

A influência da fragmentação da cromatina de espermatozoides na fertilização *in vitro*

Ana Carolina Fuzete Ibarra, Daniel Siquieroli Vilas Boas

Faculdade de Ciências Biológicas – Universidade Santa Cecília (UNISANTA)

E-mail: daniel@unisanta.br

Resumo: Este estudo avaliou o Índice de Fragmentação do DNA de espermatozoides pré- e pós-processamento seminal e correlacionou com as taxas de fertilização, clivagem e gravidez de casais submetidos a ciclos de reprodução assistida utilizando-se a técnica de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (ICSI). As amostras utilizadas na ICSI foram processadas pelo método de centrifugação em gradiente descontinuo e utilizadas para a fertilização. Após a ICSI as amostras pré- e pós-processadas foram analisadas quanto a integridade da cromatina, morfologia, maturidade e taxas de fertilização, clivagem e gravidez foram correlacionadas. Os valores foram expressos em porcentagem e a análise estatística realizada pelo teste ANOVA. Foram analisados 11 ciclos de ICSI, onde se constatou 54,54% de ocorrência de gravidez bioquímica e 45,46% de gravidezes que passaram do 1º trimestre com 1 abortamento. As amostras processadas mostraram um número superior de espermatozoides com a cromatina fragmentada em relação à amostra a fresco, porem com índices de espermatozoides imaturos diminuídos após processamento seminal ($p=0,0422$). As médias da morfologia foram de 4,0% de formas ovais nos casais que engravidaram e 3,2% nos casais onde houveram falhas de implantação. As médias da fragmentação da cromatina foram de 37,1% nos casais que engravidaram e 36,2% nos casais onde houveram falhas de implantação. As médias de imaturidade recuperada pós-processamento foram de 2,4% nos casais que engravidaram e 5,6% nos casais onde houveram falhas de implantação. O método de processamento seminal por gradiente descontinuo deve ser visto com cautela e aplicado caso a caso e a falha de implantação pode estar correlacionada não às taxas de fragmentação de DNA somente, mas também ao grau de maturidade do espermatozoide.

Palavras chave: cromatina, espermatozoide, fertilização *in vitro* (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI).

The influence of sperm chromatin fragmentation on *in vitro* fertilization

Abstract: This study evaluated the DNA Fragmentation Index of spermatozoa before and after seminal processing and correlated it with fertilization, cleavage, and pregnancy rates in couples undergoing assisted reproduction cycles using the Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) technique. Samples used in ICSI were processed using the discontinuous gradient centrifugation method for fertilization. After ICSI, pre- and post-processed samples were analyzed for chromatin integrity, morphology, maturity, and correlated with fertilization, cleavage, and pregnancy rates. Values were expressed as percentages, and statistical analysis was performed using ANOVA. Eleven cycles of ICSI were analyzed, revealing a 54.54% occurrence of biochemical pregnancy and 45.46% pregnancies that progressed beyond the first trimester with one abortion. Processed samples showed a higher number of spermatozoa with fragmented chromatin compared to fresh samples, but with decreased immature spermatozoa indices after seminal processing ($p=0.0422$). Morphology averages were 4.0% for oval forms in couples who conceived and 3.2% in couples with implantation failures. Chromatin fragmentation averages were 37.1% in couples who conceived and 36.2% in couples with implantation failures. Post-processing recovered immaturity averages were 2.4% in couples who conceived and 5.6% in couples with implantation failures. The discontinuous gradient seminal

processing method should be approached cautiously and applied on a case-by-case basis. Implantation failure may be correlated not only with DNA fragmentation rates but also with the degree of spermatozoa maturity.

Keywords: chromatin, spermatozoa, in vitro fertilization (IVF), intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

1. Introdução

Infertilidade pode ser definida como a inability de um casal sexualmente ativo, sem a utilização de métodos contraceptivos, de estabelecer gravidez dentro de um ano, período no qual aproximadamente 90% dos casais conseguem atingir a gestação (WHO, 1999).

