



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**JOÃO ROBERTO PALADINO JUNIOR**

**USO DE ESPERMATOZOIDE DO EJACULADO *VERSUS* TESTICULAR  
PARA COMPARAÇÃO DE TAXA DE NASCIDOS VIVOS DE  
REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM PACIENTES COM  
OLIGOZOOSPERMIA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Hamilto Akihissa Yamamoto.

Botucatu  
2026

**JOÃO ROBERTO PALADINO JUNIOR**

**USO DE ESPERMATOZOIDE DO EJACULADO *VERSUS* TESTICULAR  
PARA COMPARAÇÃO DE TAXA DE NASCIDOS VIVOS DE  
REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM PACIENTES COM  
OLIGOZOOSPERMIA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Hamilto Akihissa Yamamoto.

Botucatu

2026

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| P153u | <p>Paladino Junior, João Roberto</p> <p>USO DE ESPERMATOZOIDE DO EJACULADO VERSUS TESTICULAR PARA COMPARAÇÃO DE TAXA DE NASCIDOS VIVOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM PACIENTES COM OLIGOZOOSPERMIA / João Roberto Paladino Junior. -- Botucatu, 2026</p> <p>55 p. : il., tabs.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu</p> <p>Orientadora: Hamilto Akihissa Yamamoto</p> <p>1. Infecundidade masculina. 2. Espermatozoides. 3. Testículos Cirurgia. 4. Tecnologia da reprodução humana. 5. Infecundidade. I. Título.</p> |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## **IMPACTO ESPERADO**

Esta pesquisa contribui para ampliar o acesso aos tratamentos de reprodução assistida no Sistema Único de Saúde, identificando abordagens mais eficazes e custo-efetivas para homens com oligozoospermia. A comparação entre espermatozoides de origem testicular e de ejaculação permite orientar decisões clínicas, visando maximizar taxas de nascidos vivos e alcançar um número maior de casais beneficiados.

## **EXPECTED IMPACT**

This research enhances access to assisted reproductive technologies within Brazil's public health system by identifying more effective and cost-efficient approaches for men with oligozoospermia. Comparing testicular and ejaculated sperm supports clinical decision making aimed at maximizing live birth rates and expanding treatment opportunities for couples.

**JOÃO ROBERTO PALADINO JUNIOR**

**USO DE ESPERMATOZOIDE DO EJACULADO *VERSUS* TESTICULAR  
PARA COMPARAÇÃO DE TAXA DE NASCIDOS VIVOS DE  
REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM PACIENTES COM  
OLIGOZOOSPERMIA**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Cirurgia e Medicina Translacional.

Data da defesa: 15/05/2026

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Prof. Dr. Hamilto Akihissa Yamamoto  
UNESP – Faculdade de Medicina – Câmpus de Botucatu

---

Prof. Dr. Celso Gromatzky  
Centro Universitário do ABC - FMABC

---

Prof. Dr. Felipe Fakhouri  
Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Kawano  
UNESP – Faculdade de Medicina – Câmpus de Botucatu

---

Prof. Dr. Rafael Tourinho Barbosa  
Centro Universitário do ABC - FMAB

---

Prof. Dra. Maite del Collado  
Science For Everymind

Ao Dr. Mario Cavagna, amigo e incentivador deste projeto, excelente especialista em Reprodução Humana, e grande médico de pessoas e almas. Saudade do amigo, que foi retirado do convívio terreno pela covid-19. Lastimo não o ter presencialmente neste momento. Era um entusiasta dos estudos em infertilidade masculina.

Aos participantes da pesquisa, que confiaram no objetivo de melhorar e ampliar o acesso da Reprodução Humana no serviço público brasileiro.

Em especial, ao meu filho, João Pedro, pelo qual mantive a ambição de concluir este projeto com a intenção de ser um exemplo de trabalho, estudo e caráter. Almejo entregar um grande homem para a sociedade.

