

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Taxa de Fragmentação do Ácido Desoxirribonucleico Espermático como biomarcador de Infertilidade e sua aplicação clínica

Pedro Miguel Tavares de Almeida

M

2021



“Taxa de Fragmentação do Ácido Desoxirribonucleico Espermático como biomarcador de Infertilidade e sua aplicação clínica”

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR, UNIVERSIDADE DO PORTO

ALUNO:

Pedro Miguel Tavares de Almeida

Número de estudante: 201504636

Endereço de correio eletrónico: pedro.almeida@hotmail.com

ORIENTADOR:

Dr. Nuno Rossano Monteiro Louro

Assistente Graduado do Centro Hospitalar e Universitário do Porto, Serviço de Urologia

Assistente Convidado no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

COORDINADOR:

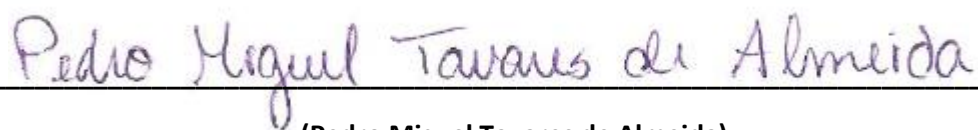
Professor Doutor José Maria Ferreira La Fuente de Carvalho

Assistente Graduado Sénior do Centro Hospitalar e Universitário do Porto, Serviço de Urologia

Professor Catedrático Convidado no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

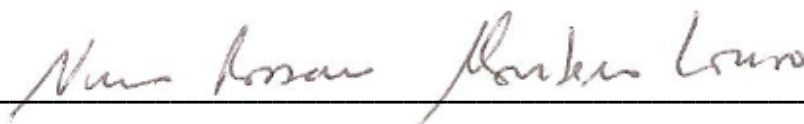
Junho de 2021

AUTOR



(Pedro Miguel Tavares de Almeida)

ORIENTADOR



(Nuno Rossano Monteiro Louro)

COORDINADOR



(José Maria Ferreira La Fuente de Carvalho)

Junho de 2021

AGRADECIMENTOS:

- Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Dr. Nuno Louro por toda a confiança depositada em mim e por me ter acompanhado ativamente ao longo de toda a elaboração desta dissertação, sempre demonstrando grande disponibilidade e me auxiliando em todos os problemas que foram surgindo.
- Em segundo lugar, gostaria também de agradecer ao Professor Doutor José Maria Ferreira La Fuente de Carvalho pela disponibilidade demonstrada desde o início em participar neste projeto.

RESUMO

INTRODUÇÃO: As atuais linhas de orientação recomendam a utilização do espermograma como exame chave no estudo da infertilidade masculina, contudo, esta avaliação apresenta limitações importantes que colocam em causa o seu poder diagnóstico. Para além disso, não existem *cut-offs* validados para os parâmetros avaliados no espermograma que permitam prever o sucesso do tratamento com Técnicas de Reprodução Medicamente Assistida. Como tal, existe uma necessidade de investigar novos biomarcadores mais precisos e com maior potencial para diagnosticar infertilidade e prever o desfecho do tratamento.

OBJETIVOS: Analisar as mais recentes evidências sobre o papel da Taxa de Fragmentação do Ácido Desoxirribonucleico Espermático na prática clínica e avaliar o potencial da utilização deste biomarcador como ferramenta de diagnóstico e auxiliar na seleção de tratamentos.

METODOLOGIA: Foi realizada uma pesquisa eletrónica de artigos científicos publicados nos últimos 10 anos com recurso ao motor de pesquisa avançada da PubMed, utilizando diferentes combinações entre as expressões: *Sperm DNA Fragmentation, Sperm DNA damage, DNA Fragmentation Index, Male infertility, Assisted Reproductive Technology* e *Assisted Reproductive Techniques*.

RESULTADOS: Foram observados níveis significativamente mais elevados da Taxa de Fragmentação do Ácido Desoxirribonucleico Espermático nos indivíduos inférteis em contraste com indivíduos férteis. Comparativamente ao espermograma, o poder diagnóstico deste biomarcador demonstrou ser superior, apresentando simultaneamente menor variabilidade entre medições. Níveis mais elevados de fragmentação da cromatina espermática foram também associados a menor sucesso do tratamento com Técnicas de Reprodução Medicamente Assistida, tendo as técnicas *in vitro* apresentado melhores resultados comparativamente à Inseminação Intrauterina. Para valores de fragmentação superiores a 30%, a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides demonstrou ser o tratamento com melhores resultados.

CONCLUSÃO: A Taxa de Fragmentação do Ácido Desoxirribonucleico Espermático poderá ser um importante novo biomarcador a utilizar na prática clínica em complemento ao espermograma, auxiliando o clínico na realização do diagnóstico e tomada de decisões. Investigações futuras deverão focar-se na realização de estudos controlados e randomizados com populações bem definidas, que permitam confirmar as associações observadas.

PALAVRAS-CHAVE: *DNA Fragmentation, Male Fertility, Assisted Reproductive Techniques*

ABSTRACT

BACKGROUND: The current guidelines recommend the use of the Semen Analysis as the key exam in the assessment of male infertility, however, it has important limitations that call into question its diagnostic power. Furthermore, there are no validated cut-offs for the parameters evaluated in the Semen Analysis that allow to predict the success of the treatment with Assisted Reproductive Medicine Techniques. Therefore, there is a need to research new and more precise biomarkers with increased potential to diagnose infertility and to predict the outcome of the treatment.

AIM OF THE STUDY: To analyse the most recent evidence on the role of the Sperm Deoxyribonucleic Acid Fragmentation in clinical practice and to evaluate the potential of the use of this biomarker as a diagnostic tool and to assist in the treatment selection.

METHODS: An electronic research of articles published in the last ten years was conducted using PubMed's advanced search engine using different combinations of the expressions: Sperm DNA Fragmentation, Sperm DNA damage, DNA Fragmentation Index, Male infertility, Assisted Reproductive Technology and Assisted Reproductive Techniques.

RESULTS: Significantly higher levels of Sperm Deoxyribonucleic Acid Fragmentation were observed in infertile individuals in comparison to fertile ones. Compared to the Semen Analysis, the diagnostic power of this biomarker was superior and simultaneously presented less variability in successive measurements. Higher levels of sperm chromatin fragmentation were also associated with lower success of the treatment with Assisted Reproductive Medicine Techniques, with *in vitro* techniques showing better results compared to Intrauterine Insemination. For fragmentation values higher than 30%, Intracytoplasmic Sperm Injection proved to be the treatment with better results.

CONCLUSION: The Sperm Deoxyribonucleic Acid Fragmentation may be an important new biomarker to be used in clinical practice in addition to the Semen Analysis, helping the clinician making better diagnosis and deciding better treatments. Future research should focus in conducting new controlled and randomized studies with well-defined populations to confirm the associations observed.

KEY-WORDS: *DNA Fragmentation, Male Fertility, Assisted Reproductive Techniques*

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AUC	Área sob a curva
FIV	Fertilização <i>In-Vitro</i>
IC	Intervalo de Confiança
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides
IIU	Inseminação Intrauterina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
QE	Qualidade do Embrião formado <i>in vitro</i>
ROC	<i>Receiver operator characteristic</i>
SCD	<i>Sperm Chromatin Dispersion</i>
SCSA	<i>Sperm Chromatin Structure Assay</i>
TF	Taxa de Fertilização
TFAE	Taxa de Fragmentação do Ácido Desoxirribonucleico Espermático
TG	Taxa de Gravidez
TRMA	Técnicas de Reprodução Medicamente Assistida
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labelling</i>

ÍNDICE

RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
INTRODUÇÃO	1
METODOLOGIA.....	3
RESULTADOS	4
Taxa de Fragmentação do ADN Espermático e Infertilidade	4
Taxa de Fragmentação do ADN Espermático e TRMA	7
Fertilização <i>In-Vitro</i>	8
Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides	9
Inseminação Intrauterina	12
DISCUSSÃO	12
CONCLUSÃO	18
APÊNDICE	19
REFERÊNCIAS.....	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de seleção de artigos	19
---	----

INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), Infertilidade pode ser definida clinicamente como uma patologia reprodutiva na qual um casal é incapaz de atingir uma gravidez após pelo menos um ano de relações sexualmente desprotegidas.¹ Dados estatísticos apontam para que aproximadamente 15% dos casais sejam considerados inférteis globalmente, podendo a infertilidade ser resultado de fatores masculinos ou femininos isoladamente, ou de uma combinação de ambos. O que se verifica epidemiologicamente é que em até 40% dos casos o elemento masculino está implicado na origem da infertilidade do casal, sendo este mesmo o responsável único em 20-30% dos casos.^{2,3}