Reconhecer a causa da infertilidade é essencial para definição de tratamentos individualizados. Estas podem ser de origem masculina (35%), feminina (35%) ou de ambos (20%). Em 10% dos casais não se consegue definir uma causa, sendo definida como infertilidade sem causa aparente (SHARMA et al., 2002; COLACO e SAKKAS, 2018).

A Infertilidade é um fenômeno universal que atinge aproximadamente 15 a 25% dos casais de idade reprodutiva (15-40 anos), independente dos fatores socioeconômicos ou culturais (PASQUALOTTO, 2007; HADDAD et al, 2021).

A infertilidade masculina está associada à espermatogênese em 90% dos casos. Nos 10% restantes existe uma relação causal com transporte espermático e alterações das glândulas acessórias do trato genital masculino (6%), com distúrbios da ereção (2%), distúrbios da ejaculação (1%) e com as alterações funcionais do espermatozoide e do coito (1%) (DOZORTZEV et al., 1997; ZEQUIRAJ et al, 2018; BEST et al, 2021).

O diagnóstico de infertilidade masculina depende de uma avaliação descritiva dos parâmetros do ejaculado, com ênfase na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides (PASQUALOTTO, 2007; ANBARI et al, 2020).

A análise seminal ou espermograma é rotineiramente utilizada na avaliação do trato reprodutor masculino e tem como finalidade

avaliar o homem em casais que após um ano não conseguem engravidar para avaliar o efeito de agentes gonadotóxicos e terapêuticos que podem afetar a capacidade reprodutiva do homem (GUZICK et al, 2001; KARIMI et al, 2020).

A análise seminal pode ser influenciada por outras variáveis, que refletem diretamente na metodologia, como por exemplo, tempo de abstinência sexual antes da coleta, o método de coleta (masturbação, coito utilizando preservativo apropriado ou obtenção de espermatozoides por meio invasivo), o tempo de transporte e a temperatura durante o transporte e do ambiente onde será realizado o exame podem contribuir para essa variação. (SCHEFFER et al, 2003; SUN et al, 2018)

Novas técnicas tornaram possíveis a análise estrutural e funcional do espermatozoide. Um destes métodos é a análise do Índice de Fragmentação do DNA (IFD) do espermatozoide que deve ser incorporado na rotina para análise de uma das causas da infertilidade do homem como método prognóstico e diagnóstico em eventuais falhas de implantação e aumento de taxas de abortamento. (ARANHA et al, 2006; ZARÉN et al, 2019).

O DNA íntegro do espermatozoide humano é um pré-requisito para que a fertilização e o desenvolvimento embrionário não sejam comprometidos. Espermatozoides com DNA fragmentado podem fertilizar um oócito, gerar um embrião com elevada qualidade morfológica nos primeiros estágios de desenvolvimento, e levar a falhas de implantação ou abortamento antes do fim do primeiro trimestre de gestação (AHMADI et al, 1999; MALIĆ VONČINA et al, 2021).

DNA fragmentado em excesso raramente ocorre em homens férteis, mas pode ser encontrado em 5% dos homens inférteis com qualidade seminal normal e 25% dos

homens inférteis com análise seminal alterada. Muitas vezes reversível, as causas de fragmentação do DNA incluem o uso de cigarros, algumas patologias, hipertermia, poluição atmosférica, infecção e varicocele. A indicação atual para a pesquisa do DNA dos espermatozoides é a presença de infertilidade sem causa aparente. (PASQUALOTTO, 2007; STEPHEN et al, 2020)

Danos no DNA do sêmen podem ocorrer em pelo menos três mecanismos importantes. 1) a condensação da cromatina defeituosa durante a espermiogênese, pode ser capaz de induzir danos no DNA e exercer um impacto negativo sobre a fertilidade do homem (BIANCCHI et al, 1996; SAYLAN e ERIMSAH, 2019); 2) processos de apoptose podem ter início durante a espermatogênese ou no transporte dos espermatozoides através do trato reprodutor masculino (SHEN et al, 2000; GREEN et al, 2020) e 3) o fator melhor compreendido até o presente momento como causador da fragmentação do DNA é relacionado ao estresse oxidativo resultantes de espécies reativas de oxigênio (LOPES et al, 1998; AHLERING et al, 2020).

