

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso Biomedicina

Gustavo Baucke dos Santos
Helena Santiago de Gouveia

**AUMENTO NA FRAGMENTAÇÃO DO DNA ESPERMÁTICO E ALTERAÇÕES NA
MORFOLOGIA E MORFOCINÉTICA EMBRIONÁRIA**

São Paulo

2023

Gustavo Baucke dos Santos
Helena Santiago de Gouveia

**AUMENTO NA FRAGMENTAÇÃO DO DNA ESPERMÁTICO E ALTERAÇÕES NA
MORFOLOGIA E MORFOCINÉTICA EMBRIONÁRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Renato Borges Tesser, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2023

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Santos, Gustavo Baucke dos

Aumento na fragmentação do DNA espermático e alterações na morfologia e morfocinética embrionária / Gustavo Baucke dos Santos, Helena Santiago de Gouveia. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2023.

43 p.

Orientação de Renato Borges Tesser.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2023.

1. Desenvolvimento embrionário 2. Estruturas embrionárias – anatomia e histologia 3. Fragmentação do DNA I. Gouveia, Helena Santiago de II. Tesser, Renato Borges III. Centro Universitário São Camilo IV. Título

CDD: 611.013

**Gustavo Baucke dos Santos
Helena Santiago de Gouveia**

**AUMENTO NA FRAGMENTAÇÃO DO DNA ESPERMÁTICO E ALTERAÇÕES NA
MORFOLOGIA E MORFOCINÉTICA EMBRIONÁRIA**

**Prof. Dr. Renato Borges Tesser
(Orientador)**

**M.sc Rodrigo Alessandro Riemma Vela – Centro Universitário São Camilo
(Banca Interna)**

**M.Sc Thais Serzedello de Paula
(Banca Externa)**

AGRADECIMENTOS

Aos nossos familiares, Rosana, Sabino, Ruth, Andrea, Anderson e Matheus que sem o apoio e suporte deles em nossa educação, a conquista deste sonho não seria possível.

À minha irmã, Amanda, que sempre me incentivou e acreditou no meu potencial e fez com que eu nunca desistisse mesmo em momentos de aflição.

À minha afilhada, Lívia, motivo da minha maior alegria e fez com que eu sempre tivesse um motivo para seguir em frente.

Aos nossos amigos que compartilharam a angústia do dia a dia conosco nesses quatro anos e fizeram tudo se tornar mais alegre, obrigada Marcela, Giulia, Moisés, Carolina, Bruna, Danielly, Luana e Monique, sem eles não haveriam memórias tão maravilhosas da graduação.

Aos nossos amigos de vida, Natasha, Giulia, Leonardo e Lucas, que sempre nos entenderam nos períodos de ausência e compartilharam, mesmo de longe, nossa evolução.

À Thais Serzedello de Paula, por todo o suporte desde à escolha do tema, às conversas que aliviaram nossa ansiedade.

Ao nosso orientador, Renato Borges Tesser, que além de nos ajudar na evolução do trabalho, nos orientou por muitos semestres na nossa querida Liga Acadêmica de Reprodução Humana e Genética.

Ao Centro Universitário São Camilo, por todos os profissionais e sua infraestrutura.

E a nós, sim, por termos trabalhado tão bem juntos e sempre buscando um equilíbrio entre amizade e trabalho, onde conseguimos melhorar em muitos aspectos.

Agradecemos à todos que não soltaram nossa mão!

RESUMO

De acordo com a OMS, a infertilidade é um fenômeno que acomete de 8 a 15% dos casais em idade reprodutiva, sem relações com etnias e posições socioeconômicas, a infertilidade masculina é responsável por aproximadamente 50% dos casos. Com a inserção do teste de Fragmentação do DNA Espermático para a observação mais precisa do fator masculino, além do Espermograma, a avaliação da fertilidade está mais abrangente e trouxe novos questionamentos relacionados ao impacto direto da alta taxa de Fragmentação do DNA Espermático com o desenvolvimento do embrião. A escolha do embrião para a transferência embrionária ainda é um grande desafio, por muitos anos esta escolha era feita apenas com base na morfologia estática do desenvolvimento que o embrião apresenta, mas com a inserção de novas tecnologias e com a utilização de *softwares* acoplados em incubadoras, existem novas perspectivas sobre a escolha do melhor embrião. A *Time-lapse* traz uma nova visão sobre os parâmetros esperados do desenvolvimento desde o momento da fertilização até o estágio final do blastocisto. Neste presente estudo teve como objetivo correlacionar o aumento da taxa de FDE com possíveis alterações na morfologia e morfocinética embrionária, para isso foi realizado uma revisão bibliográfica narrativa a partir de livros e artigos em português e inglês com intervalo cronológico entre 2013 a 2023, utilizando descritores específicos como critério de inclusão, como número de embriões analisados, tipo de fertilização, alterações descritas e método de análise de FDE. Foi encontrado uma relação entre o aumento da taxa de FDE e atraso morfocinético do embrião, ressaltando a hipótese que o aumento da taxa de FDE pode gerar embriões mais lentos em seu desenvolvimento, as principais alterações morfocinéticas encontradas nos estudos analisados se encontram nas primeiras divisões celulares, sendo a primeira clivagem a principal afetada, entretanto o atraso das primeiras clivagens levam ao desenvolvimento mais lento do embrião até o estágio de blastocisto. O aumento da taxa de FDE também pode afetar em classificações morfológicas posteriores, gerando uma maior fragmentação dos blastômeros e levando a uma diminuição na evolução de mórula à blastocisto, acarretando em embriões com menor taxa de implantação e gravidez clínica. Portanto todos os fatores morfológicos e morfocinéticos devem ser considerados para a escolha do melhor embrião que será utilizado para a transferência embrionária.

Palavras-chave: fragmentação do DNA espermático; morfologia embrionária; morfocinética embrionária e desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

According to the WHO, infertility is a phenomenon that affects 8 to 15% of couples on reproductive age, with no relation to ethnicity and socioeconomic position, male infertility is responsible for approximately 50% of cases. With the insertion of the Sperm DNA Fragmentation test for a more precise observation of the male factor, in addition to the Spermogram, the fertility assessment is more comprehensive and has brought new questions related to the direct impact of the high rate of Sperm DNA Fragmentation on embryo development. The choice of the embryo for embryonic transfer is still a great challenge, for many years this choice was made only based on the static morphology of the development that the embryo presents, but with the insertion of new technologies and with the use of software coupled in incubators, there are new perspectives on the choice of the best embryo. Time-lapse brings a new view on the expected parameters of development from the moment of fertilization to the final stage of the blastocyst. This present study aimed to correlate the increase in the FDE rate with possible changes in embryonic morphology and morphokinetics, for this a narrative bibliographic review was carried out from books and articles in Portuguese and English with a chronological interval between 2013 to 2023, using specific descriptors as inclusion criteria, such as the number of embryos analyzed, type of fertilization, described alterations and FDE analysis method. A relationship was found between the increase in the FDE rate and the morphokinetic delay of the embryo, highlighting the hypothesis that the increase in the FDE rate can generate slower embryos in their development, the main morphokinetic alterations found in the studies analyzed are in the first cell divisions, being the first cleavage the main affected, however the delay of the first cleavages leads to slower development of the embryo until the blastocyst stage. The increase in the FDE rate can also affect later morphological classifications, generating greater fragmentation of the blastomeres and leading to a decrease in the evolution of morula to blastocyst, resulting in embryos with a lower implantation rate and clinical pregnancy. Therefore, all morphological and morphokinetic factors must be considered for the choice of the best embryo that will be used for embryonic transfer.

Key words: *sperm DNA fragmentation; embryo morphology; embryo morphokinetics and embryo development.*

LISTA DE SIGLAS

D3	Dia 3 do desenvolvimento embrionário
D5	Dia 5 do desenvolvimento embrionário
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDE	Fragmentação do DNA Espermático
FIV	Fertilização in vitro
hpi	Horas pós Inseminação
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides
MCI	Massa Celular Interna
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI	Prófase I
RHA	Reprodução Humana Assistida
SCD	<i>Sperm Chromatin Dispersion</i>
SCSA	<i>Sperm Chromatin Structure Assay</i>
SERs	Aglomerado de Retículo Endoplasmático
t2	Tempo de clivagem de dois blastômeros
t3	Tempo de clivagem de três blastômeros
t4	Tempo de clivagem de quatro blastômeros
t5	Tempo de clivagem de cinco blastômeros
t6	Tempo de clivagem de seis blastômeros
t7	Tempo de clivagem de sete blastômeros
t8	Tempo de clivagem de oito blastômeros
t9	Tempo de clivagem de nove blastômeros
tB	Tempo de blastocisto
tE	Início da expansão do blastocisto

tHB Blastocisto totalmente eclodido

TL *Time-Lapse*

tM Tempo de mórula

tPB2 O 2º corpúsculo polar está completamente destacado do oolema

tPN Tempos de aparecimento e desvanecimento dos pronúcleos

tPNa Tempo de aparecimento dos pronúcleos

tPNf Tempo de desaparecimento dos pronúcleos

tSB Tempo de início de formação da cavidade do blastocisto

tSC Primeira evidência de compactação

TUNEL *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling assay*

ZP Zona Pelúcida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVO.....	21
2.1.OBJETIVO GERAL.....	21
2.2.OBJETIVO ESPECÍFICO	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
4. DESENVOLVIMENTO	23
4.1.CORRELAÇÃO ENTRE MORFOCINÉTICA E A FRAGMENTAÇÃO DO DNA ESPERMÁTICO.....	23
4.1.1. ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOCINÉTICAS.....	28
4.2.CORRELAÇÃO ENTRE MORFOLOGIA E A FRAGMENTAÇÃO DO DNA ESPERMÁTICO.....	32
5. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a OMS cerca de 15% dos casais que desejam ter filhos, não obtêm sucesso (SBRA, 2022). A infertilidade masculina é responsável por aproximadamente 50% dos casos e suas causas variam muito, desde fatores congênitos, adquiridos, até fatores idiopáticos que prejudicam a espermatogênese (AGARWAL, 2021). A maternidade e paternidade podem ser alcançadas através da Reprodução Humana Assistida (RHA), mas diversos fatores podem prejudicar a fertilidade, como a fragmentação do DNA espermático que pode comprometer a contribuição genética do fator masculino e seu dano não é visto na Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), técnica mais utilizada atualmente nos laboratórios de reprodução assistida devido a maior taxa de fertilização em relação a FIV clássica e inseminação intrauterina (BOULET, 2015).

