

ISSN: 2319-0124

SELEÇÃO AVANÇADA DE ESPERMATOZOIDES PARA UTILIZAÇÃO NA FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

Daiane M. SILVA¹; Miriam STIAVNICKA²; Kelsi GALATTI³; Kaitlyn WELDON⁴; Sean FAIR⁵

RESUMO

Milhões de casais são afetados por baixa fertilidade e necessitam recorrer às tecnologias de reprodução assistida (TRA) a fim de aumentar a taxa de concepção. Para a produção *in vitro* de embriões, uma das técnicas utilizadas em clínicas de fertilidade atualmente é a injeção intracitoplasmática de espermatozoide. Para tanto, é preciso selecionar no laboratório, espermatozoides de melhor qualidade, pois no trato reprodutivo feminino, os espermatozoides precisam transpor diversas barreiras físicas e químicas, sendo naturalmente selecionados. O objetivo dessa pesquisa foi comparar diferentes métodos de seleção de espermatozoides através da avaliação da qualidade espermática. O experimento foi conduzido na *University of Limerick* (Irlanda). Sêmen congelado de 20 doadores foram utilizados em três diferentes métodos: controle (C), densidade de gradiente (DG) e sistema microfluídico (nMx). Concluiu-se que a utilização de nMx é eficiente para selecionar espermatozoides com maior motilidade progressiva.

Palavras-chave: Biotecnologia; Embriões; Reotaxia; Reprodução assistida; Sêmen.

1. INTRODUÇÃO

Considerando que 48,5 milhões de casais são afetados por infertilidade, as TRA são altamente demandadas (AGARWAL et al., 2015). Aproximadamente 50% da infertilidade é responsabilidade do homem, sendo assim, a seleção de espermatozoides viáveis é essencial para garantir satisfatória taxa de concepção (KATZ et al., 2017). Atualmente, em laboratórios de clínicas de fertilidade, os métodos de seleção de células espermáticas para posteriormente serem utilizadas na injeção intracitoplasmática de espermatozoides nos óvulos são o GD e o *swim up*. Ambas as técnicas utilizam a centrifugação do sêmen entre as etapas do processo, o que pode acarretar em estresse nos espermatozoides e liberação de radicais livres com consequente oxidação, diminuindo assim, a integridade das células selecionadas. Segundo Varisli et al. (2009), a motilidade, o acrossoma e as membranas espermáticas podem ser danificados devido ao estresse oxidativo. Além disso, a centrifugação pode fragmentar o DNA (OSEGUERA-LOPEZ et al., 2019), aumentando desta maneira, o percentual de crianças com deficiência quando comparado ao método natural de concepção.

Em contraste à centrifugação, a reotaxia é uma ocorrência natural no trato reprodutivo feminino e refere-se à navegação dos espermatozoides contra o sentido dos fluidos uterinos (KANTSLEER et al., 2014). A reotaxia é um fator essencial para guiar os espermatozoides por longas

¹Professora de Zootecnia, IFSULDEMINAS – Campus Machado. E-mail: daiane.moreira@ifsuldeminas.edu.br.

²Pesquisadora do Departamento de Ciências da Vida, *University of Limerick* – Irlanda. E-mail: miriam.stiavnicka@ul.ie.

³Estudante de Ciências Biológicas, *University of Limerick* – Irlanda. E-mail: 19008767@studentmail.ul.ie.

⁴Estudante de Doutorado, *University of Limerick* – Irlanda. E-mail: kaitlyn.weldon@ul.ie.

⁵Professor e Pesquisador do Departamento de Ciências da Vida, *University of Limerick* – Irlanda. E-mail: sean.fair@ul.ie.

distâncias (MIKI e CLAPHAN, 2013) e tecnologias microfluídicas estão sendo investigadas na tentativa de replicar o fluxo de fluido encontrado no trato reprodutivo feminino. Descobrir um método microfluídico eficaz para selecionar espermatozoides não apenas concentrará o número de espermatozoides saudáveis com fertilização aprimorada para casais, mas também reduzirá o tempo e a dificuldade que os embriologistas experimentam com os métodos tradicionais de seleção de espermatozoides (ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA et al., 2021). Portanto, o objetivo desta pesquisa foi comparar a qualidade dos espermatozoides após o uso de diferentes métodos de seleção espermática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da *University of Limerick* (Irlanda) sob o protocolo número 2022_03_03_S&E e conduzido no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Ciências da Vida da *University of Limerick* entre maio e julho de 2021.