A estrutura da cromatina do espermatozoide e as proteínas associadas ao DNA podem ser mensuradas por vários métodos, incluindo o método de Tunnel, teste do Cometa, coloração com laranja de acridina e mais recentemente utilizando metodologias associadas a citometria de fluxo (TUREK, 2005; KAAROUCH et al, 2018).

O Teste da Estrutura da Cromatina Espermática (TECE) foi desenvolvido por Evenson et al (2002) e é um teste que mensura a susceptibilidade do DNA nuclear espermático à desnaturação *in vitro* induzida pela exposição à acidez (pH=1.2). O DNA espermático com cromatina normal não desnatura nessas condições, enquanto diferentes graus de desnaturação podem ser observados se o DNA do espermatozoide estiver fragmentado. Após o tratamento ácido, os espermatozoides são corados com laranja de acridina, que se intercala a fita de DNA. A interpretação colorimétrica do teste é igual ao que é realizado utilizando-se o laranja de acridina em microscopia de fluorescência,

porém, um número muito maior de células é analisado (>1 milhão de espermatozoides) e a variação na intensidade de fluorescência vermelha, que diferencia o grau de desnaturação de cada um dos espermatozoides, é mensurado através da técnica de citometria de fluxo utilizando-se um software específico (ALVAREZ, 2003; BLACHMAN-BRAUN et al, 2020).

O Laranja de acridina possui propriedades metacromáticas e intercala-se ao DNA emitindo fluorescência verde quando liga-se à dupla-hélice de DNA intacta e fluorescência vermelha quando liga-se ao DNA desnaturado (ROUX et al., 2004; BORGES et al, 2019).

O grau de condensação da cromatina é outro parâmetro importante na avaliação da competência do espermatozoide e é avaliado através do uso da citometria de fluxo, que diferencia as histonas molécula rica em aminoácidos lisina das protaminas, proteína ricas em aminoácidos arginina e cisteína (HOFMANN e HILSCHLER, 1991; SACHDEVA et al, 2020).

A fragmentação da cromatina e sua maturidade são dois parâmetros de avaliação da funcionalidade do espermatozoide que trazem informações diferentes. Os resultados observados a partir do Índice de Fragmentação do DNA são correlacionados aos danos que o DNA do espermatozoide sofre durante a espermiogênese enquanto o índice de maturidade da cromatina está associado a eventos de compactação, estruturação da cromatina e a maturação do espermatozoide, isto é, à capacidade/competência fecundante do espermatozoide (MAJZOUN et al, 2018; YANG et al, 2019; TANG et al, 2021).

2. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivos: avaliar a qualidade seminal no dia do processo de fertilização *in vitro* quanto à presença ou não de fragmentação e maturidade do DNA espermático; correlacionar o IFD com as taxas de fertilização *in vitro*, taxa de clivagem e taxa de gravidez e grau de

maturidade; correlacionar o IFD com a morfologia do espermatozoide (incluindo o grau de maturidade seminal) e comparar o IFD pré- e pós-processamento seminal.

3. Métodos

Os dados foram coletados no período de maio a outubro de 2008, de pacientes do sexo masculino que se submeteram à FIV em uma Clínica de Reprodução Humana Assistida, no Município de Santos, SP.

O protocolo foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Santa Cecília – UNISANTA e foi iniciado somente após sua aprovação. Este trabalho respeitou todas as recomendações do CNS para pesquisas envolvendo seres humanos.

Inicialmente os participantes assinaram o TCLE para a realização da pesquisa e em seguida, responderam um questionário com perguntas relacionadas aos seus hábitos diários de vida.

Foram selecionados aleatoriamente para o projeto 11 participantes do sexo masculino com idade média de 37,1 anos de idade independentemente da qualidade seminal de suas amostras.