Atualmente o exame de Fragmentação do DNA Espermático (FDE) foi inserido na prática clínica, visto que anteriormente o espermograma era utilizado como fator preditivo para diagnóstico de infertilidade masculina. Com a implementação deste exame a análise espermática está ainda mais completa, não só com a análise tradicional de fatores macroscópicos, como a morfologia, vitalidade e concentração espermática, mas com a consideração do grau de fragmentação do DNA encontrado na amostra seminal, sendo assim tendo uma análise mais ampla dos casos de infertilidade masculina (EVANGELINI EVGEN, 2023).

Evidências demonstram a hipótese do estresse oxidativo, ocasionado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio como uma hipótese para alterações na função testicular e qualidade espermática afetando a estabilidade do DNA espermático (DUTTA, Sulagna et al., 2019).

A fragmentação do DNA espermático (FDE), ocorre em fita simples ou dupla fita do DNA, sendo classificada por dois principais mecanismos. O primeiro mecanismo é o testicular, devido a compactação da cromatina onde pode seguir para mecanismos apoptóticos induzidos pelo próprio espermatozoide ou devido à quebra do DNA na troca das histonas enoveladas por protaminas, processo chamado de protaminação (SIMON, Dluke et al., 2019).

O segundo principal mecanismo indutor da FDE é o estresse oxidativo, este gerado por diversos fatores como: obesidade, tabagismo ou varicocele. O estresse oxidativo é o acúmulo de radicais livres, que em doses normais auxiliam no funcionamento da

célula através do equilíbrio do sistema de espécies reativas de oxigênio (EROs) e antioxidantes endógenos. Em caso de desregulação desses sistemas com aumento de antioxidantes podemos ter um estresse redutor ou em aumento expressivo de EROs podemos ter o estresse oxidativo, já interrelacionado com o processo de fragmentação do DNA espermático (AGARWAL, 2020).

Atualmente existem 4 principais testes para analisar o grau da fragmentação do DNA espermático. O teste SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*) baseia-se no conceito de que os espermatozoides íntegros produzem um halo de laços de DNA, enquanto o que possui DNA fragmentado não produzirá este halo, porém este teste analisa apenas fragmentação em duplas fitas de DNA (HAMILTON, 2020). A análise por *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA) aplica o princípio da susceptibilidade à fragmentação, adicionando uma solução desnaturante e uma análise através de citometria de fluxo, analisando a fragmentação de fita simples e dupla. (BORGES, Edson et al., 2020).

Outra análise da fragmentação do DNA pode ser realizada à partir do ensaio COMETA onde é realizada a corrida dos espermatozóides em um gel de agarose e adição de uma substância de lise para observação da fragmentação do DNA simples e fita dupla pela cauda em formato de cometa (ALVES, 2015). Já a análise por TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) é realizada a incorporação de nucleotídeos dUTP fluorescentes que se associam a quebra de DNA fita simples e dupla na porção 3'OH (RIBEIRO, 2017).

Em novos estudos está sendo muito discutida a possível relação entre o aumento da fragmentação do DNA espermático e alterações no desenvolvimento da morfologia embrionária, como na massa celular interna (MCI), formação do blastocisto (ANBARI, 2020) ou até mesmo em parâmetros de clivagem relacionados a morfocinética embrionária (ESBERT, 2018).

Desde o nascimento do primeiro bebê de proveta em 1978, a reprodução humana assistida tem sido cada vez mais aprimorada e mais estudada. Porém, mesmo com tantas evoluções nesses 45 anos, a RHA ainda apresenta grandes desafios, a escolha do melhor embrião para transferência embrionária é uma delas (SBRA, 2021).

A escolha do embrião para a transferência embrionária é embasada em dois principais fatores, sendo um deles a genética embrionária que pode ser analisada a partir da técnica de biópsia e a morfologia embrionária que é um conjunto da análise

do desenvolvimento do embrião desde a fertilização até dia seis ou sete (PRONUCLEO, 2021).

A análise do desenvolvimento do zigoto a blastocisto, chamada de morfologia embrionária, foi desenvolvida por David Gardner há mais de 30 anos. De acordo com que esta análise foi implementada na rotina clínica diversos fatores laboratoriais que influenciam nesta morfologia como a suplementação dos meios de cultivo, alteração de temperatura, umidade e gases. Além de fatores não laboratoriais que afetam diretamente esse desenvolvimento como a idade materna, qualidade oocitária, integridade e qualidade espermática. (GARDNER & SCHOOLCRAFT, 1999).

Apesar de ser considerada uma análise antiga e possuir um grau de variação de leitura interprofissional, ela continua sendo a técnica não invasiva mais utilizada para escolha embrionária, visto que estudos já demonstraram que embriões com uma morfologia embrionária classificada como "*top quality*" (>3AA) possuem maiores chances de implantação uterina, gravidez e até mesmo menores chances de abortos espontâneos (BALABAN, 2011; GARDNER, David K, 2016).

Em cada dia do desenvolvimento embrionário existe um padrão específico do que se é esperado para o embrião e este padrão é estabelecido de acordo com os dias do desenvolvimento. A primeira análise se dá de 16 a 18 horas após a fertilização, para a observação dos dois pronúcleos. O padrão de avaliação deve advir da semelhança de tamanho, posicionamento central em relação ao zigoto e justaposição. (RICARDO MARQUES DE AZAMBUJA, 2017).

A ausência do segundo pronúcleo na análise pode ocorrer devido ao desaparecimento mais rápido do que o previsto, indicando um embrião com desenvolvimento acelerado, sendo necessário o rigor de observação no período correto, ou pode ocorrer devido à ausência de fertilização. Neste caso deve-se seguir a observação nos próximos dias de desenvolvimento embrionário e em caso de degeneração ou estagnação, realizar o descarte do material (MIZRAHI, 2021).

Na análise em dia 3 (D3) observam-se alguns fatores como o número de células, simetria e fragmentação dos blastômeros e citoplasma. O esperado para este dia é um embrião com 7 a 8 blastômeros e com nenhuma ou baixa taxa de fragmentação. (RICARDO MARQUES DE AZAMBUJA, 2017).

A fragmentação dos blastômeros é classificada de A (fragmentação ausente) até D (fragmentação superior a 50% do embrião). A literatura cita que embriões com 6

blastômeros ou fragmentação acima de 20% influencia diretamente nas taxas de implantação e em casos de fragmentação acima de 50% do embrião abaixa as chances de implantação para menos de 5% (BALABAN, 2011; GARDNER, David K, 2016).

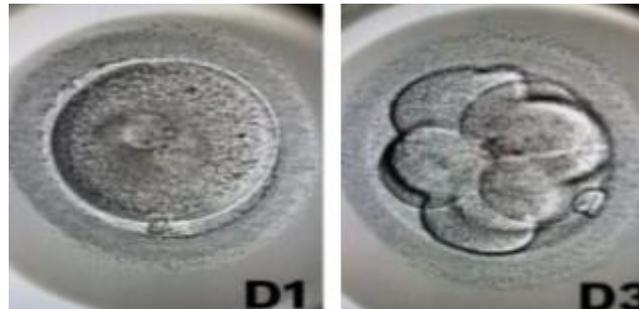


FIGURA 1: Desenvolvimento embrionário em dia 1 (D1) e dia 3 (D3)

D1: Zigoto em primeiro dia de desenvolvimento com aparecimento dos pronúcleos materno e paterno centralizados. D3: Embrião em terceiro dia de desenvolvimento, espera-se presença de 6-10 blastômeros com grau de fragmentação baixo ou ausente. Fonte: Adaptado IPGO.

No quinto dia (D5) de desenvolvimento embrionário se observa o estágio de blastocisto, onde pela classificação de Gardner o embrião possui uma nomenclatura que se considera a expansão da cavidade blastocística e trofotoderma respectivamente (EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN REPRODUCTION AND EMBRYOLOGY, 2015). O embrião após o estágio de mórula realiza a diferenciação celular para duas linhagens celulares, as células da massa celular interna e as células do trofotoderma. Durante esta diferenciação o embrião forma uma camada chamada de cavidade blastocística que é preenchida de líquido e de acordo com a expansão desta camada o embrião pode obter uma classificação de 1 a 6, sendo 4 a expansão completa da cavidade, 5 o começo da eclosão do embrião da zona pelúcida (ZP) e a classificação 6 temos o embrião completamente fora da ZP (ABBEEL et al., 2013).

Quadro 1: Sistema de Classificação de Gardner e Schoolcraft (1999).