O diagnóstico de infertilidade masculina é realizado através de uma análise de sémen convencional, para além de uma importante história clínica e exame físico. A análise de sémen visa, de uma forma geral, avaliar o potencial fértil do indivíduo, através de uma análise quantitativa, qualitativa e morfológica dos espermatozóides ejaculados. Em 2010, a OMS publicou a 5ª edição de um manual de procedimentos⁴ criado com o intuito de padronizar a avaliação espermática a nível internacional, o qual é atualmente utilizado como referência nas linhas de orientação Europeias e Americanas. Apesar deste manual apresentar valores de referência padronizados, estudos demonstraram que os parâmetros avaliados rotineiramente carecem de poder diagnóstico de potencial fértil,^{5,6} devendo ser utilizados como medida de cálculo de risco e não como marcadores diagnósticos de infertilidade puros. De facto, o que se verificou foi que existe uma sobreposição em até 15% dos casos, nos quais homens com espermograma dito normal são diagnosticados como inférteis,⁷ casos denominados de infertilidade inexplicada. O comprometimento do potencial diagnóstico desta análise pode ser devido a vários fatores: por um lado está demonstrado a existência de variabilidade interlaboratorial na avaliação do sémen, resultado em parte da fraca adesão às normas publicadas pela OMS e falta de controlo de qualidade na realização dos protocolos padronizados;^{7,8} por outro lado, verificou-se também a existência de variabilidade nas amostras colhidas quer entre indivíduos diferentes, resultado de variações biológicas e étnicas, quer entre o próprio indivíduo em análises realizadas em diferentes momentos no tempo, resultado de variações fisiológicas no fluido ejaculado. Esta variabilidade observada coloca em causa a existência de *cut-offs* estritos estabelecidos para os diferentes parâmetros capazes de definir fertilidade ou infertilidade.⁹ Para além disso, estudos referem que os mesmos parâmetros, mesmo estando inalterados, não permitem afirmar a total funcionalidade de um espermatozóide, dessa forma não refletindo a totalidade dos processos fisiológicos envolvidos nos fenómenos reprodutivos.¹⁰ Atualmente, dado a comprovação das carências apresentadas

pela análise de sémen convencional, verifica-se um maior interesse na investigação a nível molecular do espermatozóide em procura de novos biomarcadores com potencial diagnóstico, com especial destaque para o estudo da cromatina espermática e dos possíveis defeitos desta, nomeadamente a sua fragmentação. A Fragmentação do Ácido Desoxirribonucleico (ADN) Espermático consiste na alteração genética mais comumente detetada na avaliação genética dos espermatozoides.¹¹ Esta encontra-se comprovadamente ligada a casos de infertilidade, dado o facto da integridade da cromatina espermática ser determinante para a correta transmissão da informação genómica paterna para a descendência e também essencial para o correto desenvolvimento do embrião.¹² Para além disso, esta mesma rotura da integridade do ADN espermático foi também observada em homens com espermograma normal,¹³ podendo ser uma das possíveis causas responsáveis pelos casos de infertilidade inexplicada e, como tal, um possível biomarcador diagnóstico útil nestes casos.

Apesar das limitações previamente referidas atribuídas à utilização do espermograma, este continua a representar um exame chave no estudo do elemento masculino aquando do tratamento da infertilidade. Este tratamento deve ser realizado com o intuito de reverter a causa específica identificada na origem da infertilidade, tirando partido de uma de três possíveis abordagens: farmacológica, cirúrgica ou mais recentemente com recurso a Técnicas de Reprodução Medicamente Assistida (TRMA), incluindo a Fertilização *In-Vitro* (FIV), Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) ou Inseminação Intrauterina (IIU). De facto, nas últimas décadas, a área da Reprodução Medicamente Assistida tem sofrido grandes evoluções permitindo aos casais inférteis ter descendência em casos que previamente eram assumidos como intratáveis. Segundo dados estatísticos divulgados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* referentes ao ano de 2017, nos Estados Unidos da América foram realizados aproximadamente 196850 ciclos de tratamento com recurso a TRMA tendo em vista a obtenção de gravidez, resultando num total de 68908 nados-vivos,¹⁴ correspondendo a uma taxa de sucesso de 35%. Estes números mostram que, apesar de cada vez serem mais utilizadas, as TRMA continuam a apresentar taxas de sucesso reduzidas, implicando frequentemente a realização de vários ciclos de tratamento com maior morbilidade associada e implicações económicas significativas. Esta significativa taxa de insucessos revela a necessidade de novas ferramentas capazes de orientar a seleção de tratamentos com TRMA e de prever a probabilidade de sucesso destes mesmos. A análise de sémen convencional, mais uma vez se revela com pouco poder orientador neste contexto. Segundo as recomendações publicadas pela Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia, de entre os vários parâmetros avaliados, apenas a quantidade e motilidade espermática são recomendados como parâmetros orientadores para tratamento com TRMA, revelando-se, contudo, a incapacidade de estabelecer

cut-offs válidos para as diferentes técnicas de tratamento.¹⁵ Para além disso, foi demonstrado ainda a fraca capacidade preditora de sucesso do espermograma após a aplicação das TRMA.⁸ Também neste âmbito da Reprodução Medicamente Assistida a Taxa de Fragmentação do ADN Espermático (TFAE) se pode revelar uma mais valia. O que se observou foi que a utilização de espermatozóides com cromatina estruturalmente danificada durante o tratamento com TRMA, devido ao seu papel previamente referido aquando dos processos fisiológicos reprodutivos, será uma das causas responsáveis pelas baixas taxas de sucesso destas, com diminuição da taxa de fertilização, aumento da taxa de abortamento espontâneo e maior incidência de alterações na descendência.¹⁶ Tendo isto em conta, a análise da Taxa de Fragmentação do ADN espermático poderá ser também utilizada como um potencial biomarcador preditivo de desfecho das TRMA, auxiliando na escolha do tratamento a ser utilizado.

As atuais linhas de orientação abordam a questão do potencial da utilização deste biomarcador, reconhecendo a sua relação com a infertilidade, contudo a ausência de *cut-offs* validados estabelecidos e a ausência de ensaios clínicos controlados e randomizados em grandes amostras não permite a sua recomendação. Como tal, a presente revisão tem como objetivo analisar as mais recentes evidências sobre o papel atual da TFAE na prática clínica e avaliar o potencial futuro da utilização deste biomarcador enquanto ferramenta de diagnóstico e a sua utilização na área da Reprodução Medicamente Assistida, enquanto biomarcador preditivo de desfecho e auxiliar na seleção de tratamentos em casos de infertilidade.

METODOLOGIA

Foi realizada uma pesquisa eletrónica de artigos científicos com recurso ao motor de pesquisa avançada da PubMed, utilizando as seguintes combinações de expressões e termos de pesquisa: ((*Sperm DNA Fragmentation*) OR (*Sperm DNA damage*) OR (*DNA Fragmentation Index*)) AND (*Male infertility*) e ((*Sperm DNA Fragmentation*) OR (*Sperm DNA damage*) OR (*DNA Fragmentation Index*)) AND ((*Assisted Reproductive Technology*) OR (*Assisted Reproductive Techniques*)). Foram incluídos artigos originais cujos *abstracts* se encontravam disponíveis para leitura, publicados nos últimos 10 anos, escritos em língua inglesa e estudos realizados em humanos.

Após a seleção dos artigos que cumpriam os critérios de inclusão, os respetivos títulos e *abstracts* foram analisados e efetuada nova seleção utilizando como critérios de exclusão: tópico de interesse pouco relevante para a presente revisão; investigação focada em indivíduos com uma patologia sistémica, urológica ou alteração cromossómica específica; investigação focada em indivíduos com uma alteração espermática específica; utilização de outras técnicas de

deteção da TFAE para além de *SCSA*, *SCD Test*, *TUNEL Assay* e *COMET Assay*; texto integral não obtido.

Por fim, foram ainda utilizadas referências e citações relevantes dos artigos selecionados inicialmente para encontrar outros artigos relacionados, neste caso não tendo em conta o ano de publicação.

RESULTADOS

Um total de 845 artigos foram identificados após a pesquisa eletrónica cumprindo os critérios de inclusão: artigo original, publicado nos últimos 10 anos, artigo escrito em inglês, investigação feita em humanos e *abstract* disponível. De entre estes, 156 artigos foram excluídos por se terem revelado duplicados. Os títulos e *abstract* de 689 artigos foram analisados e 55 artigos foram selecionados para leitura integral do texto, após aplicação dos critérios de exclusão previamente mencionados. Por fim, foram ainda incluídos 5 artigos obtidos por análise das referências de artigos já selecionados, culminando num total de 60 artigos incluídos na presente revisão.

Taxa de Fragmentação do ADN Espermático e Infertilidade

Atualmente, as técnicas mais frequentemente utilizadas na investigação e prática clínica para deteção da fragmentação do ADN espermático são: *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA), *Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labelling* (TUNEL) assay, *Sperm Chromatin Dispersion* (SCD) test e *COMET assay*. Um estudo realizado por Ribas-Maynou *et al.*,¹⁷ com o intuito de comparar a utilização destas técnicas, demonstrou que todos os quatros métodos permitiram detetar uma TFAE significativamente diferente entre os grupos fértil vs. infértil, com uma TFAE média mais elevada observada no grupo infértil. Para além disso, o mesmo estudo demonstrou ainda que os resultados destas técnicas apresentaram correlação positiva entre elas, reforçando que todas estas técnicas são úteis para avaliação e estudo da integridade da cromatina espermática.¹⁷

Uma grande dispersão de valores *cut-off* diagnósticos para infertilidade foi observada nos diversos artigos revistos, variando quer entre estudos utilizando diferentes técnicas de deteção, quer entre estudos utilizando a mesma técnica. De entre os diferentes artigos revistos utilizando o SCSA, dois estudos tinham como objetivo estabelecer um valor limiar de TFAE que permitisse diferenciar entre indivíduos férteis e inférteis.^{17,18} O valor limiar com maior poder diagnóstico foi observado num estudo conduzido por Venkatesh *et al.*¹⁸ numa amostra constituída por 100 indivíduos com diagnóstico de infertilidade idiopática e 50 indivíduos comprovadamente férteis.

