motilidade e morfologia. Na fração de 90 % foi encontrada uma porcentagem significativamente mais baixa de danos ao DNA, comparando as frações de 70 e 50 % (76). Esta redução na fragmentação do DNA também foi apoiada por outro estudo, recomendando usar esta técnica na preparação do sêmen para a reprodução assistida (20).

Contrariamente, Stevanato *et al.* (2008), não demonstraram melhora na fragmentação do DNA quando comparadas as amostras pré e pós processamento, embora tenha encontrado uma diferença significativa na motilidade, sugerindo que outras técnicas devem ser executadas para pacientes com alta fragmentação do DNA (77).

Já Aitken *et al.* (2010) verificaram que, quando a população inteira de espermatozoides foi considerada, a melhora na motilidade e vitalidade pós centrifugação por gradiente de densidade se refletiu em uma diminuição significativa na porcentagem de células TUNEL positivas, mas a porcentagem de células 8OHdG (dano oxidativo) permaneceu inalterada. Curiosamente, quando apenas as células viáveis foram consideradas, o fracionamento por Percoll aumentou significativamente a porcentagem de células positivas tanto para TUNEL quanto para 8OHdG. Foi repetido o estudo, desta vez havendo pouco impacto sobre a baixa incidência de células TUNEL positivas, mas aumentou significativamente a porcentagem de células 8OHdG positivas, sugerindo o impacto estimulante da

centrifugação por Percoll na indução de radicais livres nos espermatozoides centrifugados (51).

Os trabalhos que utilizaram a seleção por *swim-up*, demonstraram melhora nas características seminais e ainda possibilidade de eliminar espermatozoides com DNA fragmentado (55, 70). Por outro lado, há dois trabalhos comparando a incubação de amostras pela técnica de *swim-up* em diferentes tempos, mostrando que houve aumento na fragmentação do DNA durante a incubação aeróbica do sêmen em 2, 4 e 24 horas, podendo ser devido a ação de espécies reativas de oxigênio. Os autores salientam que o valor de fragmentação do DNA pode ser normal na alíquota fixa, utilizada para a análise da fragmentação do DNA e anormal na amostra usada para a inseminação dos oócitos, portanto a incubação desnecessária do sêmen em laboratório deve ser evitada (41, 48).

Outra estratégia proposta para melhorar a integridade do DNA do espermatozoide é o tratamento antioxidante adequado, em particular um dos sistemas para reduzir o estresse oxidativo consiste no aumento da capacidade de limpeza do plasma seminal pelo tratamento antioxidante oral antes da reprodução assistida. Gharagozloo e Aitken (2011) fizeram uma análise de 65 ensaios publicados, onde 20 apresentaram dados adequados e foram escolhidos para serem analisados. No geral 19 dos 20 estudos mostraram uma redução significativa do estresse oxidativo ou dano ao DNA após tratamento com antioxidante oral, entre as variáveis do sêmen, a motilidade foi melhorada em 10 de 16 estudos e 100 % dos estudos (7/7) que possuíam pacientes astenozoospermicos mostraram melhora significativa na motilidade, não havendo efeito na morfologia. Somente três estudos informaram efeitos positivos na concentração. De 10 estudos que apresentaram como desfechos secundários a taxa de fertilização e gravidez, seis mostraram

melhoria significativa. Entre os antioxidantes usados, vitamina E reduziu efetivamente a concentração de ROS e melhorou a taxa de fertilização ou gravidez em dois estudos, já outros dois estudos com vitamina E não mostraram efeito, o zinco foi eficiente em reduzir o estresse oxidativo e melhorou a motilidade em pacientes astenozoospermicos, a L-carnitina e acetil-L-carnitina sozinhos ou em combinação são provavelmente os antioxidantes mais estudados em infertilidade masculina exibindo uma redução significativa no dano ao DNA/ estresse oxidativo e melhora na motilidade (47).

Em resumo, quase todos os estudos demonstraram uma melhora significativa no estresse oxidativo ou no dano ao DNA, por isso a busca para identificar novos antioxidantes e combinações que mostrem segurança e eficácia deve continuar. Em terrenos teóricos, uma combinação apropriada de antioxidantes deve ser mais eficaz que qualquer antioxidante sozinho, pois o estresse oxidativo consiste em um fenômeno heterogêneo não localizado, no entanto deve-se ter cuidado com a dose e o número de ingredientes usados. A vitamina C em doses excessivas pode reduzir as pontes dissulfeto, promovendo a descondensação do DNA em espermatozoides; o selênio reduz o número de espermatozoides móveis provavelmente porque modifica o metabolismo do hormônio da tireóide e possivelmente o esgotamento dos níveis fisiológicos de ROS, levando ao estresse reduzido, comprometendo a função normal do espermatozoide (47).

No estudo feito por Tunc e Tremellen (2009), os pacientes tomaram uma cápsula de Menevit (500µg de folato, 100mg de vitamina C, 400IU de vitamina E, 6mg de licopeno, 25mg de zinco, 26µg de selênio e 333µg de óleo de alho) ao dia por 3 meses, produzindo uma queda significativa nos níveis de ROS seminal e danos ao DNA (por TUNEL), combinado com uma melhora na metilação global do

DNA, mas concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides não melhoraram após a terapia (53).

Os meios de cultura também podem ser melhor selecionados, evitando a presença de metais de transição que estimulam os danos mediados por ROS, podem também ser suplementados com antioxidantes para limpar ROS presentes. Estudos experimentais fazendo o co-cultivo de espermatozoides confirmam a eficácia da glutathione reduzida, N-acetilcisteína, hipotaurina e catalase. Taylor *et al.* (2009) suplementaram o meio de criopreservação com vitamina E, sendo a primeira fração suplementada com 100 μmol e a segunda com 200 μmol , a motilidade pós descongelamento apresentou melhora significativa nas alíquotas suplementadas com 200 μmol de vitamina E, porém a vitalidade e o grau de fragmentação do DNA não apresentaram diferença significativa em ambas as alíquotas (78).

Em 2002 foi desenvolvido um método denominado MSOME (examinação morfológica das organelas de espermatozoides móveis) para avaliar espermatozoides humanos em tempo real em alta magnificação. Esta técnica utiliza um microscópio invertido equipado com ótica de contraste interferencial de Nomarski, que permite uma ampliação de mais de 6000 vezes, comparado com a magnificação de 200 a 400 vezes usada para ICSI convencional. Este método facilitou o desenvolvimento de IMSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoides morfolologicamente selecionados) que é baseado na normalidade do espermatozoide como definido pelo sistema de classificação de MSOME e visa melhorar resultados da ICSI convencional, por focar na correlação entre dano ao DNA e anormalidades morfológicas do espermatozoide observadas em alta magnificação. Uma alteração específica do espermatozoide relacionada ao dano no DNA consiste na presença de

vacúolos nucleares grandes, especialmente aqueles ocupando mais de 50 % da área nuclear (16).