Análise Seminal e preparo da amostra

A coleta do sêmen foi feita na clínica pelo método de masturbação, em frasco estéril de plástico, após um período de abstinência sexual de 2 a 4 dias. Após a coleta, o sêmen foi incubado por 30 minutos a 37°C.

A amostra seminal foi avaliada segundo os critérios da OMS (WHO, 1999) através dos protocolos estabelecidos pela fabricante Invitrogênese - Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Assistida.

O processamento seminal terapêutico foi realizado pelo método de centrifugação e gradiente descontínuo utilizando o meio ISOLATE (Irvine Scientific, Sta Ana, California) seguindo-se as instruções do fabricante: 1ml de sêmen + 0,5ml do meio.

O precipitado foi ressuscitado em meio G-MOPS (Vitrolife - kungsbacka, Suécia) suplementado com 2,0mL de HSA

(Human Serum Albumina) e centrifugado por 5 minutos a 1850 rpm.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado com 1,0mL do meio. Uma alíquota de 10µL foi analisada ao microscópio de luz (Leitz, modelo 512885) com a magnificação de 200x para verificar concentração e motilidade das células.

Após a realização da fertilização *in vitro* pela técnica ICSI o sêmen fresco remanescente e o sêmen processado foram alíquotados em frascos (criotubos – Corning) de 1,8mL e mergulhados em Nitrogênio líquido a -196°C para posterior análise da fragmentação da cromatina do espermatozoide.

Foram preparadas 2 lâminas através do método estrito de Kruger (Kruger et al, 1986) de cada amostra.

Teste da Estrutura da Cromatina Espermática (TECE)

As alíquotas de sêmen foram descongeladas em banho maria a 37°C, diluídas com tampão TNE (0,15M NaCl, 0,01M Tris-HCl, 0,001M EDTA dissódico, pH=7,4 e 10% glicerol) em uma concentração de $1-2 \times 10^6$ espermatozoides por mL. Alíquotas de 200µL das amostras diluídas foram adicionados a 400µL de solução de ácido-detergente (0,08M HCl, 0,15M NaCl, 0,1% Triton X-100, pH=1,2). Após 30 segundos, as células foram coradas pela adição de 1,2mL de solução de alaranjado de acridina (AA) contendo 6µg de AA (purificado cromatograficamente; Polysciences, Warrington, PA, USA) por mL de tampão (0,037M ácido cítrico, 0,126M Na₂HPO₄, 0,0011M EDTA dissódico, 0,015M NaCl, pH=6,0). Três minutos após o início do processo de coloração, as amostras foram analisadas, utilizando-se um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, New Jersey, EUA). A fluorescência verde (FL1) foi captada através de um filtro “bandpass” de 515-545nm, e a fluorescência vermelha (FL3) foi captada por filtro “longpass” de 650nm.

Os dados foram analisados pelo programa BD CellQuest™ Pro (BD Biosciences). A extensão da desnaturação do DNA foi quantificada pelo parâmetro IFD

(IFD = número de espermatozoides com DNA desnaturado) dividido pela soma de espermatozoides com DNA desnaturado e nativo) (EVENSON et al, 2002).

Após 24 horas da realização do esfregaço as lâminas foram coradas pelo método panótico rápido (Laborclin) seguindo-se as instruções do fabricante para a análise da morfologia.

O estudo da morfologia dos espermatozoides foi realizado em microscópio Modelo N-180M com régua ocular e magnificação de 1000x sob óleo de imersão.

Avaliação dos Resultados das Técnicas de Reprodução Assistida

Taxa de gestação por transferência: Número de pacientes grávidas dividido por número de pacientes que realizaram transferência de embriões.

Taxa de gestação por ciclo: Número de pacientes grávidas dividido pelo número de ciclos realizados.

Taxa de Fertilização: Número de oócitos fertilizados dividido pelo número de oócitos inseminados (FIV ou ICSI).

Taxa de Clivagem: Número de oócitos que sofreram divisão celular dividido pelo número de oócitos fertilizados.

Taxa de implantação: Número de sacos gestacionais observados dividido pelo número de embriões transferidos.