O que este autor verificou foi que um *cut-off* de TFAE de 30.28% apresentaria capacidade para diagnóstico diferencial entre indivíduos férteis e inférteis, com uma área sob curva (AUC) ROC de 0.919 e com uma sensibilidade e especificidade de aproximadamente 88.1% e 93.9%, respetivamente. Em contraste, Ribas-Maynou *et al.*¹⁷ observou que um valor inferior para este *cut-off* de 18.9%, se demonstrou igualmente capaz de diferenciar indivíduos férteis e inférteis contudo, este valor revelando-se com menor poder diagnóstico (AUC=0.792) e igualmente menor sensibilidade e especificidade (59.5% e 87.5%, respetivamente) quando comparado ao reportado por Venkatesh *et al.*¹⁸

Relativamente à avaliação da TFAE utilizando o *TUNEL assay*, cinco artigos revistos procuraram estabelecer um valor limiar diagnóstico de infertilidade, tendo sido reportado nos diferentes estudos um intervalo de valores limiares variando entre 20.3 e 34%.^{17,19-22} De entre estes, o valor limiar com maior potencial diagnóstico foi reportado num estudo recente conduzido por Hassanen *et al.*¹⁹ numa amostra constituída por 394 indivíduos (354 inférteis e 40 comprovadamente férteis) reportando um *cut-off* diagnóstico de 20.3% (AUC=0.992), com sensibilidade máxima de 96.6% e especificidade de 88.5%. Valores próximos teriam já sido também reportados por Ribas-Maynou *et al.*¹⁷ e Malić Vončina *et al.*²⁰ em estudos prévios, onde se observaram como significativos para o diagnóstico de infertilidade *cut-offs* de 20.5% (AUC=0.903; Sensibilidade=76% e Especificidade=92%) e 25% (AUC=0.7; Sensibilidade=77% e Especificidade=61%), respetivamente.

Em termos da utilização do *SCD test* para avaliação da TFAE, três artigos revistos procuraram estabelecer um valor limiar diagnóstico capaz de prever o potencial fértil do indivíduo, tendo sido observado um intervalo de valores limiares variando entre 20 e 26.1%.^{17,23,24} O valor limiar com maior poder diagnóstico foi observado no estudo realizado por Ribas-Maynou *et al.*,¹⁷ no qual se verificou um valor limiar de 22.75% (AUC=0.869; Sensibilidade=73% e Especificidade=91.8%), acima do qual seria possível diagnosticar infertilidade do elemento masculino. Um valor limiar com poder diagnóstico muito semelhante foi também observado por Wiweko *et al.*,²⁴ o qual reportou um valor limiar de 26.1% (AUC=0.862; Sensibilidade=80.8% e Especificidade=86.1%) como significativo.

Por fim, relativamente à utilização do *COMET assay*, três dos artigos revistos procuraram estabelecer um valor *cut-off* para a TFAE capaz de prever o potencial fértil do indivíduo.^{17,25,26} Um intervalo de valores variando entre 15 e 45.37% foi obtido, demonstrando-se esta técnica como a que apresentou o maior intervalo de valores *cut-off* diagnósticos reportados nos diferentes artigos revistos. O valor com maior poder diagnóstico foi verificado num estudo realizado por Simon *et al.*,²⁶ numa população de indivíduos com infertilidade idiopática, tendo sido reportado um valor limiar de diagnóstico de 25% (AUC=0.970; Sensibilidade=64% e

Especificidade=98.5%). Por sua vez, o valor diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade simultaneamente, foi observado por Ribas-Maynou *et al.*,¹⁷ tendo reportado como significativo um valor *cut-off* de 45.37%, com sensibilidade e especificidade de 85% e 92%, respetivamente. Contudo, este valor demonstrou-se com menor potencial diagnóstico quando comparado ao valor observado por Simon *et al.*²⁶ (AUC=0.937 e AUC=0.970, respetivamente).

No geral, os diferentes estudos demonstram uma tendência para a existência de níveis significativamente superiores de fragmentação do ADN espermático em indivíduos inférteis comparativamente a indivíduos comprovadamente férteis, tendência essa também observável em casos de infertilidade masculina idiopática,^{18,26} e em casos de infertilidade masculina inexplicada.^{13,27-29} Num estudo conduzido por Oleszczuk *et al.*¹³ numa população de 119 casais com infertilidade inexplicada, o que se verificou mesmo foi que em aproximadamente um quarto destes casais, o elemento do sexo masculino apresentava níveis de TFAE suficientemente elevados para diminuir significativamente o potencial fértil do indivíduo.

Quando avaliada a existência de correlação entre a TFAE e os diferentes parâmetros avaliados no espermograma, a maioria dos estudos revistos revela a existência de uma correlação negativa entre ambos, com especial destaque para a motilidade,^{20,23,25,30-36} que se revelou como o parâmetro no qual é possível observar uma maior correlação, tal como verificado por Belloc *et al.*³⁷ Outras correlações importantes foram também observadas para a morfologia,^{23,25,30,32} e concentração espermática,^{23,30,32} e em menor grau para a contagem de espermatozóides.^{23,25} Em contraste, num estudo conduzido por Zandieh *et al.*²⁸ numa população de indivíduos com infertilidade inexplicada, essa mesma correlação não foi observada. De igual forma, também Evgeni *et al.*³⁴ observou que a TFAE não poderia ser calculada apenas considerando os parâmetros avaliados no espermograma, devendo por essa razão este biomarcador ser encarado como um preditor de fertilidade independente.

Relativamente à utilização clínica da TFAE em comparação ao espermograma, um estudo prospetivo conduzido por Malm *et al.*³⁸ com o intuito de avaliar a existência de uma associação entre a análise de sémen e a probabilidade de obter descendência a longo prazo, demonstrou que tanto a TFAE isoladamente, como a motilidade e concentração espermática se apresentaram como marcadores capazes de prever o potencial fértil do indivíduo. De igual forma, também Wiweko *et al.*²⁴ verificou resultados semelhantes, contudo, o poder diagnóstico de infertilidade da TFAE revelou-se superior ao do espermograma rotineiramente utilizado, reforçando assim a hipótese da utilização deste biomarcador na prática clínica. Para além disso, Giwercman *et al.*³⁹ demonstrou que em indivíduos com infertilidade inexplicada, por si só a TFAE se apresentava capaz de diagnosticar infertilidade (TFAE $\geq 20\%$: OR 5.1 e IC 95%: 1.2-23), contudo, na presença de uma alteração espermática detetada concomitantemente não só o

potencial diagnóstico deste biomarcador aumentava (TFAE $\geq 20\%$: OR 15 e IC 95%: 3-78), como também seria possível observar uma diminuição significativa do potencial fértil para valores de TFAE inferiores aos verificados aquando da utilização deste biomarcador isoladamente.

Relativamente à avaliação da existência de uma possível variabilidade intraindividual dos valores de TFAE em análises sucessivas, um estudo conduzido por Oleszczuk *et al.*⁴⁰ numa população constituída por 616 indivíduos inférteis, distribuídos por dois grupos (TFAE $>30\%$ ou TFAE $\leq 30\%$, utilizando o SCSA), verificou a existência de um coeficiente de variação médio de aproximadamente 30%, quando realizada análise subsequente num período de 30 meses. Contudo, e apesar da significativa variação registada, 85% dos indivíduos mantiveram-se no grupo onde tinham sido incluídos inicialmente. Por sua vez, Muratori *et al.*²¹ verificou que quanto maior o intervalo de tempo entre duas medições, maior seria a variabilidade intraindividual apresentada, no entanto, quando considerado um intervalo de aproximadamente 100 dias, este autor obteve um coeficiente de variação inferior a 20% para a TFAE (utilizando o *TUNEL assay*), valor inferior ao observado por Oleszczuk *et al.*⁴⁰ Adicionalmente, Muratori *et al.*²¹ verificou que considerando o mesmo intervalo entre as medições, a variabilidade da TFAE registada foi inferior à variabilidade observada para os diferentes parâmetros do espermograma. Um outro estudo conduzido por Vinnakota *et al.*³¹ observou ainda que, numa segunda análise da TFAE realizada após 3 a 8 meses, 71% dos indivíduos que apresentavam TFAE superiores a 30% inicialmente, na análise subsequente apresentavam redução para valores inferiores a 30%. De entre estes indivíduos, o que se verificou foi que aproximadamente 40%, durante o intervalo entre análises, estiveram sujeitos a tratamento com antioxidantes em associação a alterações dietéticas, perda de peso e aumento da prática de exercício físico, tratamento esse que possivelmente terá conduzido a redução aparente da TFAE.

Taxa de Fragmentação do ADN Espermático e TRMA

A generalidade dos estudos revistos aponta para a existência de uma relação entre a TFAE e o desfecho aquando da utilização das TRMA, com valores mais elevados de TFAE associados a maiores taxas de insucesso por parte destas técnicas, sobretudo nos casos de IIU e FIV. Os estudos sugerem que as alterações do ADN espermático não só podem ter impacto a nível da obtenção de uma gravidez clínica ou bioquímica, como também podem influenciar o processo de fertilização e qualidade do embrião formado *in vitro*. Para além disso, um estudo conduzido por Kennedy *et al.*⁴¹ numa população de 233 casais propostos a tratamento com TRMA (FIV/ICSI ou IIU) e com o intuito de avaliar a existência de uma associação entre a TFAE e a ocorrência de abortamentos espontâneos após realização de tratamento, observou que, nos casais onde se

verificaram estes eventos, os níveis de TFAE detetados eram significativamente mais elevados, sugerindo que a fragmentação da cromatina espermática pode ser um bom preditor de desfecho do tratamento.