Um estudo feito em 2008 por Franco *et al.* demonstrou que os valores de fragmentação do DNA eram significativamente mais altos em núcleos de espermatozoides com vacúolos nucleares grandes (29,1 % contra 15,9 % nos espermatozoides com ausência de vacúolos) e também a porcentagem de DNA fita simples desnaturado foi maior em espermatozoides contendo vacúolos nucleares grandes (67,9 % contra 33,1 % nos espermatozoides com ausência de vacúolos). Para concluir, os autores apóiam a associação entre fragmentação do DNA em espermatozoides e a presença de vacúolos nucleares grandes e o uso de rotina de MSOME/IMSI (79).

Em adição, o mesmo autor em 2011 estudou a relação entre empacotamento da cromatina (coloração CMA3) e a presença de vacúolos nucleares grandes, mostrando que a coloração CMA3 positiva (baixa protaminação) foi significativamente mais alta em espermatozoides com vacúolos nucleares grandes do que em espermatozoides normais (53,2 % contra 40,3 % respectivamente) (80).

Em contraste, Watanabe *et al.* (2011), mostraram não haver diferença significativa na porcentagem de células TUNEL positivas entre o grupo com vacúolos grandes e aquele sem vacúolos grandes, sugerindo que estes vacúolos não são responsáveis pela fragmentação do DNA. Ainda foi calculada a incidência de aberrações cromossômicas estruturais, que entre os espermatozoides contendo vacúolos grandes foi de 9,1 %, sendo duas vezes mais alta que em espermatozoides do mesmo paciente ou de doadores férteis não contendo estes vacúolos (4,1 %). Entretanto estas diferenças não foram estatisticamente

significativas (81). Devido aos achados controversos, estudos complementares adicionais devem ser conduzidos, antes que a aplicação clínica de rotina de MSOME/IMSI seja adotada.

Têm-se afirmado que as espécies reativas de oxigênio podem, muito provavelmente, danificar as células germinativas masculinas no epidídimo, onde o tempo de exposição do espermatozoide a ROS é mais longo. Assim, uma das estratégias para obter espermatozoides não danificados seria com base na obtenção de espermatozoides diretamente dos testículos para uso em ICSI (16).

Um estudo feito por Greco *et al.* (2005) comparou o resultado reprodutivo de duas tentativas subseqüentes de ICSI usando espermatozoides do ejaculado e do testículo de 18 pacientes, mostrando que a incidência global de fragmentação do DNA foi de 23,6 % \pm 5,1 % no ejaculado e 4,8 % \pm 3,6 % nos espermatozoides testiculares. A taxa de fertilização e de clivagem e a proporção de embriões com boa aparência morfológica não foram estatisticamente significativos, porém apenas uma gravidez (que mais tarde foi abortada espontaneamente) foi estabelecida usando espermatozoides ejaculados, contrastando com 8 gestações clínicas (4 bebês únicos e 4 gêmeos = 12 sacos gestacionais) usando espermatozoides testiculares, levando a uma taxa de gestação significativamente maior que as tentativas de ICSI com espermatozoides ejaculados (20,7 % contra 1,8 % respectivamente). Importante lembrar que a recuperação de espermatozoides dos testículos consiste em uma intervenção invasiva e sua utilidade deve ser cuidadosamente justificada em cada caso individual (82).

3 Justificativa

A importância do dano do DNA do espermatozoide no processo reprodutivo é um assunto controverso e pouco estudado. Não existem estudos avaliando a viscosidade do sêmen e o dano ao DNA do espermatozoide, justificando a nossa proposta. Além disto, aventamos a hipótese de que a técnica mecânica (expulsão do sêmen através de seringa e agulha para redução da viscosidade seminal) possa danificar o DNA dos espermatozoides, piorando as taxas de fragmentação do DNA. Estas questões, pouco comentadas na literatura, e de cunho prático devem ser avaliadas para sua melhor compreensão e uso seguro em clínicas de reprodução assistida.

4 Objetivos

4.1 Objetivo principal

Avaliar se o processo físico de expulsão do sêmen através de seringa e agulha para liquefação de sêmen hiperviscoso altera significativamente as taxas de fragmentação do DNA.

4.2 Objetivos secundários

Comparar a fragmentação do DNA de espermatozoides humanos em amostras com viscosidade diminuída, fisiológica e aumentada.

Comparar os parâmetros seminais entre as amostras com viscosidade aumentada, diminuída e fisiológica.

Verificar nas amostras com fragmentação aumentada do DNA, se os parâmetros seminais estão normalizados.

5 Referências Bibliográficas

1. World Health Organization. Manual de laboratorio para el examen del semen humano y la interacción entre el semen y el moco cervical. 4ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2001. 164 p.
2. Moraes G, Éboli G, Pasqualotto F. Espermocitologia: espermocitograma em critério estrito. 2ª ed. Moraes G, Éboli G, editors. Caxias do Sul: EDUCS; 2007. 244 p.
3. Moraes G, Éboli G, Pasqualotto F. Espermocitologia: espermocitograma em critério estrito. 2ª ed. Moraes G, editor. Caxias do Sul: EDUCS; 2007. 244 p.
4. Owen DH, Katz DF. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. J Androl. United States 2005. p. 459-69.
5. Esfandiari N, Burjaq H, Gottlieb L, Casper RF. Seminal hyperviscosity is associated with poor outcome of in vitro fertilization and embryo transfer: a prospective study. Fertil Steril. United States 2008. p. 1739-43.
6. Mendeluk G, Gonzalez Flecha FL, Castello PR, Bregni C. Factors involved in the biochemical etiology of human seminal plasma hyperviscosity. J Androl. 2000;21(2):262-7. Epub 2000/03/14.

7. Moraes G, Éboli G, Pasqualoto F. Espermocitologia: espermocitograma em critério estrito. 2ª ed. Moraes G, editor. Caxias do Sul: EDUCS; 2007. 244 p.
8. World Health Organization. Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5ª ed. Geneva: World Health Organization; 2010. 286 p.
9. Gopalkrishnan K, Padwal V, Balaiah D. Does seminal fluid viscosity influence sperm chromatin integrity? Arch Androl. 2000;45(2):99-103. Epub 2000/10/12.
10. Siciliano L, Tarantino P, Longobardi F, Rago V, De Stefano C, Carpino A. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. J Androl. 2001;22(5):798-803. Epub 2001/09/08.
11. Aydemir B, Onaran I, Kiziler AR, Alici B, Akyolcu MC. The influence of oxidative damage on viscosity of seminal fluid in infertile men. J Androl. United States 2008. p. 41-6.
12. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. Hum Reprod Update. England 2008. p. 243-58.
13. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. J Androl. United States 2009. p. 219-29.
14. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. J Androl. United States 2006. p. 53-9.
15. Shamsi MB, Kumar R, Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. Indian J Med Res. 2008;127(2):115-23. Epub 2008/04/12.

16. Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2007;14(6):746-57. Epub 2007/06/21.
17. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod*. 2003;18(5):1023-8. Epub 2003/05/02.
18. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod*. England 2004. p. 611-5.
19. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*. 2000;21(1):33-44. Epub 2000/02/12.
20. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SE. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod*. England 2010. p. 1594-608.
21. Garrido N, Remohi J, Martinez-Conejero JA, Garcia-Herrero S, Pellicer A, Meseguer M. Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(6):855-65. Epub 2008/12/17.
22. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod*. England 2005. p. 3446-51.