Análise Estatística

Os valores foram expressos em porcentagem e a análise estatística realizada pelo teste ANOVA utilizando o programa BioEstat V 1.0.

4. Resultados

Os resultados mostram taxas de gravidez bioquímica de 54,54% (6/11) e 45,46% de gestações que ultrapassaram o primeiro trimestre sem intercorrências. Neste estudo constatou-se que das 11 pacientes submetidas ao tratamento 5 pacientes não engravidaram e em uma paciente ocorreu abortamento nas primeiras semanas de gestação. Os resultados obtidos foram tabulados e estão mostrados na tabela 1.

Tabela 1 - Análise quantitativa dos aspectos que influenciam o sucesso da gravidez.

Pacientes	Espermatozóide							Oócitos				Taxa Fertilização	Taxa Clivagem	GRAVIDEZ
	% Pré IFD	% Pós IFD	[] Pré	[] Pós	% CDE Pré	% CDE Pós	Morfologia Normal (Pré)	MI	MII	VG	Taxa MII			
1	28,78%	69,07%	10x10 ⁶	8x10 ⁶	14,04	1,59	2	0	8	1	89%	100%	100%	Positivo
2	9,35%	26,11%	15x10 ⁶	9x10 ⁶	17,76	6,1	6	1	5	2	71%	100%	100%	Positivo
3	11,82%	19,45%	39x10 ⁶	15x10 ⁶	8,49	0,93	2	1	5	0	86%	86%	100%	Positivo
4	45,76%	63,68%	16x10 ⁶	19x10 ⁶	4,94	1,58	4	2	6	2	60%	60%	100%	Positivo
5	16,31%	50,36%	27x10 ⁶	20x10 ⁶	14,87	1,61	6	2	6	2	60%	90%	100%	Positivo
6	13,79%	25,92%	26x10 ⁶	16x10 ⁶	13,03	2,57	4	1	5	1	71%	80%	100%	Positivo
7	50,09%	55,02%	45x10 ⁶	25x10 ⁶	6,47	1,72	4	1	2	1	50%	100%	100%	Negativo
8	33,83%	33,46%	6x10 ⁶	1x10 ⁶	12,28	7,71	2	3	5	9	24%	0%	0%	Negativo
9	7,38%	7,97%	38x10 ⁶	17x10 ⁶	13,52	1,53	6	0	3	0	100%	67%	100%	Negativo
10	11,07%	38,11%	48x10 ⁶	30x10 ⁶	16,32	0,96	4	3	2	2	25%	100%	100%	Negativo
11	33,14%	46,23%	6 spz	500 mil	30,05	15,86	0	0	9	0	100%	89%	100%	Negativo

Foram obtidos 90 oócitos no total, com média de 8,18 oócito por paciente, média de oócitos maduros de 5,09 por paciente e as médias das taxas de fertilização e clivagem de 79,27% e 81,81%, respectivamente.

As análises seminais mostraram médias de volume de 2,68 mL, concentração pré- de 27,54x10⁶/mL de ejaculado e de pós-

processamento 14x10⁶/mL de ejaculado, motilidade (A+B) pré de 37,45% e pós processamento 70,45%. A média de morfologia observada para estes pacientes foi de 3,63% para espermatozoides normais.

Depois de estabelecido o padrão seminal dos participantes, as amostras de sêmen pré- e pós-processados foram

submetidos ao TECE pelo método de Citometria de Fluxo e os resultados obtidos mostraram uma correlação significativa quanto ao grau de fragmentação do DNA dos espermatozoides pré- e pós-processados. Foi

observado que os espermatozoides após processamento seminal apresentavam um grau de fragmentação da cromatina superior ao sêmen fresco como mostrado na figura 1.