Fertilização *In-Vitro*

Um total de 19 artigos revistos procuraram avaliar a existência de associação entre a TFAE e os *outcomes* clínicos aquando da utilização da FIV. Nos estudos revistos foi possível observar que níveis mais elevados de TFAE foram identificados nos casais com insucesso do tratamento, em comparação com os casais nos quais este se revelou bem-sucedido. Comhaire *et al.*⁴² demonstrou, através da criação de um modelo matemático, que quanto mais elevados os níveis da TFAE maior a probabilidade de insucesso desta técnica. Adicionalmente, quando avaliados estes mesmos níveis em casais com infertilidade inexplicada, também foi observada esta diferença entre os dois grupos.⁴³

Os três principais *outcomes* clínicos reportados como negativamente influenciados pela fragmentação do ADN foram: Taxa de gravidez (TG), Taxa de Fertilização (TF) e Qualidade do Embrião formado *in vitro* (QE). Um total de 17 artigos revistos procuraram avaliar a associação entre TFAE e TG (9 *SCD test*,^{42,44-51} 3 *SCSA*,⁵²⁻⁵⁴ 2 *TUNEL assay*,^{54,55} 3 *Comet assay*^{26,56,57}). De entre estes, uma diminuição significativa da TG para valores elevados de TFAE foi reportada em 10 dos artigos revistos.^{26,42-45,48,49,53,54,57} O *cut-off* com maior valor prognóstico foi observado por Simon *et al.*²⁶ utilizando o *COMET assay*, reportando um valor *cut-off* de 52% (AUC=0.905; Sensibilidade=95% e Especificidade=80%) acima do qual a probabilidade de obter uma gravidez clínica diminuiria significativamente. Estes mesmo valor foi posteriormente reforçado num segundo estudo conduzido pelo mesmo autor, no qual demonstrou que TFAE superiores a 50% não só resultavam em diminuições acentuadas da TG, como essas mesmas diminuições poderiam ser também observadas em casais com infertilidade inexplicada.⁴³ Diferentes valores *cut-offs* foram observados quando utilizadas outras técnicas de deteção. Utilizando o *SCD test*, uma gama de valores prognósticos variando entre 16-28% foram reportados, contudo com valor de AUC máximo de 0.7 verificado por Bounartzi *et al.*⁴⁸ inferior ao registado utilizando o *COMET assay*. Os *cut-offs* reportados com menor valor prognóstico foram observados utilizando o *SCSA*, com o qual Zhang *et al.*⁵³ reportou um valor preditivo de desfecho de 11.3% (AUC=0.574, Sensibilidade=56.1% e Especificidade=60.0%).

Relativamente ao *outcome* clínico TF, 10 artigos procuraram avaliar a sua associação com a TFAE (5 *SCD test*,^{45,48,50,51,58} 3 *COMET assay*,^{26,56,57} 1 *TUNEL assay*,⁵⁵ 1 *SCSA*⁵²). De entre estes, foram reportadas diminuições significativas da TF para valores mais elevados de TFAE em 5 dos artigos revistos.^{26,52,56-58} Num estudo conduzido por Pregl Breznik *et al.*⁵⁸ com o intuito de avaliar

a capacidade preditora de fertilização de diferentes biomarcadores clínicos, observou-se que a TFAE, avaliada utilizando o *SCD test*, era capaz de prever a capacidade do espermatozóide em fertilizar o ovócito, apresentado um valor *cut-off* preditivo de sucesso de fertilização de 6.45% (AUC=0.664; Sensibilidade=88.5% e Especificidade=44.8%). Por sua vez, Oleszczuk *et al.*⁵² observou diminuição significativa da TF para valores de TFAE entre 10-20% e superiores a 30%, utilizando o *SCSA*. Utilizando o *COMET assay*, também Simon *et al.* observou em dois estudos diferentes diminuição significativa da TF para valores de TFAE superiores a 40%.^{56,57}

Relativamente ao outcome clínico QE, 13 artigos procuraram avaliar a associação entre este e a TFAE (9 *SCD test*,^{44-51,58} 2 *COMET assay*,^{26,57} 1 *SCSA*,⁵² 1 *TUNEL assay*⁵⁵). De entre os estudos referidos, diminuições significativas da QE foram reportadas em 7 artigos.^{26,44-46,52,57,58} Um estudo retrospectivo realizado por Kim *et al.*⁴⁶ utilizando o *SCD test*, e com o objetivo de averiguar a influência da TFAE na formação do embrião e sua qualidade, observou que valores de TFAE superiores a 30.7% (AUC=0.727; Sensibilidade=80% e Especificidade=54.2%) estavam associados a diminuição da qualidade do embrião formado. Um valor muito próximo foi também verificado por Tandara *et al.*⁴⁴, utilizando o mesmo método de deteção, reportando um *cut-off* de 26% (AUC=0.71; Sensibilidade=60% e Especificidade=72%) como significativo. Também Zheng *et al.*⁴⁵ observou impacto significativo neste *outcome* para valores de TFAE superiores ou iguais a 21%, utilizando o *SCD test*. Por sua vez, Oleszczuk *et al.*⁵² observou diminuição significativa da qualidade do embrião para valores de TFAE superiores a 20%, utilizando o *SCSA*.

Para além dos *outcomes* clínicos referidos anteriormente, outras associações significativas foram também estudadas, menos frequentemente, entre a TFAE e a Taxa de Implantação (1 *SCD test*⁴⁵) e Taxa de Abortamento (2 *SCD test*,^{45,47} 1 *COMET assay*,⁴³ 1 *SCSA*,⁵² 1 *TUNEL assay*⁵⁵). Relativamente ao *outcome* clínico Taxa de Implantação, Zheng *et al.*⁴⁵ verificou que para valores de TFAE iguais ou superiores a 21%, medidos utilizando o *SCD test*, seria possível observar diminuição significativa desta mesma taxa ($p < 0.05$). Em contraste, nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada entre a TFAE e a Taxa de Abortamento, contudo, taxas sucessivamente mais elevadas foram observadas, por Zheng *et al.*,⁴⁵ para valores em crescendo de TFAE.

Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides

Um total de 23 artigos revistos procuraram avaliar a existência de associação entre a TFAE e os *outcomes* clínicos, aquando do tratamento utilizando a ICSI. De forma semelhante às outras técnicas de tratamento também no caso da ICSI foram observados níveis mais elevados de TFAE nos indivíduos cujos ciclos de tratamento foram mal sucedidos,^{53,59,60} contudo, essa mesma observação não se revelou consensual entre os diferentes artigos revistos.^{57,61,62} De igual forma,

também a literatura demonstra uma menor relação e influência da TFAE sobre os diferentes *outcomes* clínicos aquando do tratamento com ICSI, comparativamente aos casos de IIU e FIV. De facto, Bungum *et al.*⁶³ verificou que para valores de TFAE superiores a 30%, o tratamento com ICSI destacou-se como o tratamento com o qual foi possível obter melhores resultados.

Em termos de *outcomes* clínicos e a sua relação com a TFAE, novamente a TG, TF e QE demonstraram-se como os principais *outcomes* estudados nos diferentes artigos revistos. Relativamente ao *outcome* clínico TF, 15 artigos procuraram avaliar a existência de uma associação entre este e os valores de TFAE (11 *SCD test*,^{46-51,58,59,64-66} 2 *TUNEL assay*,^{55,61} 1 *SCSA*,⁵² 1 *COMET assay*⁵⁷). Um estudo retrospectivo conduzido por Xue *et al.*⁵¹ numa população de 550 casais inférteis, dos quais 135 tratados com ICSI, com o intuito de avaliar o efeito da TFAE sobre diferentes *outcomes* clínicos, verificou que níveis mais elevados de TFAE estavam associados a menores TF ($p < 0,001$). O mesmo autor observou ainda uma diminuição significativa da TF para valores de TFAE superiores a 22.3% (AUC=0.68; IC: 0.59 – 0.77), utilizando o *SCD test*.⁵¹ Em contraste, nenhum dos restantes artigos verificou a mesma associação significativa.

Relativamente ao *outcome* clínico TG, 13 dos artigos revistos procuraram avaliar a sua associação com a TFAE (8 *SCD test*,^{46-48,50,51,59,64,66} 1 *TUNEL assay*,⁵⁵ 3 *SCSA*,^{52,53,67} 1 *COMET assay*⁴³), verificando-se associação significativa em 3 dos artigos revistos.^{48,53,59} De entre estes, dois autores procuraram estabelecer valores *cut-off* para a TFAE acima dos quais a TG diminuísse significativamente. Num estudo prospetivo realizado por Nuñez-Calonge *et al.*⁵⁹ numa população de 70 casais inférteis que recorreram a tratamento com ICSI utilizando ovócitos de dadoras comprovadamente férteis, foi observado que a TFAE se apresentou como um bom biomarcador prognóstico, com diminuição marcada da TG para valores de TFAE superiores a 17% (AUC=0.704; Sensibilidade=77.8% e Especificidade=71.1%), utilizando o *SCD test*, com descida da referida taxa de 84.2% (quando TFA > 17%) para 38.2% (quando TFA < 17%). Zhang *et al.*⁵³ verificou também uma diminuição significativa da TG, utilizando o *SCSA*, para valores de TFAE superiores a 30.3% (AUC=0.567; Sensibilidade=50.6% e Especificidade=68.8%), com descida da respetiva taxa de aproximadamente 80% para aproximadamente 58% ($p < 0.005$).

Relativamente ao *outcome* clínico QE, 12 artigos procuraram avaliar a existência de uma relação entre este e a TFAE (9 *SCD test*,^{46-48,50,51,58,60,64,66} 1 *TUNEL assay*,⁵⁵ 1 *SCSA*,⁵² 1 *COMET assay*⁵⁷). Num estudo conduzido por Wdowiak *et al.*⁶⁰ com o intuito de avaliar o impacto da TFAE no desenvolvimento embrionário, foi observado que não só o aumento das taxas de fragmentação estava associado a diminuição da qualidade do embrião formado, como também, que altos níveis de TFAE seriam capazes de provocar atraso no desenvolvimento do embrião com aumento do tempo necessário até atingir a fase de blastocisto, comprometendo a capacidade de alcançar uma gravidez. De igual forma, Kim *et al.*⁴⁶ verificou uma associação

significativa entre a TFAE e a taxa de obtenção de embriões com boa qualidade, observando diminuição significativa desta taxa (38.1 vs 20.0; $p = 0.038$) para valores de TFAE iguais ou superiores a 30.7%, medidos utilizando o *SCD test*. A mesma associação negativa não foi verificada em nenhum dos restantes artigos.