23. Schulte RT, Ohl DA, Sigman M, Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 2010;27(1):3-12. Epub 2009/12/17.
24. Dissanayake D, Wijesinghe P, Ratnasooriya W, Wimalasena S. Relationship between seminal plasma zinc and semen quality in a subfertile population. *J Hum Reprod Sci.* 2010;3(3):124-8. Epub 2011/01/15.
25. Elia J, Delfino M, Imbrogno N, Capogreco F, Lucarelli M, Rossi T, et al. Human semen hyperviscosity: prevalence, pathogenesis and therapeutic aspects. *Asian J Androl. China* 2009. p. 609-15.
26. Amelar RD. Coagulation, liquefaction and viscosity of human semen. *J Urol.* 1962;87:187-90. Epub 1962/02/01.
27. Gonzales GF, Kortebani G, Mazzolli AB. Hyperviscosity and hypofunction of the seminal vesicles. *Arch Androl.* 1993;30(1):63-8. Epub 1993/01/01.
28. S EL, Malm J, Giwercman A. Visco-elasticity of seminal fluid in relation to the epididymal and accessory sex gland function and its impact on sperm motility. *Int J Androl. England* 2004. p. 94-100.
29. Esfandiari N, Gotlieb L, Casper RF. Seminal hyperviscosity is associated with poor outcome of controlled ovarian stimulation and intrauterine insemination: a prospective study. *Int J Fertil Womens Med.* 2006;51(1):21-7. Epub 2006/04/07.
30. Bjorndahl L, Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod. England* 2010. p. 23-9.

31. Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl.* 1995;16(1):80-7. Epub 1995/01/01.
32. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update.* England 2006. p. 417-35.
33. Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod.* England 2010. p. 30-6.
34. Garcia-Peiro A, Martinez-Heredia J, Oliver-Bonet M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, et al. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil Steril.* United States: 2011 American Society for Reproductive Medicine; 2011. p. 105-9.
35. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril.* United States: 2010 American Society for Reproductive Medicine. Published by Elsevier Inc; 2010. p. 1027-36.
36. Lewis SE, Agbaje I, Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med.* United States 2008. p. 111-25.
37. Delbes G, Hales BF, Robaire B. Toxicants and human sperm chromatin integrity. *Mol Hum Reprod.* England 2010. p. 14-22.
38. Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, et al. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed Online.* 2007;15(5):514-9. Epub 2007/11/22.

39. Nijs M, De Jonge C, Cox A, Janssen M, Bosmans E, Ombelet W. Correlation between male age, WHO sperm parameters, DNA fragmentation, chromatin packaging and outcome in assisted reproduction technology. *Andrologia*. 2011;43(3):174-9. Epub 2011/05/13.
40. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iulius GN, Zieschang JA, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod*. England 2009. p. 2061-70.
41. Toro E, Fernandez S, Colomar A, Casanovas A, Alvarez JG, Lopez-Teijon M, et al. Processing of semen can result in increased sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril*. United States 2009. p. 2109-12.
42. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*. 1999;4(1):31-7. Epub 1999/03/02.
43. Ozmen B, Koutlaki N, Youssry M, Diedrich K, Al-Hasani S. DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reprod Biomed Online*. 2007;14(3):384-95. Epub 2007/03/16.
44. Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, et al. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2005;11(2):198-205. Epub 2005/09/20.
45. Tarozzi N, Nadalini M, Stronati A, Bizzaro D, Dal Prato L, Coticchio G, et al. Anomalies in sperm chromatin packaging: implications for assisted reproduction techniques. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(4):486-95. Epub 2009/04/30.

46. Tavalae M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*. United States 2009. p. 1119-26.
47. Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod*. England 2011. p. 1628-40.
48. Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl*. 2003;24(2):253-62. Epub 2003/03/14.
49. Navarrete Gomez P, Espinoza Ruiz J, Parodi Rivera J, Alvarez JG, Sanchez Gutierrez R. Protective effect of fallopian tubal fluid against activated leucocyte-induced sperm DNA fragmentation: preliminary results. *Andrologia*. Germany 2009. p. 196-8.
50. Henkel R, Bastiaan HS, Schuller S, Hoppe I, Starker W, Menkveld R. Leucocytes and intrinsic ROS production may be factors compromising sperm chromatin condensation status. *Andrologia*. Germany 2010. p. 69-75.
51. Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod*. England 2010. p. 2415-26.
52. Aitken RJ, De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. England 2010. p. 3-13.

53. Tunc O, Tremellen K. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26(9-10):537-44. Epub 2009/10/31.
54. Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal A, Sharma R, Cadavid A. Assessment of sperm factors possibly involved in early recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* United States: 2010 American Society for Reproductive Medicine; 2010. p. 1465-72.
55. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000;15(4):830-9. Epub 2000/03/31.
56. Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod Biomed Online.* Netherlands: 2010 Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd; 2010. p. 456-62.
57. Leduc F, Nkoma GB, Boissonneault G. Spermiogenesis and DNA repair: a possible etiology of human infertility and genetic disorders. *Syst Biol Reprod Med.* United States 2008. p. 3-10.
58. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.* 2002;66(4):1061-7. Epub 2002/03/22.
59. Colin A, Barroso G, Gomez-Lopez N, Duran EH, Oehninger S. The effect of age on the expression of apoptosis biomarkers in human spermatozoa. *Fertil Steril.* United States: 2010 American Society for Reproductive Medicine. Published by Elsevier Inc; 2010. p. 2609-14.

60. Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, et al. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl.* 2000;21(6):903-12. Epub 2000/12/06.
61. Dominguez-Fandos D, Camejo MI, Balleca JL, Oliva R. Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry A.* 2007;71(12):1011-8. Epub 2007/11/01.
62. Sergerie M, Laforest G, Boulanger K, Bissonnette F, Bleau G. Longitudinal study of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end-labelling assay. *Hum Reprod. England* 2005. p. 1921-7.
63. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril. United States* 2008. p. 823-31.
64. Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology. United States* 2009. p. 789-93.
65. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod. England* 2006. p. 2876-81.
66. Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online.* 2003;7(4):477-84. Epub 2003/12/06.
67. Daris B, Goropevsek A, Hojnik N, Vlaisavljevic V. Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI. *Arch Gynecol Obstet.* 2010;281(2):363-7. Epub 2009/06/09.

68. Avendano C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril.* United States 2009. p. 1077-84.
69. Cohen-Bacrie P, Belloc S, Menezo YJ, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril.* United States 2009. p. 1801-5.
70. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Garcia-Herrero S, Remohi J, Fernandez JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril.* United States: 2011 American Society for Reproductive Medicine. Published by Elsevier Inc; 2011. p. 124-8.
71. Esbert M, Pacheco A, Vidal F, Florensa M, Riqueros M, Ballesteros A, et al. Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reprod Biomed Online.* Netherlands: 2011 Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd; 2011. p. 704-10.
72. Speyer BE, Pizzey AR, Ranieri M, Joshi R, Delhanty JD, Serhal P. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Hum Reprod.* England 2010. p. 1609-18.
73. Evenson DP, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology.* United States 2006. p. 979-91.
74. Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, et al. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl.* 2003;49(1):49-55. Epub 2003/03/22.

75. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod. England* 2008. p. 2663-8.
76. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. Semen processing by density gradient centrifugation is useful in selecting sperm with higher double-strand DNA integrity. *Andrologia*. 2011;43(3):196-202. Epub 2011/04/14.
77. Stevanato J, Bertolla RP, Barradas V, Spaine DM, Cedenho AP, Ortiz V. Semen processing by density gradient centrifugation does not improve sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation rates. *Fertil Steril. United States* 2008. p. 889-90.
78. Taylor K, Roberts P, Sanders K, Burton P. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(2):184-9. Epub 2009/02/05.
79. Franco JG, Jr., Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(1):42-5. Epub 2008/07/12.
80. Franco Jr JG, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Silva LF, Felipe V, et al. Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. *Int J Androl*. 2011. Epub 2011/05/04.
81. Watanabe S, Tanaka A, Fujii S, Mizunuma H, Fukui A, Fukuhara R, et al. An investigation of the potential effect of vacuoles in human sperm on DNA damage using a chromosome assay and the TUNEL assay. *Hum Reprod. England* 2011. p. 978-86.

82. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. Hum Reprod. England 2005. p. 226-30.

**6 Artigo em inglês - FRAGMENTATION OF DNA IN HUMAN SPERM WITH
DIFFERENT VISCOSITIES IN THE SEMINAL PLASMA**

Ana Paula de Souza Kussler¹, Anita Mylius Pimentel², Diego Duarte Alcoba³, Isabela Liu⁴,
Helena von Eye Corleta⁵

¹ Biomédica, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Médica Veterinária, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Embriologista do Núcleo de Reprodução Humana do Hospital Moinhos de Vento – Gerar, Porto Alegre, Brasil.

³ Biomédico, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁴ Bolsista de Iniciação Científica do curso de Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁵ Doutora e Professora do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e médica do Serviço de Ginecologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil; Coordenadora do Núcleo de Reprodução Humana do Hospital Moinhos de Vento - Gerar, Porto Alegre, Brasil;

Correspondence address:

Prof. Dra. Helena von Eye Corleta

Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular Centro de Pesquisas, Hospital de
Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90 035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

Tel. +55 51 3308 3559, Fax +55 51 3311 5699 e-mail: hcorleta@gmail.com

ABSTRACT

Background: To compare the DNA fragmentation in human sperm samples with reduced, physiological and increased viscosity and evaluate the mechanical process (expulsion of semen through the needle and syringe) used to reduce the viscosity, significantly alter sperm rates of DNA fragmentation. **Methods:** The seminal parameters of semen samples from 123 patients were evaluated and classified according to their viscosity. Those with increased viscosity passed through the process of expulsion of semen through a 10mL syringe with a 18G needle four times to reduce the seminal viscosity. The fragmentation of the DNA of all samples was analyzed using the TUNEL assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick end labeling assay), and in samples with increased viscosity the fragmentation was assessed before and after the process of expulsion with syringe and needle. **Results:** There was no difference in the rate of DNA fragmentation between samples with physiological, decreased and increased viscosity ($P=0.857$). In samples with increased viscosity was observed a statistically significant increase ($P=0.035$) in sperm DNA fragmentation after the expulsion of semen by syringe and needle. **Conclusion:** There is no difference in the rate of DNA fragmentation between samples with reduced, increased and physiological viscosities however the physical process of expulsion of semen through a syringe and needle to reduce the viscosity increases seminal DNA fragmentation of spermatozoa.

KEYWORDS: Semen, spermatozoa, DNA fragmentation, viscosity

RUNNING TITLE: Sperm DNA fragmentation and seminal viscosity

INTRODUCTION

The rheological properties of the semen changes radically after ejaculation, the ejaculate is primarily fluid, coagulates quickly turning into a gelatinous material and then it liquefies. This liquefaction occurs during a period of 5 minutes *in vivo*, which may take 20-30 minutes *in vitro* (1-3). The biochemical mechanisms of coagulation and liquefaction has been studied many times, concluding that in the ejaculate the coagulation factors are derived from the seminal vesicles (coagulating and basic proteins that form a coagulum viscous) while factors for the liquefaction responsible for the seminal coagulum lysis come from the prostate (plasminogen activator, α -amylase and prostate specific antigen-PSA) (1, 4, 5).

The viscosity of semen is one of the parameters evaluated by classic spermogram. According to World Health Organization (WHO) it can be estimated after semen liquefaction time by aspiration of the sample with 5 mL pipette and allowing free fall of the drops, there is a length of the filament formed. In a sample with normal viscosity, droplets well-defined are formed, while in a sample with increased viscosity the filament formed is larger than 2 cm (6).

The causes for this residual high viscosity are not well explained, however it doesn't seem to be a simple mechanical effect consisting of a condition that can compromise the physical and chemical characteristics of seminal fluid having a negative impact on sperm function (7). The molecules responsible for the rheological behavior of hyperviscosity may affect the acrosome reaction, capacitation, recognition sperm-zona pellucida, and fusion because some of the sperm surface

glycoproteins are not synthesized by the sperm but secreted by cells of the male genital tract and transported in seminal fluid, and after incorporated in the membrane of the spermatozoa (2, 3, 7).

The seminal hyperviscosity, which occurs in 12-29% of ejaculate, difficulties sample handling and the evaluation of sperm number and morphology. For this reason several physical and chemical methods have been proposed for the treatment of the hyperviscosity sample including treatment with mucolytic agents as the solution with 4% α -amylase (most commonly used in assisted reproduction) and sputolysin, enzymatic digestion with bromelain, pancreatic dornase, α -chymiotrypsin, and further 1:1 dilution with culture medium followed by repeated pipetting of the sample (7, 8). There is a mechanical process in which the sperm passes through a 5 to 10 mL syringe (depending of semen volume) with 18 gauge needle for 3 to 5 times. This would facilitate the distension and the cell count, although it is an easy, quick, effective, and inexpensive process, which today discuss is completely harmless to sperm (2, 3, 8, 9).

Hyperviscosity has been associated with loss of integrity of chromatin when compared with the physiological viscosity and may be another cause of male infertility (10).

The aim of this study is to correlate the DNA fragmentation of spermatozoa with seminal viscosity and evaluate if the mechanical method of liquefaction of semen increases the fragmentation of DNA.

METHODS

Patients

This is a cross-sectional prospective study of patients undergoing investigation of infertility in the Center for Human Reproduction Gerar of Hospital Moinhos de Vento in Brazil. Semen samples were collected from 123 consecutive patients and divided according to semen viscosity (40 patients with normal semen viscosity, 43 patients with increased viscosity, and 40 patients with reduced viscosity). Patients with total concentration of sperm less than $1 \times 10^6/\text{mL}$ were excluded. This study followed the Guidelines and Norms Regulating Research Involving Human Subjects (Resolution 196/96 of the National Health Council) and was approved by the Research Ethics Committee for Group of Research and Post-Graduate of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (10-0004) and the Institute of Education and Research of Hospital Moinhos de Vento (2010/9). All patients signed the informed consent.