Tamanho e Expansão	
Classificação	Descrição

1	Blastocisto inicial: cavidade blastocística equivale a <50% do volume do embrião.
2	Blastocisto: cavidade blastocística é ≥50% do volume do embrião
3	Blastocisto de cavidade completa: a cavidade blastocística preenche completamente o embrião.
4	Blastocisto expandido: o volume da cavidade do blastocisto é maior que o do embrião inicial e a zona pelúcida está diminuindo.
5	Blastocisto em <i>hatching</i> : o trofotoderma começou a herniar através da zona pelúcida.
6	Blastocisto com <i>hatching</i> completo: o blastocisto deixou completamente a zona pelúcida.
Massa Celular Interna (MCI)	
Classificação	Descrição
A	Muitas células empacotadas firmemente.
B	Várias células frouxamente agrupadas.
C	Poucas células.
Trofotoderma (TE)	
Classificação	Descrição
A	Muitas células do mesmo tamanho formando um epitélio aderido.
B	Poucas células.
C	Muitas poucas células formando um epitélio frouxo.

Fonte: Adaptado de PUGA-TORRES *et al.*, 2017.

Nota: Quadro relacionado a classificação morfológica, sendo a coluna esquerda relacionada ao desenvolvimento da cavidade do blastocisto e as duas linhas inferiores relacionadas a classificação do embrião de acordo com a massa celular interna e trofotoderma respectivamente, classificadas de “A” até “C”

As células da massa celular interna (MCI) posteriormente formarão o feto e as células do trofotoderma (TE) irão contribuir para a formação da placenta e anexos embrionários. Essas células são classificadas de acordo com a quantidade e adesão

de A até C, da melhor a pior classificação. O embrião que possui células “A” possui grande número de células bem aderidas, já o embrião C possui células mais escassas e espaçadas entre si, sendo assim, embriões considerados “top-quality”, são aqueles que apresentam uma classificação acima de 3AA (WARSHAVIAK *et al.*, 2019).

Apesar de existirem outros fatores relacionados a escolha do embrião para a transferência, um embrião com uma classificação morfológica melhor possui maiores chances de implantação, de gravidez clínica e menores chances de abortos espontâneos (JÚNIOR, Edson Borges, 2021).

Por muitos anos, a escolha do melhor embrião para a transferência foi embasada apenas na morfologia do blastocisto, verificando presença de fragmentos, número de prónucleos e nucléolos, número de blastômeros e simetria em embriões que estão em fase de clivagem. Para embriões que chegam à fase de blastocisto, é possível verificar também a massa celular interna (MCI), trofotoderma (TE) e expansão da cavidade blastocística. Como a divisão celular é um processo dinâmico, identificar o potencial desenvolvimento de um embrião em estágio de clivagem é de suma importância (SETTI, Amanda Souza, 2021).

Com os crescentes estudos científicos relacionados à inteligência artificial, o prognóstico dos casos estão cada vez melhores, com isso foi possível observar além da clássica morfologia do blastocisto, a inserção da inteligência do *Time-lapse*, uma incubadora que observa o desenvolvimento do embrião desde a fase de fertilização até a formação final do blastocisto (AVALOS-DURÁN, *et al.*, 2018; BOULET, Sheree, 2015; MÁRQUEZ-HINOJOSA, Silvana *et al.*, 2021).

O sistema *Time-lapse* (TL) renova a percepção do desenvolvimento do embrião e as incubadoras que apresentam esse sistema acoplado também fornecem o benefício da não manipulação pelo profissional, assim, evitando mudanças de temperatura, pH e possíveis contaminações (MÁRQUEZ-HINOJOSA, 2021). A incubadora *Time-Lapse* grava um sequencial de fotos gerando um vídeo, onde o embriologista responsável pode observar as divisões das células e se suas clivagens estão ocorrendo de maneira precisa, assim entendendo se houve fragmentação de blastômeros e considerando a morfocinética para melhor determinação de classificação, avaliando desta forma a qualidade embrionária. Além disso, com a utilização de softwares instalados nas

incubadoras, obtêm-se números de *scores* onde consegue-se definir qual embrião é melhor categorizado (JÚNIOR, Edson Borges, 2021).

O sistema TL avalia eventos dinâmicos e seus intervalos de tempo, como representado no Quadro 2. Esses eventos mostram os parâmetros morfocinéticos embrionários analisados e suas exatidões para ocorrência.

Quadro 2: Sistema de classificação morfocinético do embrião

Terminologia	Descrição do evento
tPB2	O 2º corpúsculo polar está completamente destacado do oolema
tPNa	Aparecimento de um pronucleo individual
tPNf	Momento de desaparecimento do pronúcleo
Citocinese	Primeira citocinese
t2	Momento de clivagem em um embrião de duas células
t3	Momento de clivagem em um embrião de três células
t4	Momento de clivagem em um embrião de quatro células
t5	Momento de clivagem em um embrião de cinco células
t6	Momento de clivagem em um embrião de seis células
t7	Momento de clivagem em um embrião de sete células

t8	Momento de clivagem em um embrião de oito células
tSC	Primeira evidência de compactação
tM	Final da compactação
tSB	Início da formação da cavidade blastocística
tB	Blastocisto totalmente formado
tE	Início da expansão do blastocisto
tHB	Blastocisto totalmente eclodido

Fonte: Adaptada de Júnior, Edson Borges, 2020

A morfocinética embrionária apresenta parâmetros por ordem de acontecimentos, no espaço de duas horas após a fertilização é possível verificar o primeiro corpúsculo polar resultante da primeira divisão meiótica, após 8,2 horas a extrusão do segundo corpúsculo polar já ocorreu, em 26,5 horas pós inseminação (hpi) ocorre a primeira divisão celular (t2), em t4 41,3 hpi, t5 de 53,1 hpi, t6 de 55,3 hpi, t7 de 57,1 hpi e, por fim, t8 de 60,9 hpi. O estado de mórula ocorre em 86,9 hpi e sua transição para blastocisto começa em 91,7 hpi até 107,0 hpi. Entre 122,9 e 140,6 horas é esperado que o blastocisto esteja formado e no processo de destacamento da zona pelúcida para sua eclosão (JÚNIOR, Edson Borges, 2020).

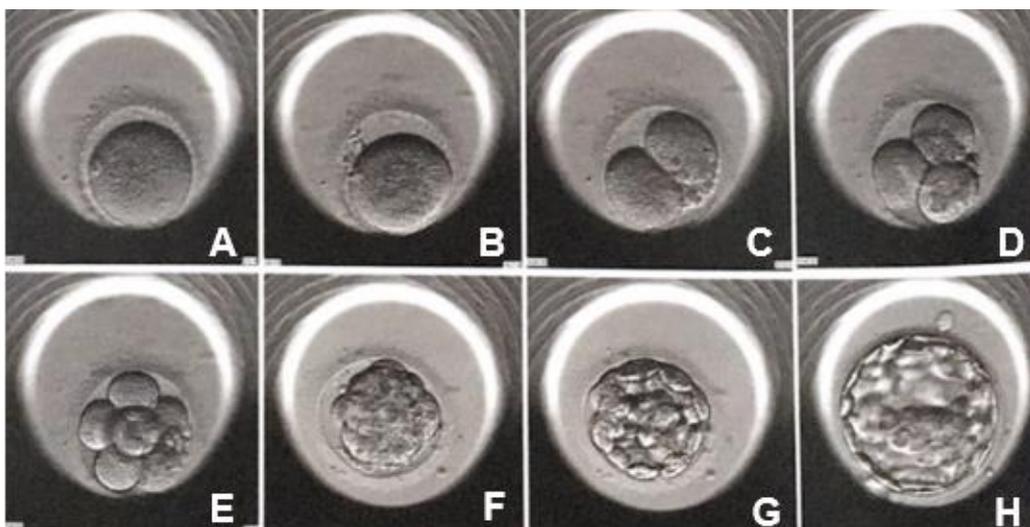


FIGURA 1: Desenvolvimento embrionário observado pela *Time-Lapse*.

Nota: Desenvolvimento a partir do estágio de fertilização até estágio de blastocisto. A) Zigoto após fertilização. B) Zigoto em D1 de desenvolvimento com observação de pronúcleo masculino e

feminino. C) Embrião após primeira clivagem com 2 blastômeros e fragmentação aparente. D) Embrião em clivagem com 3 blastômeros. E) Embrião em D3 de desenvolvimento com 6 blastômeros. F) Embrião em estágio de mórula. G) Embrião em fase de diferenciação celular e formação do blastocisto. H) Blastocisto expandido. Adaptado Júnior, Edson Borges, 2020

Com a unificação das novas tecnologias, com os novos protocolos de tratamento e as solicitações dos exames masculinos completos (Espermograma, Fragmentação do DNA Espermático, análises clínicas completas, entre outros), a RHA continua evoluindo crescentemente, fazendo com que os casais que possuem fatores de infertilidade consigam alcançar a gravidez.

Portanto é de suma importância compreender como o fator masculino pode interferir no desenvolvimento embrionário e entender a correlação entre a Fragmentação do DNA Espermático e como ele pode afetar a morfologia e morfocinética do embrião até o estágio de blastocisto.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Correlacionar o aumento na taxa de fragmentação do DNA espermático com possíveis alterações na morfologia e morfocinética embrionária a partir de levantamento de dados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Relacionar o aumento da fragmentação do DNA espermático com a morfologia embrionária;
- Relacionar o aumento da fragmentação do DNA espermático com a morfocinética embrionária;
- Comparar padrões morfológicos embrionários convencionais e a morfocinética embrionária.

3. MATERIAS E MÉTODOS

No presente estudo foi realizado uma revisão bibliográfica narrativa a partir de livros e artigos em português e inglês, com limite de inclusão de artigos indexados entre 2013 a 2023, pertencentes aos bancos de dados Pubmed, Scielo e Google Acadêmico.