Sêmen congelado a 196°C de 20 doadores foi utilizado no experimento. Três palhetas de cada doador foram descongeladas em temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos. O sêmen foi diluído 1:1 com *PureSperm Wash* (Nidacon) a 37°C totalizando 3 mL de amostra, então a amostra foi dividida em três tratamentos, ou seja, três diferentes métodos de seleção de espermatozoides: controle (C - sem método de seleção), GD e sistema microfluídico (nMx).

Para GD, *PureSperm 80* (Nidacon, 1,5 mL) foi colocado em um tubo Falcon, então 1,5 mL de *PureSperm 40* (Nidacon) foi adicionado suavemente através da parede do tubo para evitar mistura e finalmente 0,5 mL da amostra de sêmen também foi adicionado através da parede do tubo. O tubo foi centrifugado por 20 minutos a 20°C e 300 x g. Após isso, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi dissolvido em 2 mL de *PureSperm Wash* e posteriormente centrifugado por 10 minutos a 20°C e 500 x g. O precipitado final foi ressuspensão em 200 µL de *PureSperm Wash*.

Para nMx, um microchip (NeoMix) com 100 microcanais foi selado com papel PCR (Thermo Fisher Scientific), colocado em microscópio óptico invertido e acoplado a uma Bomba de Seringa PHD Ultra CP (Harvard Apparatus) através de uma seringa de 10 mL, um conector de torneira, dois tubos de silicone e dois conectores específicos para o microchip. O poço coletor do microchip foi bloqueado com um pedaço de fita adesiva. A seringa de 10 mL foi preenchida com *PureSperm Wash* à temperatura ambiente e colocada na bomba. Através do conector da torneira, era possível escolher entre o preenchimento do microchip com *PureSperm Wash* ou ar, dependendo da etapa durante o processo de seleção. Um protocolo de seis etapas foi estabelecido na bomba: 1) 2.000 µL de *PureSperm Wash*/min durante 6 segundos para encher o microchip do centro para fora; 2) 250 µL/min durante 30 segundos e ao mesmo tempo, injetou-se manualmente e suavemente 0,8 mL da amostra de sêmen através de seringa de 1 mL nos poços dispostos na borda do microchip; 3) 250 µL/min a 10

$\mu\text{L}/\text{min}$ durante 30 segundos para estabilizar um fluxo apropriado para os espermatozoides; 4) 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 30 minutos para selecionar os espermatozoides por meio da reotaxia; 5) 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 60 segundos para desbloquear o poço coletor, trocar o conector da torneira para a opção “ar” e preencher os poços dispostos na borda do microchip com metilcelulose a 0,25%; 6) 2.000 μL de ar/min durante 4 segundos para empurrar a amostra de espermatozoides selecionados para o poço coletor.

Durante as etapas 3 e 4, os espermatozoides foram observados em aumento de 20X no microscópio. Após a etapa 6, o volume dentro do poço foi coletado (100 μL no máximo) usando uma micropipeta automática e transferido para um tubo de Eppendorf.

Para todos os tratamentos, motilidade, morfologia e fragmentação do DNA foram avaliados. A motilidade espermática foi avaliada subjetivamente na câmara de Makler, sendo que 100 células foram contadas e classificadas de acordo com o movimento: imóvel, móvel não progressivo e progressivamente móvel. O resultado foi expresso em porcentagem. A morfologia espermática foi realizada utilizando-se o kit de soluções RAL Diff-Quik™ (RAL Diagnostics) de acordo com as diretrizes da OMS (2021). O resultado foi expresso em porcentagem de espermatozoides normais e anormais (cabeça/acrossoma, peça intermediária e cauda). A fragmentação do DNA foi analisada através de citometria de fluxo (CytoFlex, Beckman Coulter) de acordo com Even e Jost (2000).