Seminal Analysis

Semen samples were collected by masturbation in a period of abstinence from 2 to 5 days, semen analysis was performed after liquefaction of 30 minutes at room temperature. The pH, volume, appearance, viscosity, concentration, and motility were analyzed according to the new parameters of the WHO 2010 (8). The viscosity was estimated by aspirating the semen with a plastic 3 mL pipette and allowing free fall

drops to observe the size of the filament formed. The viscosity was classified as decreased when semen was watery, physiological when it was slightly viscous, and increased when it formed a filament greater than 2 cm (8). The concentration and motility were analyzed by Makler counting chamber (MidAtlantic Diagnostics Inc., Mount Laurel, USA) being the first expressed in $10^6/\text{mL}$ and the second in percentage. The morphology was examined by strict criteria after smear and staining with panoptic stain for hematology Instant Prov (Pinhais, Brazil) and expressed in percentage. The vitality was examined by staining with eosin (Sigma, St. Louis, USA) and the presence of leukocytes through the Endtz test, which is placed with 20 μL of semen sample, 20 μL of water, and 40 μL of benzidine (Sigma, St. Louis, USA) and the number of peroxidase positive cells (cells with brown staining) analyzed with Makler chamber.

To overcome the increased viscosity, these samples passed through the mechanical process of expulsion of semen with a BD Plastipak syringe (Curitiba, Brazil) of 3 or 5 ml (depending on volume of semen) attached with needle PrecisionGlide BD 18 gauge (Curitiba, Brazil) for 3 to 5 times. Small aliquot of 100 μL of the samples were frozen and sent for analysis of DNA fragmentation, whereas in samples with increased viscosity was made a aliquot of the sample before and another after passing through syringe and needle.

TUNEL assay

The fragmentation of DNA in sperm was evaluated by Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick end labeling assay (TUNEL) through the In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche, Mannheim, Germany). The samples were analyzed following the manufacturer's instructions,

which were first made of smears on glass slides, left to air dry, fixed with 4% paraformaldehyde (Quiminvest, Rio de Janeiro, Brazil) at pH 7.4 for one hour and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Germany) in 0.1% sodium citrate (Merck, Darmstadt, Germany) at 4°C for 5 minutes. After washing the slides with Phosphate Buffer Saline (PBS) they were processed for TUNEL assay. The nucleotides (labeling solution) were mixed with TdT (enzyme solution), added to each slide and incubated for 1 hour in a humid chamber in the dark at 37°C. After stopping the enzymatic reaction, the slides were washed again with PBS and incubated with the counter-dye Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, USA) for 5 minutes in the dark and then 200 spermatozoa per slide were analyzed through a microscope of fluorescence, as shown in Figure 1 and 2.

In all experiments there were included negative and positive controls, where the negative control was used the nucleotides without TdT and in positive control were used 1mg/mL DNase I (Promega, Madison, USA) in samples pre fixed and permeabilized for 20 minutes at room temperature. The average number of TUNEL positive cells in the positive control was 87.06%. We used the value reference of 20% for DNA fragmentation according to Benchaib *et al.* (2003) study (11).

Statistical Analysis

For continuous variables in which the results showed normal distribution we used the Student t test or analysis of variance (ANOVA), complemented by Tukey when necessary. These results are expressed as mean \pm standard deviation. For continuous variables with asymmetric distribution we employed the Mann-Whitney

test followed by Kruskal-Wallis. These results are expressed as median and interquartile range (25-75).

For categorical variables was used χ^2 test or Fisher's exact test and the results were expressed as number (n) and percentage (%). To control confounding factors and to evaluate the association with DNA fragmentation above 20%, multivariate Poisson regression analysis was used. The criterion for entering the variable in the model was to present a P value <0.20 in bivariate analysis. To evaluate the effect prevalence ratio was calculated in conjunction with the range of 95% confidence. The processing and data analysis were performed using the statistical package SPSS 18.0. The significance level was set at $P <0.05$.

RESULTS

One hundred and twenty-three patients had the semen sample evaluated and divided into 3 groups according to the viscosity of semen: physiological (n=40), decreased (n=40), and increased (n=43). Patient characteristics (age, BMI, smoking, alcohol and drugs, as well the presence of systemic disease) was similar between groups with different viscosities. Only the length of abstinence was significantly lower ($P=0.005$) in samples with increased viscosity compared with samples of physiological and viscosity decreased (Table I).

The semen parameters evaluated are presented in Table II. Most parameters did not differ between groups, however, the time of liquefaction, was significantly higher in samples with increased viscosity compared with samples of physiological viscosity ($P=0.010$). The vitality ($p<0.001$), presence of round cells ($p=0.005$), and

leukocytes ($p=0.023$) were significantly lower in samples with increased viscosity compared with the physiological and decreased viscosity. The appearance and color of the semen were similar between samples with different viscosities (data not shown).

The percentage of DNA fragmentation showed no statistical difference between the different viscosity samples ($P=0.857$), as shown in Table III.

After the expulsion of the samples hyperviscosity by a syringe and needle there was a statistically significant increase in DNA fragmentation ($P=0.035$) when compared with the same sample before the procedure (Table IV).

When we evaluated the relationship between the 15 samples (11 patients) that showed increased DNA fragmentation ($> 20\%$) with seminal parameters, only vitality ($P=0.013$) and motility ($P<0.001$) demonstrated relationship and after adjusted by the model regression Poisson only the motility remained significantly associated with DNA fragmentation and then calculated the prevalence ratio $PR=0.97$ (0.95 to 0.99) (Figure 3).

DISCUSSION

The etiology and the impact of seminal hyperviscosity in semen characteristics and functional capacity of sperm is not fully known, only 14 studies found evaluating the issue and results of these studies are contradictory (7, 12-15).

E. Lzanaty *et al.* (2004) evaluated the secretions of the seminal vesicles, prostate, and epididymis in samples with increased viscosity and found no difference in period of abstinence of patients with this alteration. In contrast, patients with hyperviscosity in the present study had significantly fewer days of abstinence ($P=0.005$) (12).

Regarding semen parameters examined, we observed in the hyperviscosity samples a liquefaction time statistically higher ($P=0.010$) and a slightly higher pH (8.0 ± 0.3) ($P = 0.068$) for samples of physiological viscosity similar to the result published by Andrade-Rocha *et al.* in 2005, which required that liquefaction delayed of samples hyperviscosities and $\text{pH} > 8.0$ caused by dysfunction of the seminal vesicles with a lower concentration of fructose or abnormal prostatic secretions (13).

In this study, there was no association between increased viscosity and seminal parameters of infection (round cells and leukocytes) as reported also in two other studies (15, 16) but contrasting recently, by Elia *et al.* (2009), which correlated mild hyperviscosity with bacterial infection and in severe hyperviscosity there was no association (7). Further studies with larger numbers of patients demonstrated a reduction of sperm concentration and motility in hyperviscosity samples which would hinder the normal progression of sperm by female genital tract (2, 10, 12). In our study there was no difference in motility and concentration between samples of different viscosities, while E. Lzanaty *et al.* (2004) related only the lower sperm motility to the seminal viscosity (12). It is noteworthy that the studies cited employ different parameters of motility (WHO 1999) (6) which compromises the comparison with our study that used the WHO criteria of 2010 (8). The vitality of the sperm in

samples with increased viscosity was lower ($P < 0.001$) than in the decreased and physiological viscosity. This parameter was also studied by Dissanayake *et al.* in 2010, which found a statistically higher concentration of zinc in the samples that showed low viability, although they have not correlated the vitality and viscosity (4). Gonzales *et al.* in 2003, in turn, related hyperviscosity samples with hypofunction of the seminal vesicles, thereby generating high zinc content in the absence of their ligands (14).

