

NOVAS PERSPETIVAS LABORATORIAIS NO ESTUDO DA FERTILIDADE MASCULINA

Beatriz Vieira^{1,2} e Ângela Ribeiro^{1,3,4}, Ana Gomes¹, Rita Magalhães¹, João Luís Silva Carvalho^{1,3,4,5,6}

1. CETI, Centro de Estudo e Tratamento da Infertilidade, 4100-118 Porto, Portugal | 2. Departamento de Biologia - Faculdade de Ciências - Universidade do Porto, 4169-007 Porto, Portugal | 3. Departamento de Biomedicina - Faculdade de Medicina - Universidade do Porto, 4200-450 Porto, Portugal | 4. IBMC - Instituto de Biologia Molecular e Celular e Instituto de Investigação e Inovação em Saúde - i3S- 4200-135 Porto, Portugal | 5. Departamento de Obstetrícia e Ginecologia - Faculdade de Medicina - Universidade do Porto, 4200-319 Porto, Portugal | 6. CUF Porto Hospital - 4100-180 Porto, Portugal.

PORQUÊ INCLUIR O ESTUDO DA FRAGMENTAÇÃO DO ADN NOS ESPERMOGRAMAS?

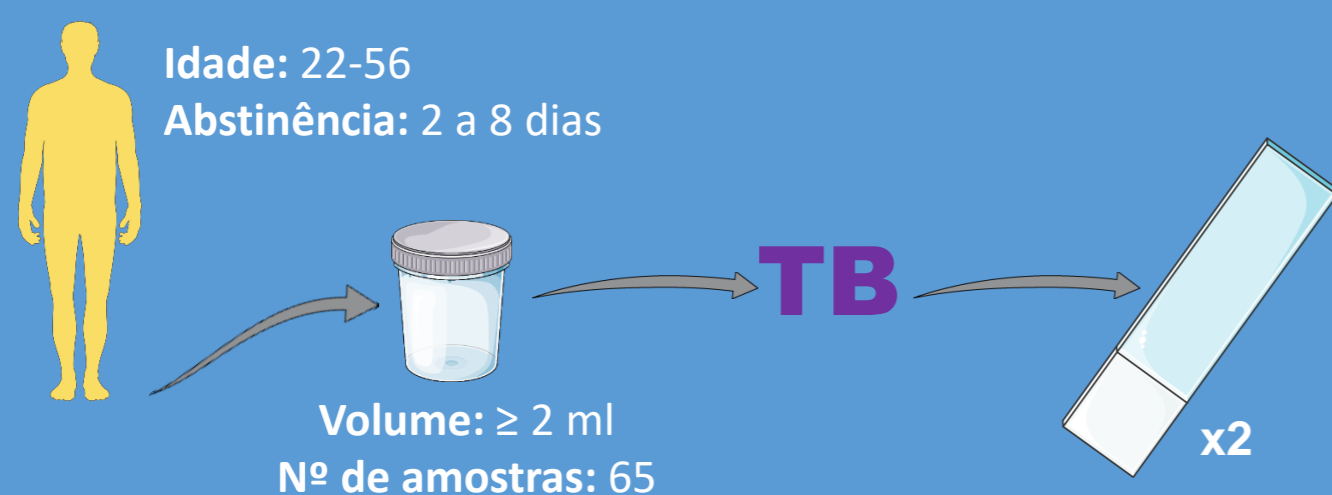
Níveis elevados de fragmentação de ADN nos espermatozoides podem não estar associados a parâmetros seminais significativamente alterados (p.ex: mobilidade, concentração e morfologia)^{1,2}, pelo que, um indivíduo diagnosticado como normozoospermico poderá ter a sua fertilidade condicionada³ devido a níveis elevados de fragmentação. Apesar da relevância do estudo da fragmentação do ADN espermático, os custos e a complexidade das técnicas associados à sua avaliação fazem com que a sua aplicabilidade esteja longe do desejado^{4,5}. O estudo e desenvolvimento de ferramentas *low cost* para concretização desta análise, em simultâneo com a execução do espermograma poderão tornar-se uma mais-valia na avaliação e diagnóstico da fertilidade masculina.