A busca foi feita a partir dos termos-chave de pesquisa: fragmentação do DNA espermático; morfologia embrionária; morfocinética embrionária e desenvolvimento embrionário em português; e inglês: “sperm DNA fragmentation”, “embryo morphology ; embryo morphokinetics” e “embryo development”, com método de inclusão com livros e artigos que apresentavam dados sobre número de embriões analisados, técnica de análise de fragmentação, técnica de fertilização, fatores morfocinéticos alterados e fatores morfológicos alterados.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1. CORRELAÇÃO ENTRE MORFOCINÉTICA E A FRAGMENTAÇÃO DO DNA ESPERMÁTICO

Desde o advento da *Time-lapse*, a morfocinética embrionária tem sido amplamente estudada com o auxílio desta tecnologia que permite uma ampla visão do desenvolvimento do embrião e seus tempos e estágios de clivagem. A *Time-lapse* consiste em um monitoramento contínuo, desde o momento da fertilização até a formação do blastocisto sem a manipulação do material biológico durante o desenvolvimento e sem alterações de fatores externos, como mudanças de temperaturas, pH, aumento do estresse oxidativo e concentrações de gases como O₂ e CO₂ (BLAIS, Idit et al., 2021; HINOJOSA, Silvana et al., 2022; LUNDIN, Kerst et al., 2020).

A introdução da inteligência artificial associada a *Time-lapse*, ocasionou no desenvolvimento de *softwares* específicos que visam ranquear os embriões e atribuir uma nota de *score* na classificação de acordo com padrões morfológicos e morfocinéticos pré-estabelecidos. Devido a tecnologia *Time-lapse* ser encontrada em várias marcas, é possível encontrar variações entre os *softwares* específicos de cada uma delas, como por exemplo a Geri® (Genea Biomedx), Embryoscope® (Vitrolife) e MIRI® (Esco Medical) que possuem seus respectivos softwares de análise: Geri Assess 2.0, KidScoreD5 e MIRI TL Server. (TARTIA, Alina P. et al., 2022; VANDAME, Jessica et al., 2022).

Em virtude dos avanços em estudos relacionados ao desenvolvimento embrionário e novas tecnologias próprias para o assunto, percebeu-se a importância de analisar a infertilidade conjugal tirando a ênfase da infertilidade feminina como a única causadora de problemas reprodutivos (; AGARWAL, Ashok et al., 2020; FAINBERG, Jonathan et al., 2019). Analisando a importância dos fatores masculinos em casos de Reprodução Humana Assistida (RHA), entendeu-se clinicamente a necessidade do exame de Fragmentação do DNA Espermático (FDE), que possui uma acuracidade mais elevada dos fatores intrínsecos espermáticos, além da análise clássica do Espermograma, que observa propriedades como: morfologia, motilidade e concentração espermática e de células (AVENDAÑO, Conrado et al., 2010; FARKOUH, Ala'a et al., 2021).

Novos estudos buscam correlacionar o aumento da fragmentação do DNA espermático com alterações embrionárias significativas em suas etapas de clivagem (ANBARI, Fatemeh et al, 2020; NIKOLOVA, Stefka et al., 2020; SETTI, Amanda et al., 2021). Por serem estudos recentes, há uma contradição entre resultados e em consequência há vieses de técnica de análise, método de fertilização e até mesmo o número de embriões analisados. Neste presente trabalho, foi realizada a unificação dos dados de estudos que apresentam uma correlação entre parâmetros morfocinéticos e índices elevados de fragmentação do DNA espermático.

Em nosso estudo, foram utilizados oito artigos que separam a taxa de fragmentação do DNA espermático, ou entre baixo e alto grau de fragmentação, ou que separam em quatro percentis com comparação entre o primeiro percentil (menor taxa de fragmentação) e o quarto percentil (maior taxa de fragmentação). Esta avaliação resultou em 4200 embriões obtidos através dos 8 artigos analisados, onde foram comparados os diferentes graus de fragmentação do DNA espermático com atrasos no desenvolvimento embrionário (Tabela 1).

Para esclarecer todos os dados encontrados, foi montado uma tabela na qual incluiu-se o número de embriões presentes em cada estudo para determinação quantitativa da relevância de cada resultado; técnica de análise de fragmentação do DNA espermático para verificar a exatidão das análises realizadas; método de fertilização de alta complexidade utilizado e, por fim, parâmetros morfocinéticos alterados.

Tabela 1: Análise de dados estatísticos relacionados a alterações morfocinéticas, técnica de análise de fragmentação, técnica de fertilização e número de embriões.

Autor / Artigo	número de embriões	Técnica de análise de fragmentação	FIV x ICSI	Fatores morfocinéticos alterados
Cristian Alvares Sedó et al. “Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects”	187	TUNEL	ICSI	tB
Fatemeh Anbari et al. “Does sperm DNA fragmentation have negative impact on embryo morphology and morphokinetics in IVF programme?”	328	SCD	ICSI	t2, t6, t7 e t8
Stefka Nikolova et al. “ Impact of sperm characteristics on time-lapse embryo morphokinetic parameters and clinical outcome of conventional in vitro fertilization”	223	SCSA	FIV	t2, tPNf
M. Esbert et al. “High sperm DNA fragmentation delays human embryo kinetics When oocytes from Young and healthy donors are microinjected”	971	TUNEL	ICSI	tPNa, t2, t5, t6, t7, t8, t9 e tM
Artur Wdowiak et al. “The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmic sperm injection”	165	SCD	ICSI	TPNf, t4, tB
Amanda Souza Setti et al. “Morphokinetic parameter comparison between embryos from couples with high or low sperm fragmentation index”	978	SCD	ICSI	tPNa, t2, t4, tSB, tB

Aida Casanovas et al. “Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates”	196	COMETA	ICSI	tPNf, t4, t8, tM, tB
Shikai Wang et al. “Sperm DNA fragmentation measured by sperm chromatin dispersion impacts morphokinetic parameters, fertilization rate and blastocyst quality in ICSI treatments”	1152	SCD	ICSI	tPNf, t2, t3, t4, t5, t6, t8

Nota: *TUNEL*= terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling assay ; *SCD*= *Sperm Chromatin Dispersion* ; *SCSA*= *sperm chromatin structure assay*; ICSI = injeção intracitoplasmática de espermatozoides ; FIV = fertilização *in vitro*; tPNa= tempo de aparecimento dos pronúcleos; tPNf= tempo de desaparecimento dos pronúcleos; t2 a t9= tempo de clivagem de dois à nove blastômeros; tM= tempo de mórula; tSB= tempo de início de formação da cavidade blastocística; tB= tempo de blastocisto.

A tabela foi construída para esclarecer e compilar dados encontrados em artigos científicos, a fim de elucidar possíveis correlações entre estudos e da mesma forma suas divergências em resultados, para que assim seja capaz de realizar uma comparação e conclusão para o presente estudo.

Os estudos centralizados realizam a comparação de embriões obtidos a partir de pacientes com alta taxa de FDE com embriões obtidos de através de pacientes com taxa considera normal. Entretanto é necessário levar em consideração a técnica para análise da fragmentação do DNA espermático, visto que a fragmentação do DNA espermático pode ser classificada como fragmentação de fita simples, fita dupla ou ambas (DOS SANTOS HAMILTON, Thais Rose ET AL., 2020).

Em razão de algumas técnicas utilizarem apenas análise de fragmentação de dupla fita, é possível encontrar um viés em seus resultados por conta de casos que apresentam um padrão de fragmentação de fita simples, onde o resultado aparecerá como normal dentro dos valores de referência destes testes que detectam apenas fragmentação de fita dupla. É possível observar este viés igualmente em casos em que se encontram taxa de fragmentação já aumentada, pois ao analisar apenas a fragmentação de fita dupla exclui-se a possibilidade de fragmentação mista na

amostra, o que geraria uma taxa de fragmentação ainda mais elevada (AGARWAL, Ashok et al., 2020). Outro viés analisado em relação ao teste de fragmentação é a variação entre técnicas da porcentagem considerada como dentro dos parâmetros ou fragmentação elevada, visto que a técnica de SCD elenca que a taxa superior a 20% já pode ser considerada elevada, entretanto na técnica de TUNEL a mesma taxa apresenta uma fragmentação moderada e apenas acima de 30% pode ser considerada como elevada (BORGES, Edson et al., 2020).

Atualmente existem 4 principais técnicas para análise da fragmentação do DNA espermático, sendo as análises por SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*) é uma técnica que aplica o princípio da susceptibilidade à fragmentação, ou seja, uma análise indireta da fragmentação do DNA e não pode prever a taxa de fragmentação por fita simples (BORGES, Edson et al., 2020). A análise por SCSA é vantajosa em relação a precisão dos resultados devido analisar a fragmentação simples e dupla, entretanto o custo do citômetro de fluxo pode inviabilizar o procedimento em clínicas de menor porte. O método de COMETA analisa o grau de fragmentação de fita simples e dupla, sendo que consegue realizar a quantificação real desta fragmentação, contudo sua aplicabilidade na prática clínica é muito complexa pois o tempo de análise é longo (CISSEN, Maartje et al., 2016). Sendo assim, a análise por TUNEL pode ser considerada a de melhor custo-benefício, em razão de analisar os dois tipos de fragmentação, que se baseia na incorporação de nucleotídeos anelados a um corante fluorescente na região 3'OH livre em quebras simples ou dupla fita (SHARM, Rakesh et al., 2021).

Ao analisar os padrões morfocinéticos alterados em todos os estudos abordados na tabela 1, através de técnicas variadas de análise da fragmentação do DNA espermático, não foi possível obter uma relação entre as diferentes técnicas e as alterações embrionárias observadas, ou seja, neste estudo todas as técnicas de análise de fragmentação do DNA espermático obtiveram resultados semelhantes em relação aos parâmetros alterados, mantendo a prevalência da alteração morfocinética de t2 e tPN.