The secretions of the prostate and seminal vesicles contribute to the integrity of the chromatin of sperm, the prostatic fluid contains a divalent cation Zn^{2+} and seminal vesicles secrete ligands for Zn with high molecular weight, which reduces the zinc concentration in the chromatin of the spermatozoa facilitating their decondensation (2). When there is a hypofunction of the seminal vesicles the higher zinc content can prevent chromatin decondensation resulting in instability of the same, leading to DNA fragmentation (2). Hyperviscosity was correlated by Siciliano *et al.* (2001) to DNA fragmentation, probably due to decreased total antioxidant system and catalase, leading to oxidative stress (16). In 2008 the increased viscosity was related to oxidative stress due to the product of lipid peroxidation (malondialdehyde) (17).

In addition to oxidative stress, abnormal chromatin packaging, and abortive apoptosis may have profound implications for DNA integrity and normal embryonic development (2, 18). According to Andrade Rocha *et al.* (2005), changes in viscosity (increased and decreased) are related to abnormal function of the seminal vesicles what we suppose could destabilize the sperm chromatin (13). In this study no

correlation was demonstrated between hyperviscosities samples and DNA fragmentation, in contrast to the results of the work of Gopalkrishnan *et al*, where only 13% of samples with increased viscosity exhibited normal chromatin integrity, against 30% of samples with physiological viscosity (10).

The relationship between DNA damage and semen parameters is quite controversial. Most studies show a correlation between DNA fragmentation and subnormal semen parameters (concentration, motility, morphology, and vitality) (11, 19-22) while other studies found no correlation between them (23, 24). The criterion of high DNA fragmentation (greater than 20%) used in this study was based on studies of Bechaib *et al.* with 104 couples (54 of ICSI and 50 of IVF) where no pregnancy was obtained in patients with sperm DNA fragmentation above this level (11). In the present study the motility was correlated with increased DNA fragmentation, every 1% increase in sperm motility makes the prevalence of fragmentation reduce in 3%, interesting finding that deserves to be confirmed with larger samples with DNA fragmentation greater than 20%.

The difficulty of manipulating hyperviscosities samples have propose several methods to decrease the viscosity (3). The mechanical method described by Amelar in 1962 and recommended in the WHO Manual of 2010 (8) is one of the most used (2, 3, 8, 25). The semen is aspirated and expelled from 3 to 5 times with a syringe attached to a 18G needle, this changes the molecular behavior of the sperm protein fibrils, making it less viscous and more liquefied, without "apparent" damage to the morphology and motility of sperm (25). However in this study there was a significant increase in sperm DNA fragmentation after the expulsion of semen by syringe and

needle. As the stages of embryonic development that are paternal genome dependent after 4 to 8 cells stage, the impact of fragmentation of sperm DNA to the embryo is usually not observed in vitro, since the embryo transfer is carried out preferably by day 3, however can affect the rate of development to blastocyst, implantation rate and pregnancy (11, 21, 26-28).

This study found no difference in levels of DNA fragmentation between the different viscosities, a topic that deserves further investigation, however it was shown that the mechanical method (passing the syringe and needle) statistically increased rates of sperm DNA fragmentation ($P=0.035$) and should not be used to decrease the viscosity of semen. Except in spermograms where the sperm will not be used for reproductive purposes, until further studies prove the safety of this procedure.

Author's role

A.P.S.K. designed the study, performed the spermograms and analysis of DNA fragmentation, analyzed and interpreted the data and drafted the literature review of the article, A.M.P. designed the study, performed the literature review and spermograms, A.D.D. analyzed the DNA fragmentation, and analysis and interpretation of data, I.L. assisted the analysis of DNA fragmentation and development the database; and H.V.C. designed and supervised the study and provided critical discussion about the article.

Funding

The work was supported by Research Incentive Fund (FIFE), Hospital de Clinicas de Porto Alegre (project No. 10-004), the author A.P.S.K. received a grant for the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel - CAPES (grant No. 941807), the author D.D.A. received a grant by the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (grant n ° 133435/2011-3) and undergraduate students I.L. received a scholarship through the Scholarship Program for Scientific Initiation PIBIC / CNPq (grant n ° 115847/2011-1).

REFERENCES

1. Owen DH, Katz DF. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J Androl.* United States 2005. p. 459-69.
2. Esfandiari N, Burjaq H, Gotlieb L, Casper RF. Seminal hyperviscosity is associated with poor outcome of in vitro fertilization and embryo transfer: a prospective study. *Fertil Steril.* United States 2008. p. 1739-43.
3. Mendeluk G, Gonzalez Flecha FL, Castello PR, Bregni C. Factors involved in the biochemical etiology of human seminal plasma hyperviscosity. *J Androl.* 2000;21(2):262-7. Epub 2000/03/14.
4. Dissanayake D, Wijesinghe P, Ratnasooriya W, Wimalasena S. Relationship between seminal plasma zinc and semen quality in a subfertile population. *J Hum Reprod Sci.* 2010;3(3):124-8. Epub 2011/01/15.
5. Moraes G, Éboli G, Pasqualotto F. Espermocitologia: espermocitograma em critério estrito. 2ª ed. Moraes G, Éboli G, editors. Caxias do Sul: EDUCS; 2007. 244 p.

6. World Health Organization. Manual de laboratorio para el examen del semen humano y la interacción entre el semen y el moco cervical. 4ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2001. 164 p.
7. Elia J, Delfino M, Imbrogno N, Capogreco F, Lucarelli M, Rossi T, et al. Human semen hyperviscosity: prevalence, pathogenesis and therapeutic aspects. Asian J Androl. China 2009. p. 609-15.
8. World Health Organization. Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5ª ed. Geneva: World Health Organization; 2010. 286 p.
9. Moraes G, Éboli G, Pasqualotto F. Espermocitología: espermocitograma em critério estrito. 2ª ed. Moraes G, editor. Caxias do Sul: EDUCS; 2007. 244 p.
10. Gopalkrishnan K, Padwal V, Balaiah D. Does seminal fluid viscosity influence sperm chromatin integrity? Arch Androl. 2000;45(2):99-103. Epub 2000/10/12.
11. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. Hum Reprod. 2003;18(5):1023-8. Epub 2003/05/02.
12. S EL, Malm J, Giwercman A. Visco-elasticity of seminal fluid in relation to the epididymal and accessory sex gland function and its impact on sperm motility. Int J Androl. England 2004. p. 94-100.
13. Andrade-Rocha FT. Physical analysis of ejaculate to evaluate the secretory activity of the seminal vesicles and prostate. Clin Chem Lab Med. 2005;43(11):1203-10. Epub 2005/10/20.
14. Gonzales GF, Kortebani G, Mazzolli AB. Hyperviscosity and hypofunction of the seminal vesicles. Arch Androl. 1993;30(1):63-8. Epub 1993/01/01.