Por fim, quando avaliada a existência de associação entre a TFAE e as Taxa de Implantação e Taxa de Abortamento, nenhuma associação foi observada nos diferentes estudos revistos.^{47,52,55,67}

Aquando do tratamento com ICSI, dois métodos de obtenção de espermatozóides podem ser utilizados: por ejaculação ou extraídos diretamente do testículo. A literatura revista demonstra a existência de diferença significativa nos resultados obtidos quando comparados os dois métodos. Um estudo prospetivo conduzido por Zhang *et al.*⁶⁸ procurou avaliar as diferenças em termos de *outcomes* clínicos entre a utilização de espermatozóides ejaculados comparativamente à utilização de espermatozóides testiculares, no tratamento de uma população de indivíduos inférteis com altos níveis de TFAE. Foram incluídos no estudo um total de 102 casais inférteis, com infertilidade feminina excluída e elemento masculino com níveis de TFAE superiores ou iguais a 30% (medidos utilizando o *SCSA*), tendo-se verificado um aumento da TG (36% vs 14.6%, $p = 0.017$) e da Taxa de nados-vivos (38.5% vs 9.8%, $p = 0.001$) nos ciclos de ICSI utilizando espermatozóides testiculares. Resultados semelhantes foram também observados num estudo conduzido por Pabuccu *et al.*⁶⁹ numa população de casais com infertilidade inexplicada e antecedentes de pelo menos duas tentativas de TRMA falhadas, nos quais o elemento masculino se apresentou com níveis de TFAE superiores ou iguais a 30% (medidos utilizando o *TUNEL assay*). O que este autor igualmente verificou foi a existência de maior TG nos indivíduos tratados com ICSI utilizando espermatozóides testiculares, comparativamente aos indivíduos que utilizaram espermatozóides ejaculados (41.9% vs 20%, respetivamente; $p = 0,045$). Em contraste, as Taxas de Fertilização e Implantação não se demonstraram significativamente diferentes entre ambos os tipos de tratamento.^{68,69}

Um outro estudo conduzido por Arafa *et al.*⁷⁰ procurou avaliar uma população de casais inférteis (indivíduos com TFAE superiores ou iguais a 30%, medida utilizando o *SCD test*, e infertilidade feminina excluída) que tinham recorrido previamente a tratamento com ICSI utilizando espermatozóides ejaculados, e comparar os *outcomes* clínicos após realização de novo ciclo de ICSI utilizando espermatozóides testiculares. O que este autor observou foi que a realização de novo ciclo de tratamento, desta feita utilizando espermatozóides testiculares, possibilitou aumentar o sucesso da técnica, permitindo simultaneamente obter uma TG e uma Taxa de nados-vivos superior ao previamente obtido. Novamente, a TF não se demonstrou

significativamente diferente entre os dois tipos de tratamento, para além disso, este estudo demonstrou ainda que a QE também foi semelhante entre ambos.

Curiosamente, Herrero *et al.*⁷¹ num estudo realizado numa população de casais inférteis com pelo menos duas tentativas prévias mal sucedidas de tratamento com ICSI utilizando espermatozóides ejaculados, verificou que, numa tentativa subsequente utilizando espermatozóides testiculares, o sucesso da técnica e os *outcomes* clínicos (TG e Taxa de nados-vivos) eram superiores apenas nos indivíduos onde se verificou a existência de altos níveis de TFAE (*TUNEL* $\geq$ 36% e *SCSA* $\geq$ 25%), sem diferenças significativas observadas entre os dois tipos de tratamento nos indivíduos nos quais se verificaram baixos níveis de TFAE.

Inseminação Intrauterina

Apenas 3 artigos incluídos na presente revisão procuraram avaliar a influência da TFAE nos *outcomes* clínicos aquando da utilização da IIU. Uma tendência para níveis superiores de TFAE, apesar de não significativa, foi observada nos casais nos quais o tratamento com IIU não foi bem sucedido.⁶¹ Em termos de *outcomes clínicos*, num estudo conduzido por Bungum *et al.*⁶³ verificou-se que níveis de TFAE superiores a 30%, utilizando o *SCSA*, estavam associados a menor TG clínica e bioquímica e menor percentagem de partos por ciclo de tratamento realizado. Bungum *et al.*⁶³ observou ainda que para valores de TFAE mais elevados, a realização de tratamento recorrendo a FIV e ICSI estava associado a melhores resultados comparativamente ao tratamento com IIU, sobretudo quando TFAE superior a 30%.

DISCUSSÃO

A TFAE tem sido amplamente estudada como um possível novo biomarcador a utilizar na prática clínica, face às carências apresentadas pela análise de sémen convencional no que toca à capacidade de prever o potencial fértil do indivíduo e capacidade de prever o desfecho após realização de tratamento com TRMA. Diferentemente dos parâmetros avaliados como motilidade, morfologia ou concentração espermática, o papel fisiológico da integridade do ADN espermático adquire importância não só aquando da fertilização, mas também nos processos pós-fertilização, sobretudo no correto desenvolvimento embrionário. Desta forma, a análise da TFAE permitirá avaliar com melhor detalhe a total funcionalidade do espermatozóide, algo não conseguido avaliar pelo espermograma e que poderá explicar as diferenças observadas aquando da utilização dos dois métodos.

Os resultados da presente revisão apoiam a possível utilização deste biomarcador na prática clínica quer em termos diagnósticos, quer em termos de auxiliar na escolha de

tratamento. Tal como verificado, a utilização da TFAE demonstrou ter vantagens significativas comparativamente à utilização do espermograma: maior capacidade diagnóstica de infertilidade, menor variabilidade intraindividual em medições sucessivas e capacidade diagnóstica de potencial fértil mesmo nos casos de infertilidade inexplicada, situações previamente referidas como limitações importantes da utilização da análise de sémen convencional. A evidência de níveis significativamente elevados de TFAE em indivíduos com infertilidade inexplicada comparativamente a indivíduos férteis, permite levantar a hipótese que alterações na integridade da cromatina espermática podem ser uma possível causa por detrás do baixo potencial fértil apresentado por estes indivíduos. Esta observação pode ter implicações clínicas significativas: por um lado, a infertilidade masculina inexplicada poderá ser uma possível indicação clínica para pesquisa destas alterações, de forma a fornecer pistas importantes sobre a causa da infertilidade destes doentes e consequente melhor orientação em termos de tratamento; por outro lado, a evidência de altos níveis de fragmentação do ADN espermático nestes indivíduos sugere a hipótese de a TFAE ser um biomarcador diagnóstico independente de fertilidade, algo também já postulado previamente por outros autores. Contudo, a utilização da TFAE isoladamente enquanto método diagnóstico não deve ser recomendado, tendo sido observado que a sua utilização em complementaridade com o espermograma permite não só um estudo mais completo do doente, como também permite aumentar o potencial diagnóstico deste biomarcador.³⁹

Uma das principais limitações atuais da utilização da TFAE na prática clínica prende-se com o facto da não existência de consensos no que toca a qual o melhor método para avaliar a TFAE e qual o valor limiar acima do qual podemos diagnosticar infertilidade. A avaliação da fragmentação do ADN espermático utilizando o *TUNEL assay* tem por base a marcação dos locais de fragmentação das cadeias do ADN com recurso a fluorescência, com posterior medição dessa mesma fragmentação utilizando citometria de fluxo.⁷² De igual forma, também o *SCSA* tira partido da utilização de corantes fluorescentes e citometria de fluxo, contudo, este método exige um passo inicial de desnaturação do ADN (com recurso a um fonte de calor ou baixo pH) previamente à adição da coloração, desnaturação essa que ocorrerá sobretudo nos locais de fragmentação.⁷³ Relativamente ao *COMET assay*, este método baseia-se na realização de um processo de eletroforese de espermatozóides lisados e corados com coloração fluorescente, com posterior visualização de uma imagem em forma de cometa, na qual a cabeça do cometa corresponde a cadeias de ADN intactas e a cauda do cometa a cadeias de ADN fragmentadas.⁷² Por fim, o *SCD test* tem também por base a realização de um processo inicial de desnaturação do ADN espermático, com posterior visualização em microscopia de fluorescência da dispersão da cromatina, onde será possível observar formação de halos de grande tamanho quando na

presença de cadeias de ADN intactas, e ausência ou formação de halos de pequeno tamanho quando na presença de cadeias fragmentadas.⁷²

Considerando as características apresentadas por cada método, devem ser tidas em conta vantagens e desvantagens aquando da escolha de qual o exame mais útil em termos clínicos. Por um lado, a utilização de citometria de fluxo confere vantagens importantes à utilização do *TUNEL assay* e do *SCSA*, uma vez que permite não só a realização de uma análise de grande quantidade de espermatozoides rapidamente e com elevada sensibilidade, como também permite alta reprodutibilidade do teste, quando garantido um bom controlo de qualidade do procedimento. Em contrapartida, a utilização de técnicas baseadas na microscopia (como o *SCD test*) estão mais suscetíveis a diferenças de resultados consequentes à variabilidade interoperador e subjetividade da observação, podendo exigir simultaneamente um processo de análise mais demorado.⁷⁴ Por outro lado, é importante ter em conta que de entre os métodos referidos apenas o *TUNEL assay* e o *COMET assay* permitem realizar uma determinação direta da fragmentação do ADN espermático, enquanto os restantes métodos apenas permitem efetuar uma determinação indireta, baseada em parte na susceptibilidade do ADN espermático para a desnaturação.^{17,73} Para além disso, é importante considerar ainda que a fragmentação do ADN espermático pode ocorrer quer em apenas uma das cadeias do ADN, quer em ambas as cadeias simultaneamente, sendo que o *TUNEL assay*, o *SCSA* e o *SCD test* permitem detetar ambos os tipos de fragmentação, enquanto que o *COMET assay* permite detetar sobretudo fragmentação de cadeia única.^{17,74}