Em virtude da ausência de relação entre as técnicas de análise de fragmentação e o desenvolvimento morfocinético do embrião foi necessária a indagação de outro viés muito importante dos estudos citados na tabela acima, sua técnica de fertilização do embrião, sendo FIV ou ICSI. Foi visto que, a Fertilização *in vitro* clássica (FIV) é

recomendada para casais que apresentam infertilidade não masculina, ou seja, com parâmetros seminais normais (ISIKOGLU, M. et al.,2021). Sobre a ICSI, foi avaliado que este método é indicado para infertilidade com fator masculino ou até mesmo em casos de congelamento de oócitos prévios (OF THE AMERICAN, The Practice Committees et al., 2012).

Na prática clínica, a ICSI é um procedimento da RHA que visa auxiliar casais com problemas de fertilidade, utilizada em países desenvolvidos, substituindo a técnica da FIV até mesmo em casos de infertilidade sem fator masculino associado (BALDINI, Domenico et al.,2021). Diferentemente da FIV, a ICSI permite que gametas masculinos sejam escolhidos para a fertilização do oócito em casos de pacientes com concentração e motilidade espermática abaixo da normalidade de acordo com a OMS (WHO, 2021).

Contudo, este método de seleção para ICSI desconsidera a quimiotaxia e a seleção natural que ocorre *in vivo*. No método de FIV, após um processamento seminal que seleciona os espermatozoides com melhor motilidade ou concentra amostras com pequenas quantidades de espermatozoides por mililitros no ejaculado, dos quais são incubados *overnight* com oócitos em meio de cultivo, mimetizando a fertilização que ocorre *in vivo* (SCHWARZE, Juan-Enrique et al.,2017).

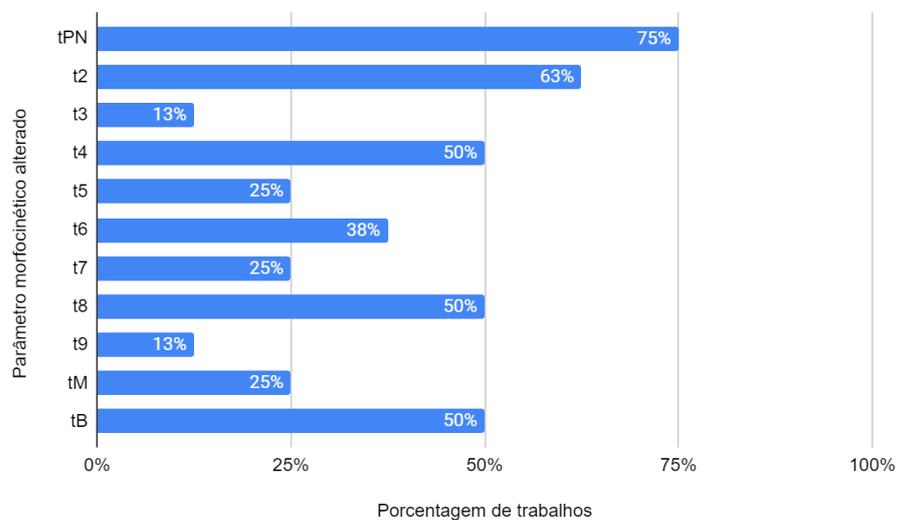
Em nosso presente estudo, após a análise da tabela 1, obtivemos 7 artigos em que a técnica de ICSI foi empregada para a análise do desenvolvimento de embriões obtidos de paciente com alta taxa de FDE e apenas 1 estudo utilizando a técnica de FIV para o mesmo propósito. Levando em consideração apenas a técnica de fertilização destes embriões, não foi possível obter uma relação entre os embriões obtidos a partir de amostras com alta taxa de FDE e a seleção natural espermática realizada no processo da FIV clássica. Portanto, são necessários mais estudos que correlacionem a falta de seleção espermática da ICSI contra a seleção natural que ocorre na FIV e alterações nos padrões morfocinéticos.

4.1.1 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOCINÉTICAS

De acordo com os dados obtidos estabeleceu-se uma relação negativa entre taxa de fragmentação do DNA espermático elevada e alteração nos tempos de

aparecimento e desvanecimento dos pronúcleos (tPN) e tempo de primeira clivagem (t2) (Gráfico 1).

Gráfico 1: Percentual alterações morfocinéticas de acordo com o número de trabalhos englobados.



Nota: Os trabalhos englobados levam em consideração a Tabela 1, sendo 100% igual a presença da alteração morfocinética nos 8 artigos apresentados; tPN= tempo de aparecimento e de desvanecimento dos pronúcleos; t2 a t9= tempo de clivagem de dois à nove blastômeros; tM= tempo de mórula; tB= tempo de blastocisto.

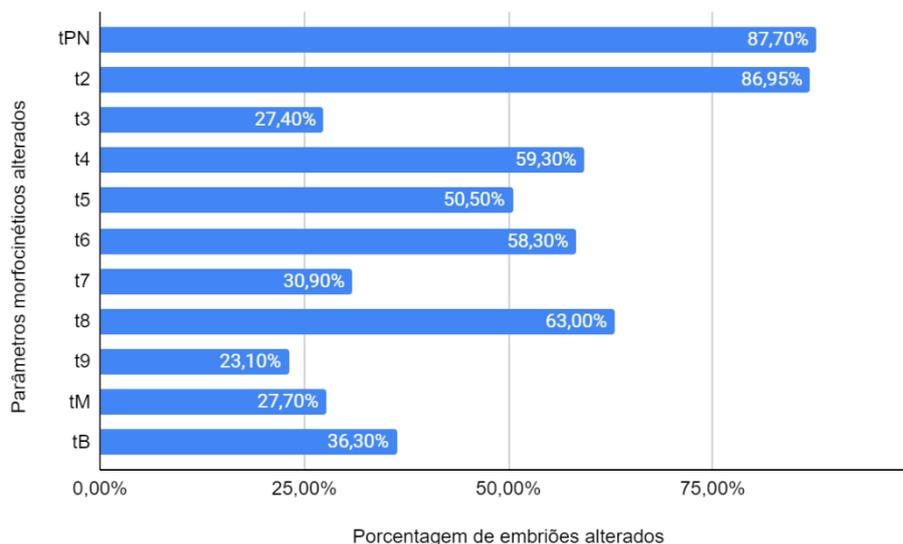
A obtenção do gráfico foi realizada a partir da quantidade de trabalhos analisados que abordam embriões gerados de pacientes com alta taxa de FDE (oito estudos) *versus* os parâmetros morfocinéticos alterados em cada um deles, desconsiderando a quantidade de embriões de cada estudo. De acordo com o gráfico 1 pôde-se notar que há uma maior relevância nos tempos de tPN (CASANOVAS, Aida 2019; ESBERT, Marga, 2018; SEDÓ, Cristian, 2017; SETTI, Amanda, 2021; WANG, Shikai, 2022; WADOWIAK, Artur, 2015), englobando tempo de aparecimento dos pronúcleos pós fertilização e desvanecimento dos mesmos dando início a primeira clivagem, e no tempo de primeira clivagem (t2) (ESBERT, Marga, 2018; NIKOLOVA, Stefka, 2020; SETTI, Amanda, 2021; WANG, Shikai, 2022), demonstrando que o aumento da taxa

de fragmentação do DNA espermático acarreta um atraso do blastocisto, este que sofre um retardo em suas clivagens iniciais e conseqüentemente no seu desenvolvimento.

A análise das porcentagens nos mostra que t4, t8 e tB apresentam relevância em 50% dos estudos observados (CASANOVAS, Aida 2019; ESBERT, Marga, 2018; SEDÓ, Cristian, 2017; SETTI, Amanda, 2021; WANG, Shikai, 2022; WADOWIAK, Artur, 2015). Todos os outros parâmetros morfocinéticos apresentaram importância estatística em menos de 40% dos trabalhos analisados, mas não é possível estabelecer uma relação direta com esses parâmetros pois considerando a quantidade de embriões pesquisados em cada um dos estudos, denota-se que artigos com o maior número de embriões apresentam maior relevância estatística para o levantamento de dados deste presente estudo.

Diante dos dados obtidos, criou-se um gráfico (Gráfico 2) no qual é possível verificar a relevância das alterações morfocinéticas e o número de embriões que chegaram a blastocisto analisados como uma totalidade. Considerando estes, observou-se uma prevalência no atraso de tPN e t2, sendo os parâmetros morfocinéticos que se alteram em mais de 85% dos embriões (CASANOVAS, Aida 2019; ESBERT, Marga, 2018; NIKOLOVA, Stefka, 2020; NIKO WADOWIAK, Artur, 2015; SETTI, Amanda, 2021; WANG, Shikai, 2022).

Gráfico 2: Análise de alterações morfocinéticas de acordo com o número total de embriões analisados.



Nota: tPN= tempo de aparecimento e de desvanecimento dos pronúcleos; t2 a t9= tempo de clivagem de dois à nove blastômeros; tM= tempo de mórula; tB= tempo de blastocisto.

Os tempos de quatro blastômeros (t4) e oito blastômeros (t8) mantiveram seu potencial de importância estatística, sendo que apresentaram um retardo de clivagem em aproximadamente 60% dos embriões. Comparando a quantidade de embriões alterados, pôde-se verificar que o tempo de seis blastômeros (t6) apresentou uma significância que não havia sido observada no gráfico 1, visto que os estudos que apresentaram este atraso temporal em t6 mostram uma quantidade significativa do número de embriões, possuindo assim, uma maior pertinência quando relacionada com a quantidade de estudos abrangidos.

Dada a importância do número de embriões, contemplou-se que o tempo de blastocisto e formação da cavidade blastocística (tB) ficou menos significativo, pois os estudos (CASANOVAS, Aida 2019; SEDÓ, Cristian, 2017; WADOWIAK, Artur, 2015) que abrangem esta variante alterada possuem um coro reduzido, declinando de uma porcentagem de 50% para menos de 40% dos embriões em atraso de desenvolvimento.