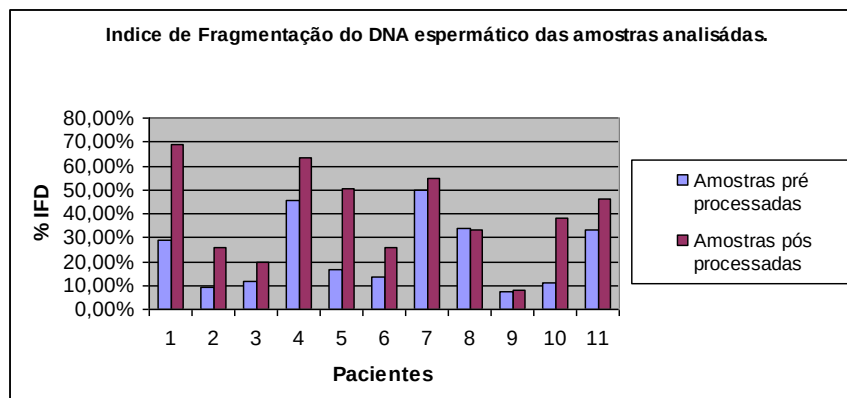


Figura 1 – Porcentagem da Fragmentação espermática das amostras pré e pós-processadas.

Conforme descrito na tabela 1 a média de IFD das amostras pré-processadas foi de 23,75% ($\pm 15,2$), sendo o índice mais alto de 50,09% e o índice mais baixo de 7,38%. Nas amostras pós-processadas a média de IFD foi de 39,58% ($\pm 19,1$) sendo que o índice mais alto foi de 69,07% e o índice mais baixo foi de 7,97% ($p=0,0422$). As médias de IFD pós de pacientes grávidas foi de 37,10% em relação a 36,16% nas pacientes que tiveram falhas de implantação.

Concomitantemente às análises de fragmentação da cromatina foram analisadas o grau de imaturidade dos espermatozoides (CDE) pré- e pós-processamento. Os dados obtidos desta análise mostrados na tabela 1, evidenciaram que a média de CDE das amostras pré-processadas foi de 13,08% ($\pm 5,6$), sendo que o índice mais alto foi 30,05% e o índice mais baixo foi 4,98%, a média das amostras de CDE pós-processadas foi de 3,83% ($\pm 4,5$), sendo que o índice mais alto foi de 15,86% e o índice mais baixo foi de 0,96%.

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a média de espermatozoides imaturos recuperados (pós-processamento) nas amostras que geraram gravidez foi de 2,39% em relação a 5,55% de espermatozoides imaturos recuperados das

amostras seminais dos casais que não engravidaram ou perderam a gestação.

Ao compararmos a morfologia espermática, observou-se uma média de formas normais de 3,63%. Contudo ao compararmos os casais com gestação em curso em relação aos casais que tiveram falhas de implantação ou abortamento as médias observadas em relação à morfologia estrita foram de 4,0% com gestação positiva e 3,2% para os casais com falhas de implantação.

5. Conclusões

O método de processamento seminal por gradiente descontínuo deve ser visto com cautela e aplicado caso a caso e a falha de implantação pode ser correlacionada não somente às taxas de fragmentação de DNA, mas também ao grau de maturidade do espermatozoide.

6. Referências Bibliográficas

AHLERIN P, SUTOVSKY M, GLIEDT D, BRANSON K, MIRANDA VIZUETE A, SUTOVSKY P. Sperm content of TXNDC8 reflects sperm chromatin structure, pregnancy

establishment, and incidence of multiple births after ART. *Syst Biol Reprod Med*. 2020 Oct;66(5):311-321.

AHMADI A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool*. 284:696–704;1999.

ALVAREZ, J. G. DNA fragmentation in human spermatozoa: significance in the diagnosis and treatment of infertility. *Minerva Ginecologica*, v. 55, p. 233-239, 2003.

ANBARI F, KHALILI MA, AGHA-RAHIMI A, MALEKI B, NABI A, ESFANDIARI N. Does sperm DNA fragmentation have negative impact on embryo morphology and morphokinetics in IVF programme? *Andrologia*. 2020 Dec;52(11):e13798.

ARANHA, A. V. et al. Sperm fragmentation compromises ICSI outcome. Recife, 2006.