A análise de variância foi realizada através do *Statistical Package for the Social Science* (SPSS, versão 27.0, IBM). O teste de Bonferroni foi aplicado para averiguar se havia diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos para cada variável analisada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O tratamento nMx apresentou maior motilidade progressiva do que GD e C. Consequentemente, nMx apresentou menor porcentagem de imotilidade do que GD e C. Motilidade progressiva e imotilidade para nMx foram $78 \pm 4\%$ e $12 \pm 3\%$ respectivamente, enquanto que para DG foram $39 \pm 5\%$, $54 \pm 5\%$ e para C foram $48 \pm 4\%$, $45 \pm 4\%$, respectivamente. Não houve efeito do tratamento na motilidade não progressiva ($P > 0,05$) com valor médio de $9 \pm 1\%$. Tão importante quanto a motilidade dos espermatozoides na avaliação da viabilidade seminal, é a qualidade de tal movimento, o qual deve ser vigoroso, rápido e em linha reta, objetivando transpor as barreiras físicas e químicas do trato genital feminino com o objetivo de encontrar e fertilizar o óvulo.

Não houve efeito do tratamento na morfologia espermática ($P > 0,05$) com valores médios de $11 \pm 1\%$ para espermatozoides normais, $76 \pm 3\%$ para anormalidades de cabeça/acrossoma, $5 \pm 1\%$ para anormalidades de peça intermediária e $6 \pm 1\%$ para anormalidades da cauda. Também não houve efeito do tratamento na fragmentação do DNA ($P > 0,05$) com um índice geral de $5,4 \pm 1,0\%$. Por outro lado, de Martin et al. (2017) usaram reotaxia para seleção de espermatozoides em sistema de

monocanal e encontraram melhor morfologia espermática e integridade da cromatina. Desta forma, mais estudos são necessários com a finalidade de melhor ajustar as taxas de fluxo utilizadas no nMx, pois a alta taxa pode estar provocando anormalidades na cabeça/cromossoma e danificando a estrutura do DNA dos espermatozoides devido a choque mecânico durante o processo de seleção.

4. CONCLUSÕES

A utilização de sistema microfluídico que mimetiza a reotaxia no interior de microcanais é eficiente para selecionar espermatozoides com maior porcentual de motilidade progressiva.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; MULGUND, A.; HAMADA, A.; CHYATTE, M. R. A unique view on male infertility around the globe. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 13, p. 37, 2015.
- DE MARTIN, H.; COCUZZA, M. S.; TISEO, B. C.; WOOD, G. J. A.; MIRANDA, E. P.; MONTELEONE, P. A. A.; SOARES JR., J. M.; SERAFINI, P. C.; SROUGI, M.; BARACAT, E. C. Positive rheotaxis extended drop: a one-step procedure to select and recover sperm with mature chromatin for intracytoplasmic sperm injection. **J Assist Reprod Genet**, v. 34, n. 12, p. 1699-1708, 2017.
- EVENSON, D.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods Cell Science**, v. 22, n. 2-3, p. 169-189, 2000.
- KANTSLER, V.; DUNKEL, J.; BLAYNEY, M.; GOLDSTEIN, R. E. Rheotaxis facilitates upstream navigation of mammalian sperm cells. **Elife**, p. 3, 2014.
- KATZ, D. J.; TELOKEN, P.; SHOSHANY, O. Male infertility - The other side of the equation. **Aust Fam Physician**, v. 46, p. 641-646, 2017.
- MIKI, K.; CLAPHAM, D. E. Rheotaxis guides mammalian sperm. **Curr Biol**, v. 23, p. 443-52, 2013.
- OSEGUERA-LÓPEZ, I. R.-D. S.; RAMOS-IBEAS, P.; PÉREZ-CEREZALES, S. Novel Techniques of Sperm Selection for Improving IVF and ICSI Outcomes. **Cell Dev. Biol**, v. 7, n. 298, 2019.
- ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, J.; LAGUNA-BARRAZA, R.; FERNANDEZ-GONZALEZ, R.; STIAVNICKA, M.; WARD, F.; CLOHERTY, J.; MCAULIFFE, D.; LARSEN, P. B.; GRABRUCKER, A. M.; GUTIERREZ-ADAN, A.; NEWPORT, D.; FAIR, S. Sperm selection by rheotaxis improves sperm quality and early embryo development. *Reproduction*, v. 161, p. 343-352, 2021.
- VARISLI, O.; UGUZ, C.; AGCA, C.; AGCA, Y. Various physical stress factors on rat sperm motility, integrity of acrosome, and plasma membrane. **J Androl**, v. 30, p. 75-86, 2009.
- WORLD HUMAN ORGANIZATION. **Laboratory manual for the examination and processing of human semen**, 6th edition, 303 p., 2021.