OBJETIVOS

- ✓ Avaliação dos benefícios do método de coloração com *Toluidine Blue (TB)* para determinação do %DFI (*DNA Fragmentation Index*) em amostras de espermograma.
- ✓ Aplicação do método para avaliação do impacto na integridade do ADN espermático, após utilização de três meios comerciais para *swim-up*

MATERIAL E MÉTODOS

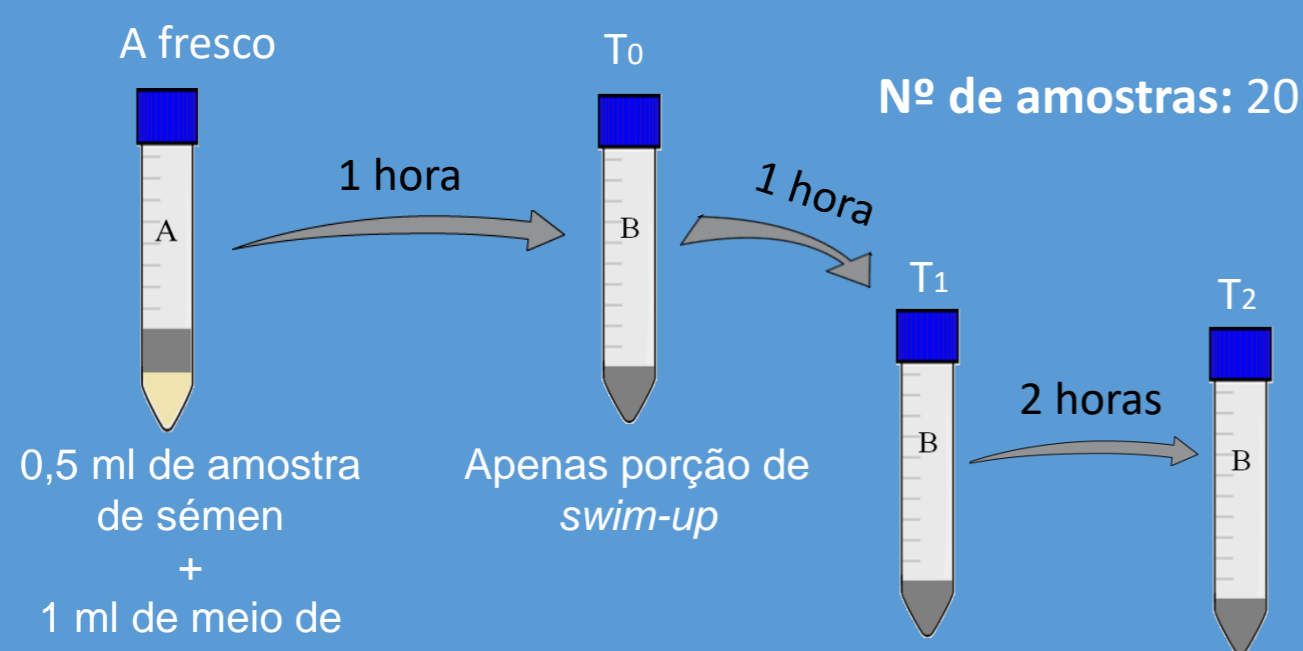
I – AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO COM O MÉTODO TB



I.1 – COLORAÇÃO COM TOLUIDINE BLUE

Os espermatozoides marcados a **roxos** foram considerados portadores de quebras na molécula de ADN, quando corados a **azul**, os espermatozoides foram considerados normais (fragmentação não detetada).

II – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE SWIM-UP NA INTEGRIDADE DO ADN ESPERMÁTICO



III – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram analisados através dos *softwares* Excel (versão 2013), IBM-SPSS® (v.25) e ainda o GraphPad Prism 8®. Em todos os casos foram considerados estatisticamente significativos resultados com $p < 0,05$.