Estes resultados indicam que embriões que foram fertilizados com espermatozoides com alta fragmentação do DNA espermático apresentam tempos de clivagem maiores. Isto pode ser explicado pela falta de maquinaria espermática no processo de auto reparação de fragmentação em seu DNA, devido a extrusão das organelas citoplasmáticas no processo de espermiogênese, onde a espermátide redonda adquire o formato final de espermatozoide com cabeça, peça intermediária e cauda bem definidas (RATHKE, Christina et al., 2014).

Após a espermiogênese, a fragmentação gerada no trânsito do espermatozoide do testículo até o ejaculado final só poderá ser reparada no processo de fertilização *in vivo* ou *in vitro*, onde as organelas oocitárias dependendo do grau de fragmentação e idade materna podem realizar o reparo nos tempos de clivagem iniciais (SETTI, Amanda Souza et al., 2021). Esta correção pode seguir o percurso do reparo completo desta fragmentação gerando apenas um atraso entre o desaparecimento dos pronúcleos (tPN) e as primeiras clivagens (t2 – t6) ou um atraso em tempos posteriores, em quadros de fragmentação corrigida parcialmente, que afetará os tempos de blastocisto (tB). Em casos de falha na reparação é possível observar uma

parada embrionária antes da formação do blastocisto (SETTI, Amanda Souza et al., 2021).

Estudos mostram que embriões mais lentos apresentam uma menor taxa de implantação no endométrio, gestação e de nascidos vivos (BARTOLACCI, Alessandro et al., 2021; DAL CANTO, Mariabeatrice et al., 2021). Portanto, é ressaltada a importância dos parâmetros morfocinéticos avaliados pela *Time-Lapse* e a análise do *score* onde avaliamos o embrião de acordo com cada tempo de clivagem, grau de fragmentação e estrutura das células, sendo um ótimo preditor para análise de desenvolvimento de um embrião lento ou rápido até o quinto dia (GAZZO, Eduardo et al., 2020). Diferentemente da análise convencional dada pela classificação morfológica estática do embrião em dias específicos (WANG, Shikai et al., 2021).

4.2 CORRELAÇÃO ENTRE MORFOLOGIA EMBRIONÁRIA E A FRAGMENTAÇÃO DO DNA ESPERMÁTICO

A avaliação morfológica é o método mais comum de análise da qualidade do embrião, entretanto é um sistema que não identifica o potencial de implantação, sendo um fraco preditor e sem associação com a ploidia (REIGNIER, Arnaud et al., 2018). A classificação morfológica envolve a checagem do embrião em tempos específicos, mas entre eles, os detalhes sobre desenvolvimento embrionário não são claros, havendo limitações e impedindo um prognóstico sobre o desenvolvimento do embrião (WANG, Shikai et al., 2022).

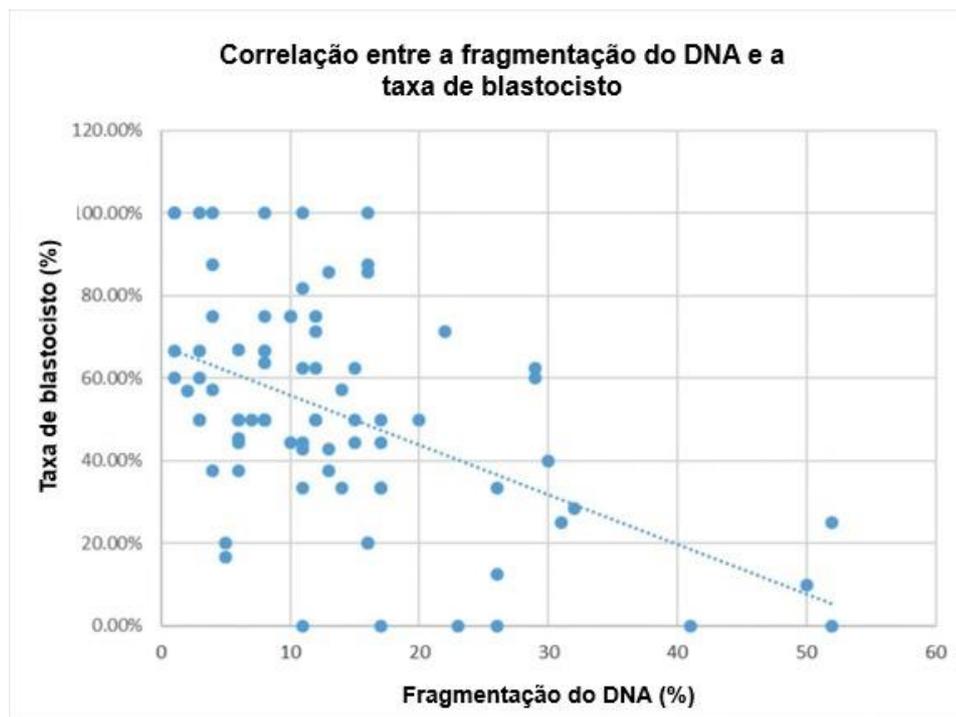
Neste presente estudo buscou-se a relação entre a fragmentação do DNA espermático e o desenvolvimento morfológico embrionário. Estudos anteriores apresentam resultados conflituosos (ANBARI, Fatemeh et al., 2020; AVENDAÑO, Conrado et al., 2021), mostrando se há ou não uma correlação, que podem ser explicados pelo tempo de estudo, número total de embriões analisados, fator de infertilidade masculina, tipo de tratamento realizado.

Su Mi Kim et al. (2019), analisaram o efeito da fragmentação do DNA espermático na qualidade embrionária em mulheres responsivas ao tratamento de Fertilização *in vitro* e Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides. Neste estudo, buscou-se o entendimento completo do fator masculino da fragmentação excluindo a possibilidade de má resposta feminina ao tratamento. Separou-se em duas coortes para estudo, pacientes masculinos que apresentaram <30,7% e >30,7% de fragmentação do DNA

espermático respectivamente. Após a análise estatística encontrou-se uma correlação negativa com embriões considerados de “*top-quality*”, onde os embriões enquadrados com maior perfil de FDE (30%), possuem pior padrão morfológico.

Seguindo a hipótese de estudo de Su Mi Kim et al., Cristian Alvarez Sedó et al. (2017) complementaram que além da alta fragmentação do DNA espermático diminuir a qualidade embrionária, o estudo especificou que esta fragmentação não apresentou relevância estatística na taxa de fertilização, mas em seu desenvolvimento até blastocisto. Sua pesquisa teve uma totalidade de 187 embriões, onde o coro foi separado em dois grupos: fragmentação do DNA espermático inferior a 15% e superior a 15%. A coorte que apresentou alta fragmentação mostrou que há um declínio na taxa de formação de blastocisto, sendo 21,7% inferior ao outro grupo. Foi demonstrado através de um gráfico no qual está apresentado abaixo.

Gráfico 3: Correlação entre a fragmentação do DNA e a taxa de Blastocisto



Fonte: Adaptado de Cristian Alvarez Sedó 2017

Nota: Análise da correlação entre a fragmentação do DNA espermático e a taxa de formação de blastocisto.

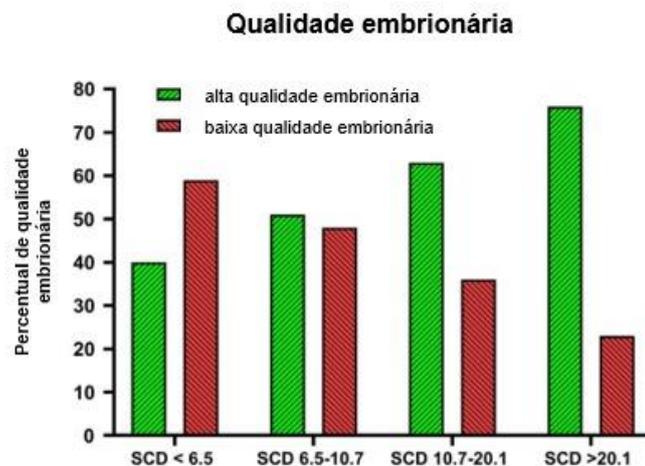
Neste gráfico (Gráfico 3) é possível observar que há um decaimento expressivo entre a taxa de formação de blastocisto correlacionado com a fragmentação do DNA espermático. Em conjunto com a queda da formação e blastocisto foi encontrada uma

menor taxa de implantação em 24,5%. Edson Borges Júnior et al. (2019), também mostraram uma queda significativa em taxa de implantação, entretanto, não relata significância estatística com a taxa de gravidez química ou clínica. A qualidade morfológica do blastocisto foi citada no mesmo estudo trazendo uma correlação negativa entre embriões “*top-quality*” e fragmentação do DNA espermático.

Conrado Avendaño et al. (2010), estudaram a fragmentação de espermatozoides morfolologicamente normais e seu impacto na qualidade do embrião em ICSI. O maior achado do estudo foi a demonstração estatística da correlação negativa entre a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais com DNA fragmentado e embriões com pontuação média em sua classificação, este resultado suporta o fato da presença de fragmentação do DNA espermático afetar negativamente a qualidade do embrião após ICSI. Além disso, foi demonstrado que a qualidade inferior do embrião pode ser uma evidência de fragmentação embrionária, apoptose ou ausência de formação do fuso mitótico.

Em contrapartida, Fatemeh Anbari et al. (2020) realizaram um estudo no qual apresentou 328 embriões no quais foram observados padrões morfológicos e morfocinéticos, estes foram divididos em quatro percentis a partir da análise de FDE, sendo o primeiro percentil com a menor taxa de fragmentação e o quarto percentil com a maior taxa de fragmentação. Após análise estatística, observando o padrão morfocinético, encontrou-se um retardo nos tempos de clivagem nos percentis com as maiores taxas de fragmentação.