A ausência de consensos observada na literatura pode ser em parte explicada por estas importantes diferenças inerentes aos diferentes métodos quer em termos de procedimento da análise, quer em termos de qual o componente da fragmentação do ADN espermático detetado, diferenças essas que colocam em causa a comparação dos diferentes métodos. Adicionalmente, tal como observado, a presença ou ausência de outras alterações espermáticas concomitantes pode influenciar o próprio valor limiar diagnóstico da TFAE, o que indica que poderá ser também necessário estratificar os doentes consoante essas mesmas alterações observadas no espermograma, de forma a aumentar ainda mais a significância da comparação dos resultados. No geral, a presente revisão não permite recomendar qual o método ideal para avaliação da TFAE, tendo-se demonstrado que os quatro métodos de deteção permitem não só diagnosticar infertilidade significativamente, como também apresentam relativa capacidade para prever o desfecho do tratamento. Contudo, os dados observados sugerem o *TUNEL assay* como superior comparativamente aos restantes, uma vez que demonstrou ter o mais elevado poder diagnóstico observado (AUC máximo de 0.992), com elevada sensibilidade (96.6%) e especificidade (88.5%). Para além disso, o *TUNEL assay* apresenta ainda capacidade para

deteção direta da TFAE e capacidade para detetar ambos os tipos de fragmentação do ADN espermático, sendo por isso um bom método para utilização na prática clínica em termos diagnósticos. Contudo, algumas desvantagens limitam atualmente a sua utilização nomeadamente o alto custo do procedimento (devido à utilização de citometria de fluxo) e a significativa variabilidade interlaboratorial de resultados, consequente à ausência de standardização dos protocolos utilizados.⁷² De facto, os resultados demonstram que o *TUNEL assay* apresentou o segundo maior intervalo de valores limiares diagnósticos reportados, traduzindo a necessidade de criação de um protocolo aplicável a nível global, de forma a aumentar a uniformidade dos resultados e permitir a sua recomendação.

Outra constatação importante desta revisão reside no facto de a TFAE ter demonstrado uma correlação negativa com os diferentes parâmetros espermáticos. Tendo em conta que indivíduos com alterações marcadas dos parâmetros espermáticos mais provavelmente serão encaminhados para realização de tratamento com TRMA, esta correlação evidenciada poderá significar simultaneamente que maior número de indivíduos com altos níveis de TFAE serão propostos para este tipo de tratamento. Para além disso, também os casos de infertilidade inexplicada constituem uma indicação clínica para realização de tratamento com TRMA, tendo-se igualmente demonstrado que uma percentagem importante destes doentes pode apresentar níveis significativamente elevados de TFAE.¹³

Embora seja notória a ausência de consensos na literatura, os resultados da presente revisão sugerem que altos níveis de TFAE podem influenciar negativamente os *outcomes* clínicos e sucesso do tratamento com TRMA. Como demonstrado por Bungum *et al.*,⁶³ para níveis mais elevados de TFAE as técnicas *in vitro* apresentaram maior sucesso comparativamente à utilização da IIU. Por sua vez, quando comparadas ambas as técnicas *in vitro*, foi possível constatar adicionalmente que a utilização da ICSI permitiu alcançar maiores taxas de sucesso do tratamento comparativamente à FIV, sobretudo quando os níveis de TFAE são superiores a 30%.⁶³ Para além disso, altos níveis de TFAE demonstraram ainda estar associados a diminuição da TF, TG e QE sobretudo nos casos de FIV, com menor impacto nos resultados quando utilizada a ICSI.

O maior sucesso das técnicas *in vitro* pode dever-se em parte ao facto de o tratamento *in vitro* facilitar o processo de fertilização, diminuindo o trajeto que o espermatozóide tem que percorrer até conseguir contactar e fecundar o ovócito, diminuindo o stress oxidativo a que este está sujeito durante esse mesmo trajeto, stress esse capaz de levar a um acréscimo da fragmentação do ADN já existente. Para além disso, pensa-se que este aumento da fragmentação do ADN espermático se deve sobretudo a aumento da fragmentação de cadeia dupla, incapaz de ser reparada pelo ovócito após a fecundação, e que consequentemente terá

maior impacto aquando dos processos reprodutivos.⁷⁴ Relativamente à diferença de resultados entre ambas as técnicas *in vitro*, diferentemente da FIV, o tratamento com ICSI, tal como o próprio nome indica, envolve a injeção *in vitro* de um espermatozóide diretamente no ovócito, contudo, previamente a este procedimento, é realizada uma seleção dos espermatozoides obtidos de forma a escolher os espermatozoides com maior motilidade e menor alteração morfológica para serem injetados. Tendo em conta a correlação observada entre alterações da motilidade e morfologia espermática e níveis mais elevados de TFAE, esta seleção irá consequentemente promover a seleção de espermatozoides com menor fragmentação da cromatina, o que poderá estar na origem dos melhores resultados apresentados por este tratamento.

A expectável presença de doentes com altos níveis de fragmentação da cromatina espermática para realização deste tipo de tratamento, bem como o impacto desta mesma no sucesso do tratamento e influência negativa sobre os diferentes *outcomes* clínicos, justificam a utilização da análise da TFAE na prática clínica, uma vez que esta permitirá auxiliar o clínico na tomada de decisões. Como tal, casais propostos para tratamento com TRMA serão uma possível indicação clínica importante para medição da TFAE, especialmente casais submetidos a ciclos prévios de tratamento sem sucesso, uma vez que a fragmentação da cromatina pode estar na origem da falha do tratamento. Baseado nos níveis de TFAE obtidos será então possível criar um algoritmo de abordagem ao doente, de forma a obter o maior sucesso do tratamento, com menor morbilidade para o casal e com diminuição dos custos associados à necessidade de realização de vários ciclos de tratamento. Casais propostos para tratamento com TRMA e evidência de níveis normais de TFAE, poderão ser aconselhados a realizar como tratamento de primeira linha a IIU, dado a sua maior simplicidade e menor custo comparativamente aos restantes. Em contraste, casais com evidência de altos níveis de TFAE poderão ser encaminhados diretamente para a realização de tratamento com técnicas *in vitro*, uma vez que a probabilidade de insucesso da IIU será elevada, sendo que na evidência de valores de TFAE superiores a 30%, o tratamento com ICSI deverá mesmo ser encarado como tratamento de primeira linha.

Quando optado pela realização de ICSI, foi possível ainda observar que a utilização de espermatozoides extraídos diretamente do testículo estava associada a taxas de sucesso mais elevadas do que quando utilizados espermatozoides ejaculados, levantando a hipótese de que parte da fragmentação do ADN poderá ser adquirida ao longo do trajeto do espermatozóide desde o testículo até à sua expulsão. Contudo, dado a obtenção de espermatozoides testiculares implicar um processo de extração invasivo, o seu uso deve ser limitado aos casos de níveis de TFAE muito elevados, uma vez ter sido demonstrado que quer a utilização de espermatozoides testiculares, quer de espermatozoides ejaculados, apresentava os mesmos resultados quando

na presença de valores baixos de TFAE.⁷¹ Para além disso, mesmo nos casos de níveis muito elevados de TFAE, poderá ainda ser considerado em primeiro lugar a realização de um tratamento médico (por exemplo com recurso a antioxidantes associados a modificações do estilo de vida) tendo em vista a diminuição desses mesmos níveis e apenas posteriormente, caso este falhe, prosseguir para a utilização de espermatozóides testiculares.

Um problema importante deve ainda ser tido em conta perante um doente proposto a tratamento com TRMA. Espermatozóides inaptos, com alterações significativas da sua morfologia e motilidade, e por isso provavelmente com altos níveis de TFAE, dificilmente serão capazes de atingir o ovócito e fecundá-lo. No entanto, a utilização deste tipo de tratamento, especialmente da ICSI, permite fazer um *bypass* dos processos reprodutivos normais, com fecundação do ovócito por espermatozóides que em outras condições não seriam capazes de o fazer. Esta reprodução através de espermatozóides com alterações significativas da cromatina aparenta estar associada a maior incidência de alterações na descendência.¹⁶ Como tal, a avaliação prévia dos níveis de TFAE será de grande importância, uma vez que vai permitir identificar doentes em risco que poderão beneficiar de um tratamento prévio dirigido a diminuir os níveis de TFAE e permitir não só aumentar o sucesso do tratamento, como também diminuir os riscos de alterações na descendência.

Esta revisão apresenta limitações importantes que deverão ser tidas em conta na interpretação dos resultados. Em primeiro lugar, é importante referir que tanto a seleção de artigos a serem incluídos, bem como a extração dos dados relevantes, foram apenas realizados por uma pessoa estando, portanto, a presente revisão suscetível a um possível viés de seleção. Em segundo lugar, outra limitação do presente estudo reside no facto de apenas ter sido utilizada uma base de dados para pesquisa de artigos relativamente ao tema, com a possível existência de um viés de publicação, dado que mais provavelmente estudos com associações significativas serão publicados comparativamente a estudos onde essas associações não se tenham verificado. Por fim, é ainda importante destacar a própria heterogeneidade dos estudos incluídos em termos de características das populações estudadas, tamanho da amostra e não garantia de controlo de possíveis confundidores em alguns dos estudos revistos (como influência do estilo de vida na TFAE ou ausência de dados sobre a fertilidade do elemento feminino), reforçando a importância da realização de estudos controlados e randomizados, com populações bem definidas, que permitam confirmar de forma robusta as associações observadas.