Bibliografia

- 1- Agarwal A, Cho C-L, Esteves SC. Should we evaluate and treat sperm DNA fragmentation? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2016;28:164–171;
- 2- Rex AS, Aagaard J, Fedder J. DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology* 2017;5:622–630;
- 3- Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC, Ko E, Ramasamy R, Zini A. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl Androl Urol* 2016;5:935–950.
- 4- Majzoub A, Agarwal A, Cho C-L, Esteves SC. Sperm DNA fragmentation testing: a cross sectional survey on current practices of fertility specialists. *Transl Androl Urol* 2017;6:S710–S719.
- 5- Rui BR, Angrimani DSR, Bicudo LC, Losano JDA, Nichi M, Pereira RJG. A fast, low-cost and efficient method for the diagnosis of sperm DNA fragmentation in several species. *Reprod Domest Anim* 2017;53:171–175.

RESULTADOS

I – DETERMINAÇÃO DE UM LIMITE PARA O %DFI

Normozoospermicos vs Alterados Determinação do *threshold* para o %DFI

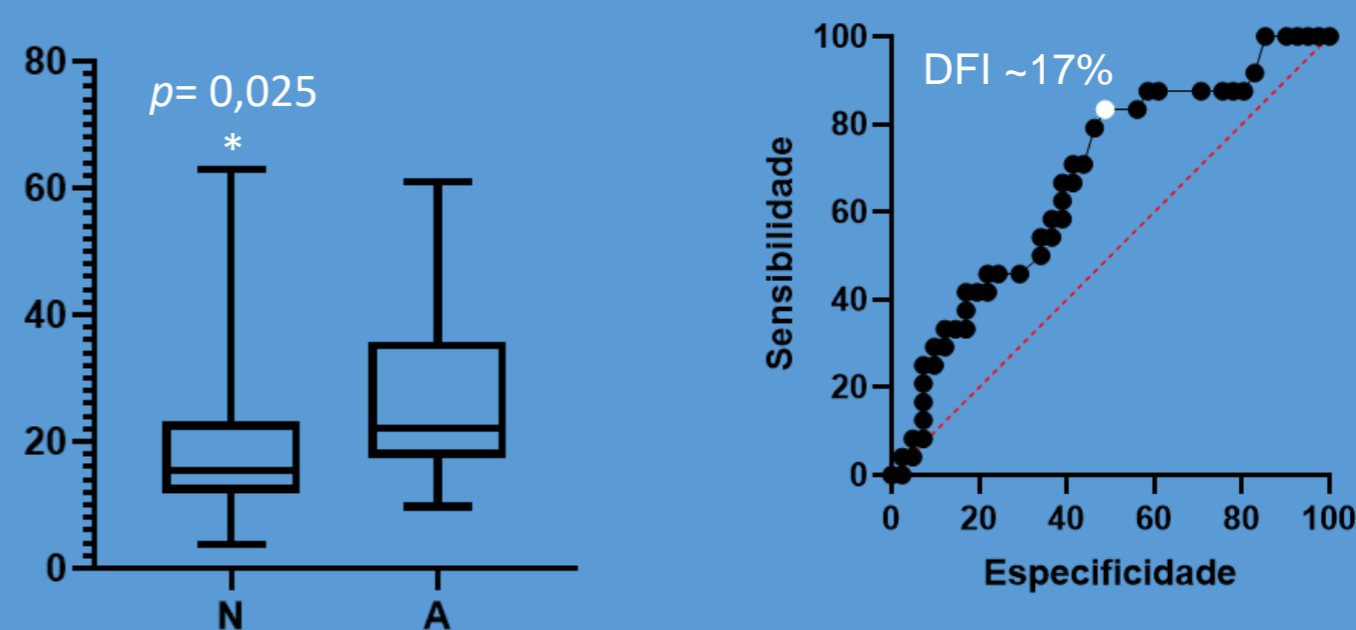


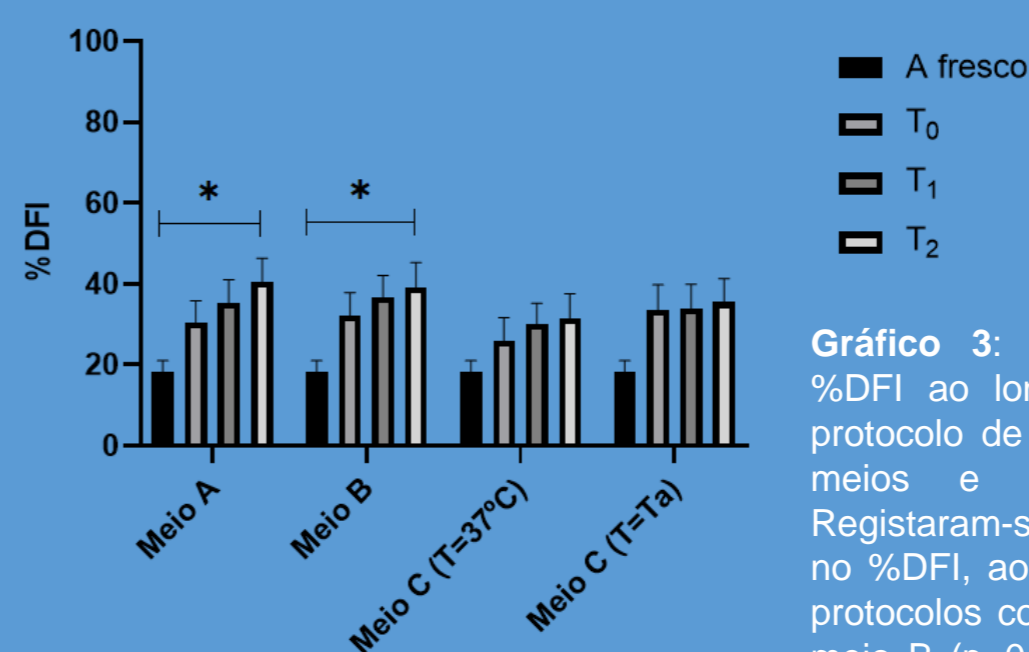
Gráfico 1: Diagrama *box-plot* com a distribuição dos valores %DFI para amostras consideradas normozoospermicas (N) e amostras com pelo menos um dos parâmetros seminais alterados (A).