15. Munuce MJ, Bregni C, Carizza C, Mendeluk G. Semen culture, leukocytospermia, and the presence of sperm antibodies in seminal hyperviscosity. *Arch Androl.* 1999;42(1):21-8. Epub 1999/02/11.
16. Siciliano L, Tarantino P, Longobardi F, Rago V, De Stefano C, Carpino A. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *J Androl.* 2001;22(5):798-803. Epub 2001/09/08.
17. Aydemir B, Onaran I, Kiziler AR, Alici B, Akyolcu MC. The influence of oxidative damage on viscosity of seminal fluid in infertile men. *J Androl.* United States 2008. p. 41-6.
18. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl.* United States 2009. p. 219-29.
19. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 2000;21(1):33-44. Epub 2000/02/12.
20. Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology.* United States 2009. p. 789-93.
21. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod.* England 2006. p. 2876-81.
22. Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod.* England 2010. p. 2415-26.
23. Nijs M, De Jonge C, Cox A, Janssen M, Bosmans E, Ombelet W. Correlation between male age, WHO sperm parameters, DNA fragmentation, chromatin

packaging and outcome in assisted reproduction technology. *Andrologia*. 2011;43(3):174-9. Epub 2011/05/13.

24. Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal A, Sharma R, Cadavid A. Assessment of sperm factors possibly involved in early recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. United States: 2010 American Society for Reproductive Medicine; 2010. p. 1465-72.

25. Amelar RD. Coagulation, liquefaction and viscosity of human semen. *J Urol*. 1962;87:187-90. Epub 1962/02/01.

26. Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2007;14(6):746-57. Epub 2007/06/21.

27. Schulte RT, Ohl DA, Sigman M, Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27(1):3-12. Epub 2009/12/17.

28. Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Staf T, Hoogendijk C, Mehnert C, et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online*. 2003;7(4):477-84. Epub 2003/12/06.

Legends

Figure 1 - Sperm TUNEL positive (A) and TUNEL negative (B)

Figure 2 - Correlation between DNA fragmentation and motility

Table 1 – Characteristics of 123 patients according to the viscosity of semen

Table 2 – Semen parameters and viscosity of semen

Table 3 - Comparison of DNA fragmentation between samples with different viscosities

Table 4 - Comparison of the fragmentation of DNA in samples with increased viscosity before and after passing the syringe and needle

Figure 1

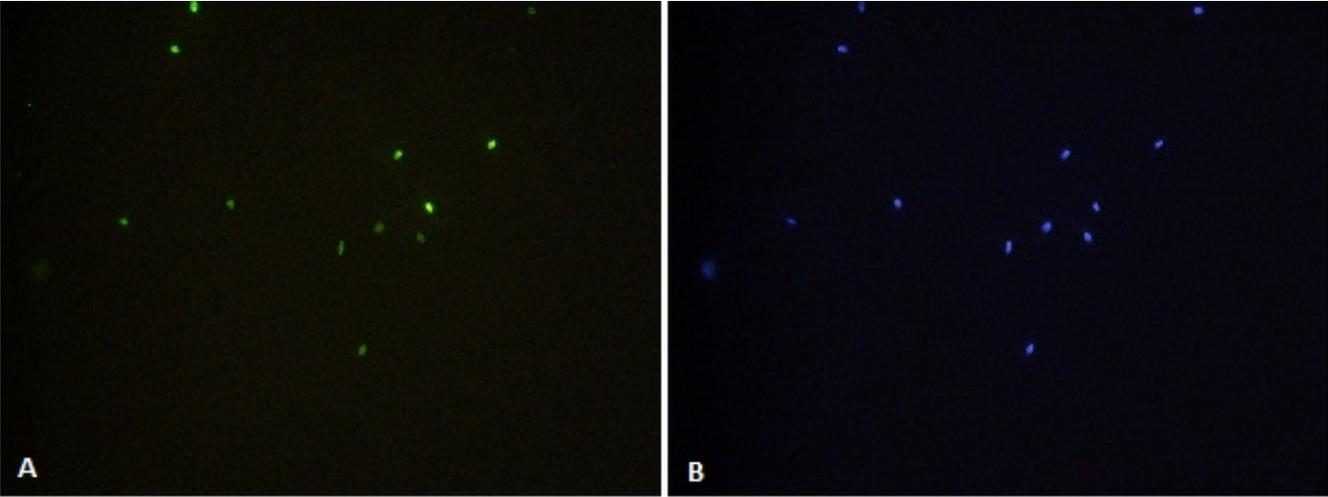


Figure 2

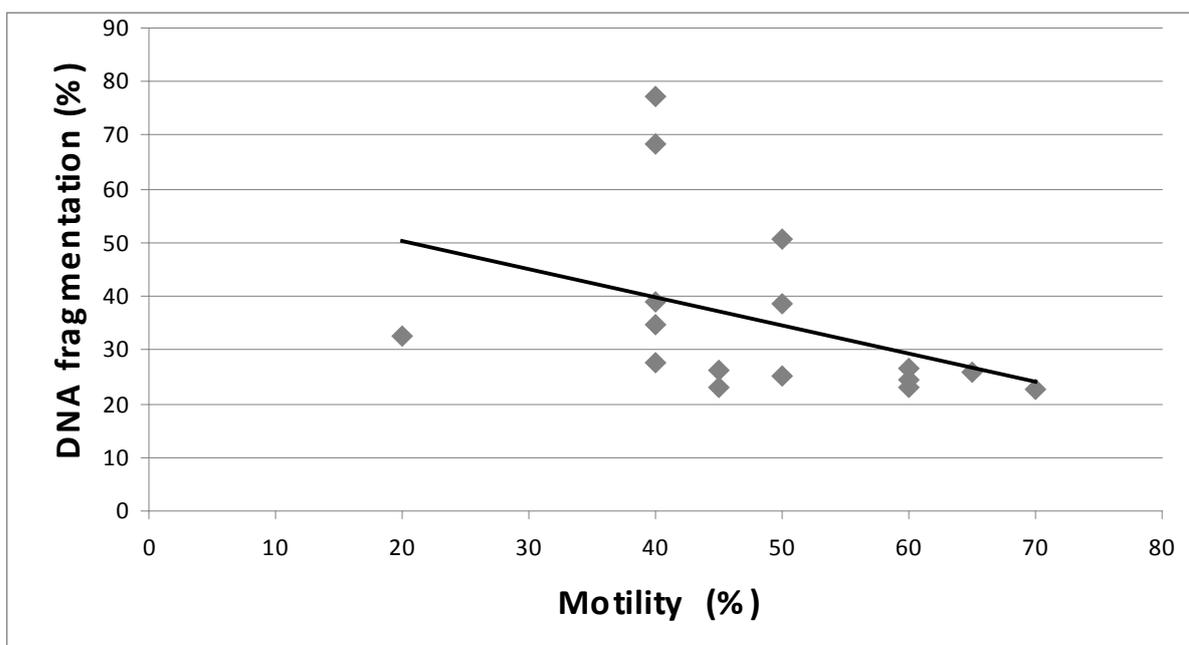


Table 1

	Physiological Viscosity	Decreased Viscosity	Increased Viscosity	P-value
Age	35.2 ± 7.3	34.9 ± 8.1	36.1 ± 7.5	0.898
BMI	26.2 ± 3.8	27.0 ± 3.0	27.1 ± 4.7	0.656
Days of abstinence (median P25-75)	3.5 (3-5) ^a	4 (3-5) ^a	3 (2-4) ^A	0.005
Smoke n (%)	2 (8 %)	0 (0 %)	1 (6.3 %)	0.587
Alcohol n (%)	16 (64 %)	6 (46.2 %)	11 (68.8 %)	0.426
Comorbidity n (%)	1 (4 %)	1 (7.7 %)	2 (12.5 %)	0.598
Drugs n (%)	7 (28 %)	3 (23.1 %)	4 (25 %)	0.493