Gráfico 4: Taxa de embriões de alta e baixa qualidade em 4 categorias de sDNAf em espermatozoides preparados



Fonte: Adaptado de Fatemeh Anbari 2021.

Nota: Taxa de embriões de qualidade superior (verde) e inferior (vermelho) em 4 percentis de taxa de fragmentação do DNA espermático; SCD: *Sperm Chomatin Dispersion*.

Entretanto, ao verificar a morfologia embrionária encontrou-se que os embriões localizados no terceiro e quarto percentil, que possuem o maior grau de fragmentação, apresentaram uma maior classificação embrionária (gráfico 4) sendo considerados “*top-quality*”, refutando a ideia de que altas taxas de fragmentação do DNA espermático geraria embriões com uma qualidade morfológica considerada inferior.

Estudos demonstraram que a relação entre a fragmentação do DNA espermático e morfologia embrionária não dependem exclusivamente do fator masculino, por esta razão as pesquisas apresentaram resultados conflituosos entre alterações na morfologia embrionária e o aumento da taxa de FDE (JR, Edson Borges et al., 2021, SETTI, Amanda Souza et al., 2021; WANG, Shikai et al., 2021). A maquinaria espermática para reparação de danos ao DNA embrionário é eliminada no processo de espermiogênese, onde a espermatide redonda realiza a extrusão das organelas citoplasmáticas para obter o formato anatômico tradicional do espermatozoide possuindo cabeça, peça intermediária e cauda, por este motivo o fator oocitário se torna importante na correção desta fragmentação gerada.

A capacidade de correção da fragmentação do DNA espermático pelo oócito depende de fatores como: grau de fragmentação do DNA espermático, tipo de FDE, idade materna, maturação e qualidade oocitária (JR, Edson Borges et al., 2021).

O fator da idade materna avançada afeta principalmente na qualidade oocitária, uma vez que diferentemente do homem, a mulher apresenta uma reserva ovariana pré-definida desde o nascimento e de acordo com a idade há um declive em sua qualidade (ATTALI, Emmanuel, et. al., 2021). A qualidade oocitária pode ser classificada de acordo com seu grau de maturação em metáfase II (MII), metáfase I (MI), prófase I (PI), oócito anômalo ou degenerado (CHAMAYOU, Sandrine, 2022). No procedimento da ICSI, são injetados espermatozoides apenas em oócitos que apresentam o maior grau de maturação, metáfase II, assegurando a ploidia oocitária (RUBINO, Patrizia et al., 2016).

Dependendo da extensão da fragmentação do DNA espermático o oócito pode não conseguir corrigir o dano, tendo uma limitação na sua maquinaria (JR, Edson Borges et al., 2021). No desenvolvimento embrionário, em suas primeiras clivagens há milhares de danos do DNA para serem corrigidos, estes que ocorrem em pontos específicos da fase S e G1 (MARCHETTI, Francesco et al. 2007, SETTI, Amanda et al., 2021).

Quando há dano do DNA embrionário causado ou não pela fragmentação do DNA espermático, o embrião pode seguir quatro caminhos: reparo da lesão; tolerância ao dano, onde pode ocorrer mutações, como mosaicismos e aneuploidias; apoptose, onde há a destruição de um ou mais blastômeros clinicamente irrelevantes para o desenvolvimento final do blastocisto ou parada precoce no desenvolvimento embrionário (SETTI, Amanda Souza et al., 2021; WANG, Shikai et al., 2021).

Daniela Braga et al. (2022) em sua pesquisa expõe a importância além da idade oocitária, mostrando que a morfologia oocitária também se destaca. Nesta pesquisa nota-se que a presença de granulação citoplasmática central, grandes vacúolos e presença de aglomerados de retículo endoplasmáticos (SERs) podem ser prejudiciais para o material genético oocitário, diminuindo a capacidade de autocorreção de seu DNA e do material espermático por consequência. Comparando-se oócitos normais morfologicamente com aqueles que apresentam dismorfismos, mostra-se que a associação entre fator masculino e feminino afetam criticamente os resultados, pois com a presença de dismorfismo e fragmentação do DNA espermático tem como consequência a produção de embriões com qualidade inferiores e um decaimento na taxa de gestação.

Todavia existem divergências na literatura, devido à morfologia embrionária possuir diversos fatores para o seu desenvolvimento ser considerado ideal. Esta análise multifatorial depende do grau de fragmentação do DNA espermático, correção oocitária, idade materna e análise interprofissional. Entretanto foram observados em estudos a possibilidade de ocorrer uma alteração morfocinética contudo não morfológica. (BARTOLACCI, Alessandro et al. 2021, CARRASCO, Beatriz et al. 2017).

A inespecificidade de classificação embrionária apenas pela morfologia sucede ao fato de observar o embrião estaticamente, ao invés de o seu desenvolvimento morfocinético, analisando todas as clivagens e alterações do embrião até estágio de blastocisto. Alessandro Bartolacci et al. (2021), argumentam em seu estudo que a escolha do embrião para a transferência embrionária apenas pelo padrão morfológico pode ser considerada errônea em um a cada cinco casos. A partir de seus dados estatísticos, foi montada a tabela abaixo.

Tabela 2: Chance de nascidos-vivos [OR (95%IC)] de embriões agrupados de acordo com sua avaliação morfocinética (A–D) e morfológica (A–C) em relação ao grupo de referência (AA; negrito) fornecendo morfocinética superior, morfologia superior e maiores chances de nascidos-vivos.

Morfologia embrionária	Morfocinética embrionária			
	A	B	C	D
A	1 (n = 444)	0.50 (0.30–0.82)** (n = 226)	0.48 (0.29–0.80)** (n = 260)	0.31 (0.17–0.58)*** (n = 234)
B	0.62 (0.32–1.18) (n = 109)	0.42 (0.18–0.99)* (n = 78)	0.39 (0.17–0.94)* (n = 82)	0.19 (0.07–0.53)*** (n = 109)
C	0.66 (0.22–1.95) (n = 34)	0.11 (0.01–0.78)* (n = 48)	0.12 (0.02–0.95)* (n = 40)	0.11 (0.03–0.36)*** (n = 137)

*P<0.05, **P<0,01, ***P<0,0001 versus grupo de referência (AA), ou, razão de probabilidade

Fonte: Adaptado de Alessandro Bartolacci ,2021.

Nota: Apresentação de classificação morfológica em coluna (A, B, C) versus classificação morfocinética em linha (A, B, C, D). P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus grupo de referência (AA).

Os dados obtidos da tabela 2 demonstram a performance de nascidos vivos combinado com a morfologia e morfocinética, gerando uma nova classificação a partir de seu *score*. Analisando a precisão do fator morfocinético é demonstrado que 587 embriões classificados com o melhor padrão, apresentam 75,6% de embriões sendo “*top-quality*” morfológicamente e apenas 5,8% com a pior classificação morfológica (BARTOLACCI, Alessandro et al. 2021).

Analisando apenas a morfologia foram encontrados 1164 embriões considerados “*top-quality*”, destes apenas 38,1% possuem a melhor classificação morfocinética e 20,1% (n = 234 embriões) classificados com a pior classificação morfocinética. Confirmando assim que a escolha do embrião exclusivamente pela classificação morfológica pode ser induzida ao erro e gerar menos nascidos vivos (BARTOLACCI, Alessandro et al. 2021).

Portanto se dá necessária a avaliação do padrão morfocinético para verificar as alterações do aumento da taxa de FDE no desenvolvimento embrionário. Considerando os estudos analisados, foi possível verificar que o aumento da taxa de FDE pode ocasionar atrasos na formação do blastocisto, diminuição na taxa de implantação embrionária, decaimento na taxa de gestação e taxa de nascidos vivos, porém são necessários mais estudos que comprovem o impacto da taxa de fragmentação do DNA espermático na morfologia embrionária.

5. CONCLUSÃO

Ao analisar a possível influência do aumento da taxa de fragmentação do DNA espermático no desenvolvimento embrionário pôde-se concluir que, de acordo com o aumento na taxa de fragmentação do DNA espermático observa-se alterações nos tempos das primeiras clivagens do embrião levando ao desenvolvimento mais lento e com menores chances de implantação e gravidez clínica.

A morfologia do embrião pode ser alterada caso o aumento na taxa de FDE não seja corrigido pela maquinaria oocitária, acarretando em uma classificação morfológica inferior podendo diminuir a formação de blastocistos. Entretanto a análise estática do embrião sugere não ser o suficiente para a escolha no momento da transferência embrionária.

Observando apenas o ponto de vista morfológico do embrião é possível obter falhas, devido a variação de classificação interprofissional e a falta de observação das clivagens embrionárias. Ao avaliar o embrião de acordo com suas clivagens e padrões morfocinéticos é possível obter uma redução do erro, sendo que embriões escolhidos apenas pela morfologia embrionária podem apresentar uma classificação morfocinética inferior.