BEST JC, KOHN T, PATEL P, BLACHMAN-BRAUN R, DE QUADROS E, BEYHAN Z, JACOBS M, RAMASAMY R. Elevated sperm DNA fragmentation does not predict recurrent implantation failure. *Andrologia*. 2021 Aug;53(7):e14094.

BIANCHI PG, MANICARDI GC, URNER F, CAMPANA A, SAKKAS D. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 2:139–144;1996.

BLACHMAN-BRAUN R, BEST JC, SANDOVAL V, LOKESHWAR SD, PATEL P, KOHN T, JACOBS M, RAMASAMY R. Sperm DNA fragmentation index and high DNA stainability do not influence pregnancy success after intracytoplasmic sperm injection. *F S Rep*. 2020 Dec;1(3):233-238.

BORGES E JR, ZANETTI BF, SETTI AS, BRAGA DPAF, PROVENZA RR, IACONELLI A JR. Sperm DNA fragmentation is correlated with poor embryo development, lower implantation rate, and

higher miscarriage rate in reproductive cycles of non-male factor infertility. *Fertil Steril*. 2019 Sep;112(3):483-490.

COLACO S, SAKKAS D. Paternal factors contributing to embryo quality. *J Assist Reprod Genet*. 2018 Nov;35(11):1953-1968.

DOZORTSEV, D.; CAÍN, C.; ERMILOV, A.; et al. Sperm-associated oocyte-activating factor is released from the spermatozoon within 30 minutes after injection as a result of the sperm-oocyte interaction. *Human Reproduction*, n.12, p.2793-2796. 1997.

EVENSON DP, LARSON KL, JOST LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*. 23:25-43; 2002.

GREEN KA, PATOUNAKIS G, DOUGHERTY MP, WERNER MD, SCOTT RT JR, FRANASIAK JM. Sperm DNA fragmentation on the day of fertilization is not associated with embryologic or clinical outcomes after IVF/ICSI. *J Assist Reprod Genet*. 2020 Jan;37(1):71-76.

GUZICK D, JAMES W. OVERSTREET, PAMFACTOR L, CHARLENEK B, STEVENT N, CHRISTO S, CARSON S, CISNEROS P, STEINKAMPF M, HILL J, PHIL D,48VOGEL A,. For The National Cooperative Reproductive Medicinenetk N Engl J Med, Vol. 345, n. 19, 2001.

HADDAD M, STEWART J, XIE P, CHEUNG S, TROUT A, KEATING D, PARRELLA A, LAWRENCE S, ROSENWAKS Z, PALERMO GD. Thoughts on the popularity of ICSI. *J Assist Reprod Genet*. 2021 Jan;38(1):101-123.

HOFMANN, N.; HILSCHLER, B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Human reproduction*, v.6, p. 979-982, 1991.

KAAROUCH I, BOUAMOUD N, MADKOUR A, LOUANJLI N, SAADANI B, ASSOUS, ABOULMAOUAHIB S, AMZAZI S, Copin H, Benkhalifa M, Sefrioui O. Paternal age: Negative impact on sperm genome decays and IVF outcomes after 40 years. *Mol Reprod Dev.* 2018 Mar;85(3):271-280.

KARIMI ZARCHI M, MALEKI B, DEHGHANI ASHKEZARI M, MOTAMED ZADEH L, AGHA-RAHIMI A. The Effects of In Vitro Incubation of Asthenoteratozoospermic Semen after Density Gradient Centrifugation at Room Temperature and 37°C on Sperm Parameters, Chromatin Quality and DNA Fragmentation in a Short Time Period. *J Reprod Infertil.* 2020 Oct-Dec;21(4):275-282.

KRUGER, T. F.; MENKVELD, R.; STANDER, F. S., et al. Sperm Morphologic Features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, v. 46, p. 1118-1123, 1986.

LOPES S, SUN JG, JURISICOVA A, MERIANO J, CASPER RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 69:528–32, 1998.