CONCLUSÃO

A integridade da cromatina espermática desempenha um papel importante aquando dos processos reprodutivos, podendo a sua fragmentação ser uma das principais causas responsáveis pela diminuição do potencial fértil, sobretudo em casos de infertilidade inexplicada. Embora atualmente seja notória a ausência de consensos relativamente ao benefício da utilização deste biomarcador na prática clínica, a presente revisão sugere que a análise da TFAE poderá ser um importante novo biomarcador auxiliar na avaliação de indivíduos inférteis, permitindo complementar o estudo realizado pela análise de sémen convencional, dado o seu maior poder diagnóstico e capacidade de prever o prognóstico e desfecho do tratamento. Desta forma, a sua utilização poderá permitir ao clínico não só afirmar com maior certeza o verdadeiro potencial fértil do indivíduo, como também poderá auxiliar na escolha de qual o melhor passo seguinte em termos de tratamento, nomeadamente quando considerado o tratamento com TRMA.

Atualmente, duas principais indicações clínicas para avaliação da TFAE deverão ser consideradas: 1- Estudo de casais com infertilidade inexplicada; 2- Aconselhamento e orientação de casais propostos para tratamento com TRMA, sobretudo quando realizados ciclos de tratamento prévios sem sucesso. No entanto, nenhuma conclusão quanto ao método ideal para avaliação da TFAE pode ser feita, apesar de *TUNEL assay* apresentar vantagens importantes relativamente aos restantes métodos.

Dada a heterogeneidade de estudos observados na literatura revista, investigações futuras deverão centrar-se na realização de estudos controlados e randomizados com populações bem definidas, que permitam confirmar de forma robusta as associações observadas e validar a utilização deste biomarcador na prática clínica. Contudo, o primeiro passo deverá passar pela determinação um método *gold standard* para avaliação da TFAE, com posterior criação de um protocolo estandardizado de forma a diminuir a variabilidade interlaboratorial de resultados e permitir a sua comparação de forma mais fidedigna.

APÊNDICE

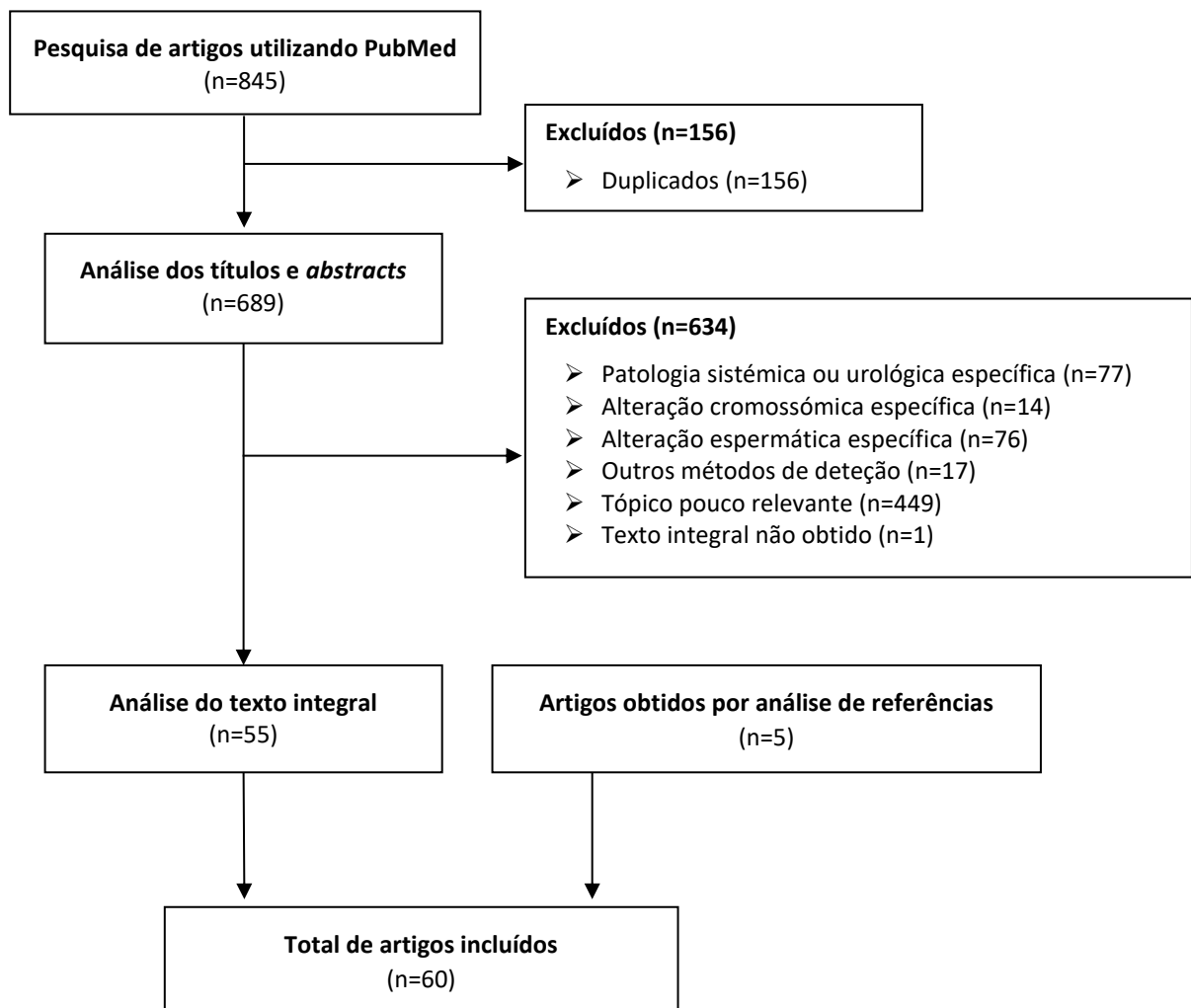


Figura 1 – Fluxograma de seleção de artigos

REFERÊNCIAS

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and sterility*. 2009;92(5):1520-1524.
2. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, et al. Best practice policies for male infertility. *Fertility and sterility*. 2002;77(5):873-882.
3. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988–1989)*. *Human Reproduction*. 1991;6(6):811-816.
4. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010.
5. van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJ, et al. Role of semen analysis in subfertile couples. *Fertility and sterility*. 2011;95(3):1013-1019.
6. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, et al. Sperm Morphology, Motility, and Concentration in Fertile and Infertile Men. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(19):1388-1393.
7. Baskaran S, Finelli R, Agarwal A, Henkel R. Diagnostic value of routine semen analysis in clinical andrology. *Andrologia*. 2020:e13614.
8. Santi D, Spaggiari G, Simoni M. Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management – meta-analyses. *Reproductive biomedicine online*. 2018;37(3):315-326.
9. Björndahl L. What is normal semen quality? On the use and abuse of reference limits for the interpretation of semen analysis results. *Human fertility (Cambridge, England)*. 2011;14(3):179-186.
10. Lavranos G, Manolakou P, Katsiki E, Angelopoulou R. Assessment of sperm nucleus integrity in infertile men: a novel research field for anthropology in the molecular era. *Collegium antropologicum*. 2013;37(4):1369-1372.
11. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Baldi E. Sperm DNA Fragmentation: Mechanisms of Origin. *Advances in experimental medicine and biology*. 2019;1166:75-85.
12. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Human Reproduction*. 2006;21(11):2876-2881.
13. Oleszczuk K, Augustinsson L, Bayat N, Giwercman A, Bungum M. Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples. *Andrology*. 2013;1(3):357-360.
14. Centers for Disease Control and Prevention. 2017 Assisted Reproductive Technology Fertility Clinic Success Rates Report. Atlanta (GA): US Dept of Health and Human Services; 2019. October 2019.
15. ESHRE Special Interest Group of Embryology, Alpha Scientists in Reproductive Medicine. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of art laboratory performance indicators. *Human Reproduction Open*. 2017;2017(2).
16. Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. 2009;32(1):46-56.
17. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*. 2013;1(5):715-722.