^{Aaa} indicates a difference in the days of abstinence (P=0.005)

Table 2

	Physiological viscosity	Decreased Viscosity	Increased Viscosity	P-value
Time of Liquefaction (min)	29.3 ± 4.3 ^a	31.9 ± 12.4	36.6 ± 13.7 ^A	0.010
pH	7.9 ± 0.2	7.9 ± 0.2	8.0 ± 0.3	0.068
Volume mL (median P25-75)	2.3 (1.5-3.4)	2.5 (2-4)	2 (1-3.5)	0.245
Concentration x10 ⁶ (median P25-75)	53 (30.5-95.5)	63.5 (29.8-107.3)	48 (17-87)	0.231
Motility of spermatozoa (% a+b+c)	61.8 ± 14.7	64.5 ± 16.9	59.3 ± 14.9	0.316
Round Cells x10 ⁶ (media P25-75)	2.2 (1.3-4) ^b	2.3 (1.1-3.6) ^b	1.1 (0.5-2.7) ^B	0.005
Leukocytes x10 ⁶ (media P25-75)	0.6 (0-1.1) ^c	0.4 (0.4-1.2) ^c	0.4 (0-0.4) ^C	0.023
Vitality (%)	70.7 ± 11.1 ^d	70.6 ± 13.5 ^d	58.9 ± 15 ^D	< 0.001
Normal Morphology (%)	14.5 ± 5.1	14.1 ± 6.2	13.8 ± 5.2	0.863
Concentration after preparation x10 ⁶ (median P25-75)	41.5 (28.5-49.5)	68 (19-89)	30 (13-68)	0.202
Motility after preparation	81.3 ± 16	80 ± 17.9	75.9 ± 15.4	0.499

^{Aa} Indicates the difference in time of liquefaction (P = 0.010)

^{Bbb} Indicates difference in the presence of round cells (P = 0.005)

^{Ccc} Indicates difference in the presence of leukocytes (P = 0.023)

^{Ddd} Indicates the difference in vitality (P <0.001).

Table 3

	Physiological Viscosity	Decreased Viscosity	Increased Viscosity	P-value
% DNA Fragmentation (median P25-75)	5.2 (1.9-9)	4.1 (1.3-7.8)	3.8 (1.8-9.3)	0.857
% Integrated DNA (mean \pm SD)	91.9 \pm 10.7	93.5 \pm 7.9	92.5 \pm 12.1	0.793
n (%)				
Fragmentation <20 %	36 (90 %)	37 (92.5 %)	40 (93 %)	0.867
Fragmentation > 20 %	4 (10 %)	3 (7.5 %)	3 (7 %)	

Table 4

	BEFORE	AFTER	P-value
% DNA Fragmentation (median P25-75)	3.8 (1.8-9.3) ^a	6.3 (3.2-12.7) ^A	0.035
% Integrated DNA (mean ± SD)	92.5 ± 12.1	89.5 ± 12.9	0.279
n (%)			
Fragmentation <20 %	40 (93 %)	37 (86 %)	0.483
Fragmentation > 20 %	3 (7 %)	6 (14 %)	

^{Aa} Indicates the difference in DNA fragmentation before and after passing the syringe and needle (P=0.035)

7 Considerações Finais

Foi possível verificar que a fragmentação do DNA no espermatozoide aumentou após a expulsão física do sêmen através de seringa e agulha e não foi encontrada diferença nos níveis de fragmentação do DNA entre as amostras com viscosidade diminuída, fisiológica e aumentada. As informações obtidas sinalizam que o processo de seringa e agulha deve ser substituído e outros estudos devem ser feitos para compreender melhor a etiologia das amostras hiperviscosas.

8 Anexos

Anexo 1- Termo de Consentimento livre e esclarecido

Projeto: Fragmentação de DNA em espermatozoides humanos com diferentes viscosidades no plasma seminal.

Pesquisadores responsáveis: Helena von Eye Corleta

Telefone para contato: (051) 33143496 (Gerar)/ 91054839 (Ana Paula Kussler)

Comitê de Ética em Pesquisa: (051) 33168304 (HCPA)/ 33143690 (HNV)

Prezado paciente,

estamos realizando um estudo com pacientes que serão submetidos à investigação de infertilidade conjugal, com o objetivo de avaliar a fragmentação do DNA de espermatozoides em amostras de sêmen com diferentes viscosidades. Já se sabe, pela da literatura, que sêmen com viscosidade alterada e espermatozoides com DNA danificado prejudicam a fertilização do óvulo. Uma associação entre estes dois parâmetros ainda não possui confirmação científica, de modo que se fazem necessárias pesquisas como esta para elucidar se realmente existe uma relação entre viscosidade do sêmen e fragmentação do DNA de espermatozoides.

Você que procurou o Núcleo de Reprodução Humana Gerar para realização de espermograma, como parte da investigação de infertilidade conjugal. está sendo convidado, por sua livre vontade, a participar deste estudo cujo objetivo é analisar também a fragmentação do DNA dos espermatozoides. Você coletará a amostra de sêmen através de masturbação, para análise de possíveis causas masculinas de infertilidade. Primeiramente será realizada a análise, denominada de espermograma, a qual faz parte da rotina para todos os casais que investigam infertilidade e, a seguir, com o mesmo material será feita uma técnica denominada TUNEL para avaliar a

fragmentação do DNA de espermatozoides, esta última como parte deste projeto de pesquisa. Essa coleta deverá ser realizada com uma abstinência prévia de 2 a 5 dias. Você receberá o resultado do espermograma e também da avaliação da fragmentação de DNA dos espermatozoides, sendo que apenas o espermograma terá custo. Não haverá qualquer risco para você, apenas o benefício de um teste adicional para auxiliar na investigação da infertilidade.

O resultado do tratamento escolhido para você e sua parceira não é afetado por este estudo, sendo que você será acompanhado pelo seu médico, como qualquer outro paciente, independente da participação nesta pesquisa. Portanto, a participação é voluntária, assim como a recusa em participar, não irá influenciar nas decisões do seu médico em relação à sua saúde ou ao seu tratamento. Você não será identificado e os dados e materiais coletados serão confidenciais e utilizados somente para finalidade pesquisa.

Você poderá interromper a participação neste estudo a qualquer momento, sem que haja prejuízo no seu atendimento médico. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital Moinhos de Vento.

Eu, _____, afirmo que fui adequadamente informado sobre o protocolo deste estudo e que concordo em participar voluntariamente do mesmo.

Assinatura do paciente: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Dra. Helena von Eye Corleta

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.