MAJZOUB A, ARAFA M, MAHDI M, AGARWAL A, AL SAID S, AL-EMADI I, EL ANSARI W, ALATTAR A, AL RUMAIHI K, Elbardisi H. Oxidation-reduction potential and sperm DNA fragmentation, and their associations with sperm morphological anomalies amongst fertile and infertile men. *Arab J Urol.* 2018 Feb 1;16(1):87-95.

MALIĆ VONČINA S, STENQVIST A, BUNGUM M, SCHYMAN T, GIWERCMAN A. Sperm DNA fragmentation index and cumulative live birth rate in a cohort of 2,713 couples undergoing assisted reproduction treatment. *Fertil Steril.* 2021 Dec;116(6):1483-1490.

PASQUALOTTO, F. F. Investigação e reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* Rio de Janeiro, v.29, no.2, p.103-112, Fev 2007.

ROUX, C.; TRIPOGNEY, C.; JOANNE, C.; BRESSON, J. L. Nuclear quality of the spermatozoon: exploration tests of the chromatin of human spermatozoa (nuclear proteins). *Gynecologie Obstetrique & Fertilité*, v. 32, p. 792-798, 2004.

SACHDEVA K, UPADHYAY D, NERI JG, VARGHESE MM, SINGH K, ALBUZ FK, AUJERO MV, SOLKAR S, STEVIKOVA M, PERAMO B. Semen Quality is Associated with Sperm Aneuploidy and DNA Fragmentation in the United Arab Emirates Population. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2020 Apr;24(4):195-203.

SAYLAN A, ERIMSAH S. High quality human sperm selection for IVF: A study on sperm chromatin condensation. *Acta Histochem.* 2019 Oct;121(7):798-803.

SHARMA V, ALLGAR V, RAJKHOWA M. Factors influencing the cumulative conception rate and discontinuation of in vitro fertilization treatment for infertility. *Fertility and Sterility*, vol. 78, p. 40-46, July 2002.

SCHEFFER BB, REMOHÍ J, VELASCO JG, PELLICER A, SIMÓN C. *Reprodução Humana Assistida.* São Paulo: Atheneu, 565p, 2003.

SHEN H, ONG C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med.* 28:529–36; 2000.

STEPHEN S, DEVARAJ R, MITHRAPRABHU S, BERTOLLA RP, MAHENDRAN T. Sperm chromatin structure assay versus sperm chromatin dispersion kits: Technical repeatability and choice of assisted

reproductive technology procedure. Clin Exp Reprod Med. 2020 Dec;47(4):277-283.

SUN TC, ZHANG Y, LI HT, LIU XM, YI DX, TIAN L, LIU YX. Sperm DNA fragmentation index, as measured by sperm chromatin dispersion, might not predict assisted reproductive outcome. Taiwan J Obstet Gynecol. 2018 Aug;57(4):493-498.

TANG L, RAO M, YANG W, YAO Y, LUO Q, LU L, WANG L, ZHAO S. Predictive value of the sperm DNA fragmentation index for low or failed IVF fertilization in men with mild-to-moderate asthenozoospermia. J Gynecol Obstet Hum Reprod. 2021 Jun;50(6):101868.

TUREK PJ. Practical approaches to the diagnosis and management of male infertility. Nat Clin Pract Urol.2(5):226-38;2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus

Interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.

YANG H, LI G, JIN H, GUO Y, SUN Y. The effect of sperm DNA fragmentation index on assisted reproductive technology outcomes and its relationship with semen parameters and lifestyle. Transl Androl Urol. 2019 Aug;8(4):356-365.

ZARÉN P, ALSON S, HENIC E, BUNGUM M, GIWERCMAN A. Interaction between serum levels of Anti-Mullerian Hormone and the degree of sperm DNA fragmentation measured by sperm chromatin structure assay can be a predictor for the outcome of standard in vitro fertilization. PLoS One. 2019 Aug 8;14(8):e0220909.

ZEQIRAJ A, BEADINI S, BEADINI N, ALIU H, GASHI Z, ELEZAJ S, BEXHETI S, SHABANI A. Male Infertility and Sperm DNA Fragmentation. Open Access Maced J Med Sci. 2018 Aug 14;6(8):1342-1345.