18. Venkatesh S, Singh A, Shamsi MB, et al. Clinical significance of sperm DNA damage threshold value in the assessment of male infertility. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*. 2011;18(10):1005-1013.
19. Hassanen E, Elqusi K, Zaki H, Henkel R, Agarwal A. TUNEL assay: Establishing a sperm DNA fragmentation cut-off value for Egyptian infertile men. *Andrologia*. 2019;51(10):e13375.
20. Malić Vončina S, Golob B, Ihan A, Kopitar AN, Kolbezen M, Zorn B. Sperm DNA fragmentation and mitochondrial membrane potential combined are better for predicting natural conception than standard sperm parameters. *Fertility and sterility*. 2016;105(3):637-644.e631.
21. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, et al. DNA fragmentation in brighter sperm predicts male fertility independently from age and semen parameters. *Fertility and sterility*. 2015;104(3):582-590.e584.
22. Punjabi U, Van Mulders H, Goovaerts I, Peeters K, Roelant E, De Neubourg D. DNA fragmentation in concert with the simultaneous assessment of cell viability in a subfertile population: establishing thresholds of normality both before and after density gradient centrifugation. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2019;36(7):1413-1421.
23. Gill K, Rosiak-Gill A, Jakubik J, Patorski L, Lukaszuk M, Piasecka M. The higher risk for sperm DNA damage in infertile men. *Ginekologia polska*. 2019;90(12):684-691.
24. Wiweko B, Utami P. Predictive value of sperm deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation index in male infertility. *Basic and clinical andrology*. 2017;27:1.
25. Durmaz A, Dikmen N, Gündüz C, Göker EN, Tavmergen E. Fluctuation of "sperm DNA integrity" in accordance with semen parameters, and it's relationship with infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2014;31(12):1665-1671.
26. Simon L, Lutton D, McManus J, Lewis SE. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertility and sterility*. 2011;95(2):652-657.
27. Liffner S, Pehrson I, García-Calvo L, et al. Diagnostics of DNA fragmentation in human spermatozoa: Are sperm chromatin structure analysis and sperm chromatin dispersion tests (SCD-HaloSpermG2[®]) comparable? *Andrologia*. 2019;51(8):e13316.
28. Zandieh Z, Vatannejad A, Doosti M, et al. Comparing reactive oxygen species and DNA fragmentation in semen samples of unexplained infertile and healthy fertile men. *Irish journal of medical science*. 2018;187(3):657-662.
29. Ramzan MH, Ramzan M, Khan MM, et al. Human semen quality and sperm DNA damage assessed by comet assay in clinical groups. *Turkish journal of medical sciences*. 2015;45(3):729-737.
30. Dorostghoal M, Kazeminejad SR, Shahbazian N, Pourmehdi M, Jabbari A. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Andrologia*. 2017;49(10).
31. Vinnakota C, Cree L, Peek J, Morbeck DE. Incidence of high sperm DNA fragmentation in a targeted population of subfertile men. *Systems biology in reproductive medicine*. 2019;65(6):451-457.
32. Manochantr S, Chiamchanya C, Sobhon P. Relationship between chromatin condensation, DNA integrity and quality of ejaculated spermatozoa from infertile men. *Andrologia*. 2012;44(3):187-199.
33. Evgeni E, Lymberopoulos G, Touloupidis S, Asimakopoulos B. Sperm nuclear DNA fragmentation and its association with semen quality in Greek men. *Andrologia*. 2015;47(10):1166-1174.
34. Evgeni E, Lymberopoulos G, Gazouli M, Asimakopoulos B. Conventional semen parameters and DNA fragmentation in relation to fertility status in a Greek population. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2015;188:17-23.

35. Alkhayal A, San Gabriel M, Zeidan K, et al. Sperm DNA and chromatin integrity in semen samples used for intrauterine insemination. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2013;30(11):1519-1524.
36. Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, Dalleac A, Amar E, Zini A. Sperm deoxyribonucleic acid damage in normozoospermic men is related to age and sperm progressive motility. *Fertility and sterility*. 2014;101(6):1588-1593.
37. Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, et al. Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2014;31(5):527-532.
38. Malm G, Rylander L, Giwercman A, Haugen TB. Association between semen parameters and chance of fatherhood - a long-term follow-up study. *Andrology*. 2019;7(1):76-81.
39. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *International journal of andrology*. 2010;33(1):e221-227.
40. Oleszczuk K, Giwercman A, Bungum M. Intra-individual variation of the sperm chromatin structure assay DNA fragmentation index in men from infertile couples. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2011;26(12):3244-3248.
41. Kennedy C, Ahlering P, Rodriguez H, Levy S, Sutovsky P. Sperm chromatin structure correlates with spontaneous abortion and multiple pregnancy rates in assisted reproduction. *Reproductive biomedicine online*. 2011;22(3):272-276.
42. Comhaire F, Messiaen A, Decler W. A mathematical model predicting the individual outcome of IVF through sperm-analysis: The role of the HaloSpermG2® DNA fragmentation test. *Medical hypotheses*. 2018;117:50-53.
43. Simon L, Proutski I, Stevenson M, et al. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reproductive biomedicine online*. 2013;26(1):68-78.
44. Tandara M, Bajić A, Tandara L, et al. Sperm DNA integrity testing: big halo is a good predictor of embryo quality and pregnancy after conventional IVF. *Andrology*. 2014;2(5):678-686.
45. Zheng WW, Song G, Wang QL, et al. Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following in vitro fertilization. *Asian journal of andrology*. 2018;20(1):75-79.
46. Kim SM, Kim SK, Jee BC, Kim SH. Effect of Sperm DNA Fragmentation on Embryo Quality in Normal Responder Women in In Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection. *Yonsei medical journal*. 2019;60(5):461-466.
47. Anifandis G, Bounartzi T, Messini CI, et al. Sperm DNA fragmentation measured by Halosperm does not impact on embryo quality and ongoing pregnancy rates in IVF/ICSI treatments. *Andrologia*. 2015;47(3):295-302.
48. Bounartzi T, Dafopoulos K, Anifandis G, et al. Pregnancy prediction by free sperm DNA and sperm DNA fragmentation in semen specimens of IVF/ICSI-ET patients. *Human fertility (Cambridge, England)*. 2016;19(1):56-62.
49. López G, Lafuente R, Checa MA, Carreras R, Brassesco M. Diagnostic value of sperm DNA fragmentation and sperm high-magnification for predicting outcome of assisted reproduction treatment. *Asian journal of andrology*. 2013;15(6):790-794.
50. Sun TC, Zhang Y, Li HT, et al. Sperm DNA fragmentation index, as measured by sperm chromatin dispersion, might not predict assisted reproductive outcome. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*. 2018;57(4):493-498.
51. Xue LT, Wang RX, He B, et al. Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcomes for Chinese couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *The Journal of international medical research*. 2016;44(6):1283-1291.
52. Oleszczuk K, Giwercman A, Bungum M. Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome. *Andrology*. 2016;4(2):290-296.

53. Zhang Z, Zhu LL, Jiang HS, Chen H, Chen Y, Dai YT. Predictors of pregnancy outcome for infertile couples attending IVF and ICSI programmes. *Andrologia*. 2016;48(9):874-881.
54. O'Neill CL, Parrella A, Keating D, Cheung S, Rosenwaks Z, Palermo GD. A treatment algorithm for couples with unexplained infertility based on sperm chromatin assessment. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2018;35(10):1911-1917.
55. Esbert M, Pacheco A, Vidal F, et al. Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reproductive biomedicine online*. 2011;23(6):704-710.
56. Simon L, Lewis SE. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro? *Systems biology in reproductive medicine*. 2011;57(3):133-138.
57. Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SE. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reproductive biomedicine online*. 2011;23(6):724-734.
58. Pregl Breznik B, Kovačič B, Vlaisavljević V. Are sperm DNA fragmentation, hyperactivation, and hyaluronan-binding ability predictive for fertilization and embryo development in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection? *Fertility and sterility*. 2013;99(5):1233-1241.
59. Nuñez-Calonge R, Caballero P, López-Fernández C, et al. An improved experimental model for understanding the impact of sperm DNA fragmentation on human pregnancy following ICSI. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*. 2012;19(11):1163-1168.
60. Wdowiak A, Bakalczuk S, Bakalczuk G. The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmic sperm injection. *Reproductive biology*. 2015;15(2):94-100.
61. Thomson LK, Zieschang JA, Clark AM. Oxidative deoxyribonucleic acid damage in sperm has a negative impact on clinical pregnancy rate in intrauterine insemination but not intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and sterility*. 2011;96(4):843-847.
62. Garolla A, Cosci I, Bertoldo A, Sartini B, Boudjema E, Foresta C. DNA double strand breaks in human spermatozoa can be predictive for assisted reproductive outcome. *Reproductive biomedicine online*. 2015;31(1):100-107.
63. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Human Reproduction*. 2007;22(1):174-179.
64. Antonouli S, Papatheodorou A, Panagiotidis Y, et al. The impact of sperm DNA fragmentation on ICSI outcome in cases of donated oocytes. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2019;300(1):207-215.
65. Al Omrani B, Al Eisa N, Javed M, Al Ghedan M, Al Matrafi H, Al Sufyan H. Associations of sperm DNA fragmentation with lifestyle factors and semen parameters of Saudi men and its impact on ICSI outcome. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2018;16(1):49.
66. Sharbatoghli M, Valojerdi MR, Amanlou M, Khosravi F, Jafar-abadi MA. Relationship of sperm DNA fragmentation, apoptosis and dysfunction of mitochondrial membrane potential with semen parameters and ART outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2012;286(5):1315-1322.
67. 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. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2020;37(1):71-76.
68. Zhang J, Xue H, Qiu F, Zhong J, Su J. Testicular spermatozoon is superior to ejaculated spermatozoon for intracytoplasmic sperm injection to achieve pregnancy in infertile males with high sperm DNA damage. *Andrologia*. 2019;51(2):e13175.

69. Pabuccu EG, Caglar GS, Tangal S, Haliloglu AH, Pabuccu R. Testicular versus ejaculated spermatozoa in ICSI cycles of normozoospermic men with high sperm DNA fragmentation and previous ART failures. *Andrologia*. 2017;49(2).
70. Arafa M, AlMalki A, AlBadr M, et al. ICSI outcome in patients with high DNA fragmentation: Testicular versus ejaculated spermatozoa. *Andrologia*. 2018;50(1).
71. Herrero MB, Lusignan MF, Son WY, Sabbah M, Buckett W, Chan P. ICSI outcomes using testicular spermatozoa in non-azoospermic couples with recurrent ICSI failure and no previous live births. *Andrology*. 2019;7(3):281-287.
72. Dutta S, Henkel R, Agarwal A. Comparative analysis of tests used to assess sperm chromatin integrity and DNA fragmentation. *Andrologia*. 2021;53(2):e13718.
73. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing. *Fertility and sterility*. 2008;90(5, Supplement):S178-S180.
74. Christensen P, Birck A. Comparison of Methods for Assessment of Sperm DNA Damage (Fragmentation) and Implications for the Assisted Reproductive Technologies. In: Sills ES, ed. *Screening the Single Euploid Embryo: Molecular Genetics in Reproductive Medicine*. Cham: Springer International Publishing; 2015:53-71.