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço aos casais que buscaram tratamento para infertilidade e tiveram o altruísmo de participar desta pesquisa, com a intenção de possibilitar melhores resultados aos futuros usuários do Sistema Único de Saúde do Brasil.

Aos professores do Curso de Pós-graduação em Cirurgia e Medicina Translacional, pelo empenho acadêmico, pela paixão do ensino e pela dedicação à “Gloriosa” – FMB.

À sra. Marcia Cruz, secretária da Pós-graduação em Cirurgia e Medicina Translacional, pela habitual prontidão e extrema cortesia, sempre disposta a ajudar na travessia documental e laboral do *stricto sensu*.

Aos doutores Paulo Roberto Kawano e Gisela Alessandra Daroz, pela paciência e pelos prestimosos comentários durante as bancas anuais de acompanhamento.

Ao Professor Dr. Hamilto Yamamoto. Durante minha graduação tive o prazer de conhecê-lo por meio do meu amigo de turma, Fábio Yamamoto, e, anos depois, na condição de orientador. Desde a minha graduação, já era uma profissional que tinha meu total respeito e admiração. Naquela época, o senhor havia acabado de defender sua tese. Não imaginava que os nossos caminhos se reencontrariam durante o meu doutorado. Agradeço a orientação durante esta jornada e por possibilitar o meu retorno à FMB.

## RESUMO

**Introdução:** Dados da literatura médica comprovam que os resultados das técnicas de reprodução humana assistida (RHA) são piores em pacientes que possuem alto índice de fragmentação de DNA espermático (FDNA), condição mais frequente em pacientes oligozoospermicos. Uma das possibilidades terapêuticas para reduzir a FDNA é a utilização de espermatozoide testicular (TESE) para a injeção intracitoplasmática (ICSI). Tal modalidade de tratamento aumenta a taxa de nascidos vivos quando comparada à ICSI realizada utilizando espermatozoide ejaculado com alto índice de FDNA. **Objetivo:** Definir qual a melhor primeira opção de tratamento relacionado ao fator masculino, a fim de gerar a maior taxa de nascidos vivos no primeiro ciclo de tratamento, visto que, no Centro de Referência de Saúde da Mulher Hospital Pérola Byington (São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil), os casais têm apenas duas tentativas de ICSI oferecidas pela rede pública, o orçamento anual é fixo e a pesquisa de fragmentação de DNA de espermatozoides não é custeada pelo serviço público. **Métodos:** Trata-se de um estudo piloto, prospectivo, de fase II, em homens maiores de 18 anos, com oligozoospermia e infertilidade clínica, com indicação de RHA, sem testes para pesquisa de FDNA, randomizados para uso de espermatozoide ejaculado *versus* uso de espermatozoide testicular, perfazendo um total de 44 participantes. **Resultado:** A média das idades foi de 37,9 anos para os homens e de 37 anos para as mulheres. A etiologia da infertilidade constituiu a causa primária em 84,1% dos casos, e a duração mediana de infertilidade foi de 70 meses. Apesar de não haver diferença estatística para nascidos vivos entre os grupos, o grupo TESE obteve 8 nascidos em 22 tratamentos (36,36%), em comparação a 5 nascidos vivos no grupo Ejaculado em 22 tratamentos (22,72%). **Conclusão:** Em homens oligozoospermicos com fragmentação de DNA espermático não testada, o uso de espermatozoide testicular *versus* o uso de ejaculado como primeira opção de tratamento em RHA resultou em uma tendência de aumento da taxa de nascidos vivos. Logo, abre-se um cenário de possível emprego na prática clínica, o que possibilita a solicitação de análise para habilitação de ensaio clínico de fase III.