A morfologia e morfocinética devem, portanto, ser analisadas em forma conjunta devido a variabilidade nos padrões de classificação morfologia e a vantagem no acompanhamento do desenvolvimento do embrião em todas as etapas de clivagens, sem a manipulação humana, obtidas com a *Time-Lapse*, garantindo assim a seleção do melhor embrião com um menor impacto gerado a partir do aumento da fragmentação do DNA espermático.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, Ashok et al. A unique view on male infertility around the globe. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2015.
- AGARWAL, Ashok et al. Male infertility. **The Lancet**, v. 397, n. 10271, p. 319-333, 2021.
- AGARWAL, Ashok et al. Sperm DNA fragmentation: a new guideline for clinicians. **The world journal of men's health**, v. 38, n. 4, p. 412, 2020.
- ANBARI, Fatemeh et al. Does sperm DNA fragmentation have negative impact on embryo morphology and morphokinetics in IVF programme?. **Andrologia**, v. 52, n. 11, p. e13798, 2020.
- ATTALI, Emmanuel; YOGEV, Yariv. The impact of advanced maternal age on pregnancy outcome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v. 70, p. 2-9, 2021.
- AVALOS-DURÁN, Georgina; ANA MARIA ANGEL; RIVERO-MURILLO, Juana; *et al.* Physiological ICSI (PICSI) vs. conventional ICSI in couples with male factor: A systematic review. *JBRA assisted reproduction*, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5982561/>>. Acesso em: 21 ago. 2023.
- AVENDAÑO, Conrado et al. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. **Fertility and sterility**, v. 94, n. 2, p. 549-557, 2010.
- BALDINI, Domenico et al. Sperm Selection for ICSI: Do We Have a Winner?. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 3566, 2021.
- BALABAN, Basak et al. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. **Reproductive biomedicine online**, v. 22, n. 6, p. 632-646, 2011.
- BARTOLACCI, Alessandro et al. Early embryo morphokinetics is a better predictor of post-ICSI live birth than embryo morphology: speed is more important than beauty at the cleavage stage. **Zygote**, v. 29, n. 6, p. 495-502, 2021.
- BLAIS, Idit et al. Improving embryo selection by the development of a laboratory-adapted time-lapse model. **F&S Science**, v. 2, n. 2, p. 176-197, 2021.
- BORGES JR, Edson et al. Sperm DNA fragmentation is correlated with poor embryo development, lower implantation rate, and higher miscarriage rate in reproductive cycles of non-male factor infertility. **Fertility and sterility**, v. 112, n. 3, p. 483-490, 2019.
- BOULET, Sheree L. et al. Trends in use of and reproductive outcomes associated with intracytoplasmic sperm injection. **Jama**, v. 313, n. 3, p. 255-263, 2015
- CASANOVAS, Aida et al. Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. **Fertility and sterility**, v. 111, n. 4, p. 699-707. e1, 2019.
- CARRASCO, Beatriz et al. Selecting embryos with the highest implantation potential using data mining and decision tree based on classical embryo morphology and morphokinetics. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 34, p. 983-990, 2017.
- CHAMAYOU, Sandrine. Oocyte quality in assisted reproduction techniques. *Minerva Endocrinology*, v. 47, n. 1, p. 89-98, 2022.
- CISSEN, Maartje et al. Measuring sperm DNA fragmentation and clinical outcomes of medically assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0165125, 2016.

DAL CANTO, Maria beatrice et al. Faster fertilization and cleavage kinetics reflect competence to achieve a live birth after intracytoplasmic sperm injection, but this association fades with maternal age. **Fertility and Sterility**, v. 115, n. 3, p. 665-672, 2021.

DOS SANTOS HAMILTON, Thais Rose; ASSUMPCÃO, Mayra Elena Ortiz D.Ávila. Sperm DNA fragmentation: causes and identification. **Zygote**, v. 28, n. 1, p. 1-8, 2020.

DUTTA, Sulagna; MAJZOUN, Ahmad; AGARWAL, Ashok. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. **Arab journal of urology**, v. 17, n. 2, p. 87-97, 2019.

EVANGELINI EVGENI; MARJAN SABBAGHIAN; SALEH, Ramadan; *et al.* Sperm DNA fragmentation test: usefulness in assessing male fertility and assisted reproductive technology outcomes. *Panminerva Medica*, 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37103485/>>. Acesso em: 10 set. 2023.

Evolução da Reprodução Assistida no Brasil - Associação Brasileira de Reprodução Assistida | SBRA. Associação Brasileira de Reprodução Assistida | SBRA. Disponível em: <<https://sbra.com.br/noticias/evolucao-da-reproducao-assistida-no-brasil/>>. Acesso em: 2 out. 2023.

ESBERT, Marga et al. High sperm DNA fragmentation delays human embryo kinetics when oocytes from young and healthy donors are microinjected. **Andrology**, v. 6, n. 5, p. 697-706, 2018.

FAINBERG, Jonathan; KASHANIAN, James A. Recent advances in understanding and managing male infertility. **F1000Research**, v. 8, 2019.

FARKOUH, Ala'a; FINELLI, Renata; AGARWAL, Ashok. Beyond conventional sperm parameters: the role of sperm DNA fragmentation in male infertility. **Minerva Endocrinology**, v. 47, n. 1, p. 23-37, 2021.

GARDNER, David K.; BALABAN, Basak. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important?. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 22, n. 10, p. 704-718, 2016.

GONZÁLEZ-MARÍN, Clara; GOSÁLVEZ, Jaime; ROY, Rosa. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 11, p. 14026-14052, 2012.

Infertilidade masculina representa quase metade dos casos de dificuldade de gravidez, diz OMS - Associação Brasileira de Reprodução Assistida | SBRA. Associação Brasileira de Reprodução Assistida | SBRA. Disponível em: <<https://sbra.com.br/noticias/infertilidade-masculina-representa-quase-metade-dos-casos-de-dificuldade-de-gravidez-diz-oms/#:~:text=Reprodu%C3%A7%C3%A3o%20Assistida%20%7C%20SBRA-,Infertilidade%20masculina%20representa%20quase%20metade%20dos,dificuldade%20de%20gravidez%2C%20diz%20OMS&text=De%20acordo%20com%20um%20estudo,gerar%20um%20filho%20n%C3%A3o%20conseguem>>. Acesso em: 11 set. 2023.

ISIKOGLU, M. et al. Conventional IVF revisited: Is ICSI better for non-male factor infertility? Randomized controlled double blind study. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, v. 50, n. 7, p. 101990, 2021.

JÚNIOR, Edson Borges. Reprodução Humana Assistida: Associação Instituto Sapientiae. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2020.

KIM, Su Mi et al. Effect of sperm DNA fragmentation on embryo quality in normal responder women in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. **Yonsei medical journal**, v. 60, n. 5, p. 461-466, 2019.

LUNDIN, Kersti; PARK, Hannah. Time-lapse technology for embryo culture and selection. **Upsala journal of medical sciences**, v. 125, n. 2, p. 77-84, 2020.

MARCHETTI, Francesco et al. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 45, p. 17725-17729, 2007.

MÁRQUEZ-HINOJOSA, Silvana; NORIEGA-HOCES, Luis; GUZMÁN, Luis. Time-Lapse Embryo culture: A better understanding of embryo development and clinical application. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 26, n. 3, p. 432, 2022.

Melhor transferir meus embriões em D3 ou D5? – Pronúcleo. Pronúcleo. Disponível em: <https://pronucleo.com.br/dica_para_paciente/melhor-transferir-meus-embrioes-em-d3-ou-d5/>. Acesso em: 2 out. 2023.

NIKOLOVA, Stefka et al. Impact of sperm characteristics on time-lapse embryo morphokinetic parameters and clinical outcome of conventional in vitro fertilization. **Andrology**, v. 8, n. 5, p. 1107-1116, 2020.

OF THE AMERICAN, The Practice Committees et al. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor infertility: a committee opinion. **Fertility and sterility**, v. 98, n. 6, p. 1395-1399, 2012.

RATHKE, Christina et al. Chromatin dynamics during spermiogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 3, p. 155-168, 2014.

REIGNIER, Arnaud et al. Can time-lapse parameters predict embryo ploidy? A systematic review. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 36, n. 4, p. 380-387, 2018

RUBINO, Patrizia et al. The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects. *Human reproduction update*, v. 22, n. 2, p. 194-227, 2016.

SAKKAS, Denny; ALVAREZ, Juan G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **Fertility and sterility**, v. 93, n. 4, p. 1027-1036, 2010.

SCHWARZE, Juan-Enrique et al. Is there a reason to perform ICSI in the absence of male factor? Lessons from the Latin American Registry of ART. **Human Reproduction Open**, v. 2017, n. 2, 2017.

SEDÓ, Cristian Alvarez et al. Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects. **JBRA assisted reproduction**, v. 21, n. 4, p. 343, 2017.

SETTI, Amanda Souza et al. Oocyte ability to repair sperm DNA fragmentation: the impact of maternal age on intracytoplasmic sperm injection outcomes. **Fertility and Sterility**, v. 116, n. 1, p. 123-129, 2021.

SETTI, Amanda Souza et al. Morphokinetic parameter comparison between embryos from couples with high or low sperm DNA fragmentation index. **F&S Science**, v. 2, n. 4, p. 345-354, 2021.

SHARMA, Rakesh et al. TUNEL assay—Standardized method for testing sperm DNA fragmentation. **Andrologia**, v. 53, n. 2, p. e13738, 2021.

TARTIA, Alina P. et al. Time-lapse KIDScoreD5 for prediction of embryo pregnancy potential in fresh and vitrified-warmed single-embryo transfers. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 45, n. 1, p. 46-53, 2022.

VANDAME, Jessica et al. Investigation of the reliability of semi-automatic annotation by the Geri time-lapse system. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 45, n. 1, p. 35-45, 2022.

WANG, Shikai et al. Sperm DNA fragmentation measured by sperm chromatin dispersion impacts morphokinetic parameters, fertilization rate and blastocyst quality in ICSI treatments. **Zygote**, v. 30, n. 1, p. 72-79, 2022.

WDOWIAK, Artur; BAKALCZUK, Szymon; BAKALCZUK, Grzegorz. The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmic sperm injection. **Reproductive biology**, v. 15, n. 2, p. 94-100, 2015.

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.