Gráfico 2: Curva ROC para determinação estatística de um valor limite de %DFI para distinção entre uma amostra normozoospermica e uma amostra alterada.

1. **Teste de Mann Whitney** → amostras normozoospermicas possuem um %DFI significativamente mais baixo do que amostras com pelo menos um dos parâmetros alterados ($p=0,025$).
2. **Correlação de Pearson** → existe uma correlação negativa entre o %DFI e a mobilidade* (espermatozoides progressivos; $p=0,045$), a concentração* ($p=0,013$) e a vitalidade** ($p=0,002$).
3. **Curva ROC** → Este estudo revelou como valor limite de fragmentação de ADN em espermatozoides 17%.

II – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE SWIM-UP NA INTEGRIDADE DO ADN ESPERMÁTICO

%DFI em cada meio ao longo do tempo



CONCLUSÃO

- ✓ Um %DFI superior a 17% é indicativo de que a integridade do ADN espermático poderá estar comprometida mesmo quando as amostras são consideradas normozoospermicas;
- ✓ O %DFI está negativamente correlacionado com a mobilidade (a+b), concentração e vitalidade das amostras avaliadas no espermograma;
- ✓ Neste estudo, o meio C é o único cuja incubação não requer CO_2 (6%) e também o único que não apresenta um aumento significativo no %DFI ao longo do tempo (após 4 horas de incubação da amostra a 37°C ou T.A.).
- ✓ A utilização de um teste *low cost* (TB) mostra-se uma ferramenta útil para avaliação do %DFI em espermogramas.