**Palavras-chave:** infertilidade; espermatozoides; fragmentação do DNA.



## **ABSTRACT**

**Introduction:** Data from medical literature have shown that assisted reproductive technology results are worse in patients with a high sperm DNA fragmentation index (SDNA fragmentation), and that this DNA fragmentation is more frequent in oligospermic patients. One of the therapeutic possibilities to reduce SDNA fragmentation is the use of testicular sperm (TESE) for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). This treatment modality increases the live birth rate when compared to ICSI with ejaculate sperm with a high SDNA fragmentation index. **Objective:** To define the best first treatment option related to the male factor, with the intention of generating the highest live birth rate in the first treatment cycle, considering that at the Women's Health Reference Center, Pérola Byington Hospital, São Paulo, State of São Paulo, Brazil, couples have only two ICSI attempts in the public service, with a fixed annual budget, and sperm DNA fragmentation testing is not covered by the public service. **Methods:** A prospective, phase II pilot study in men over 18 years of age with oligozoospermia and clinical infertility, indicated for assisted reproductive technology (ART), without DNA testing, randomized to use of ejaculated sperm versus testicular sperm, with a total of 44 participants. **Result:** The mean age was 37.9 years for men and the median age was 37 years for women, the etiology of infertility as the primary cause in 84.1% of cases, with a median duration of infertility of 70 months. There was no statistical difference in live births between the groups, however the TESE group had 8 live births in 22 treatments (36.36%), compared to 5 live births in the ejaculated sperm group in 22 treatments (22.72%). **Conclusion:** In oligozoospermic men with untested sperm DNA fragmentation, the use of testicular sperm versus ejaculate as a first-line treatment option in assisted reproductive technology (ART) resulted in a trend toward increased live birth rates, thus opening up a scenario for potential application in clinical practice. This allows for the request for analysis to enable a phase III clinical trial.

**Keywords:** infertility; sperm; DNA fragmentation.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Diagrama da divisão testicular durante a TESE

28

## LISTA DE QUADROS

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1 – Características dos estudos incluídos na metanálise<br>(adaptado) | 41 |
|------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE TABELAS

|            |                                                                               |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – | Caracterização da amostra estudada                                            | 33 |
| Tabela 2 – | Descrição dos desfechos reprodutivos na população estudada                    | 34 |
| Tabela 3 – | Comparação das características clínicas entre os grupos Ejaculado e TESE      | 34 |
| Tabela 4 – | Comparação dos parâmetros do espermograma entre os grupos Ejaculado e TESE    | 36 |
| Tabela 5 – | Comparação dos parâmetros bioquímicos entre os grupos Ejaculado e TESE        | 36 |
| Tabela 6 – | Comparação dos parâmetros reprodutivos entre os grupos Ejaculado e TESE       | 37 |
| Tabela 7 – | Modelos preditivos da taxa de nascidos vivos entre os grupos Ejaculado e TESE | 37 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|             |                                                                    |
|-------------|--------------------------------------------------------------------|
| CEP         | Comitê de Ética em Pesquisa de seres humanos                       |
| CRSM        | Centro de Referência da Saúde da Mulher                            |
| DNA         | Ácido desoxirribonucleico                                          |
| DP          | Desvio-padrão                                                      |
| EOC         | Estímulo Ovariano Controlado                                       |
| ERO         | Espécies reativas de oxigênio                                      |
| FDNA        | Fragmentação de DNA do espermatozoide                              |
| FIV         | Fertilização in vitro                                              |
| FSH         | Hormônio folículo estimulante                                      |
| GnRH        | Hormônio liberador de gonadotrofinas                               |
| ICSI        | Injeção intracitoplasmática                                        |
| IQR         | Intervalo interquartil                                             |
| LH          | Hormônio Luteinizante                                              |
| Micro-TESE  | Extração de espermatozoides testiculares por microdissecção        |
| OMS         | Organização Mundial da Saúde                                       |
| REBEC       | Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos                            |
| RHA         | Reprodução humana assistida                                        |
| SCD         | Sperm Chromatin Dispersion Test                                    |
| SCSA        | Sperm Chromatin Structure Assay                                    |
| SUS         | Sistema Único de Saúde                                             |
| T4L         | Hormônio tiroxina livre                                            |
| TESA        | Aspiração de espermatozoide testicular                             |
| TESE        | Extração de espermatozoide testicular                              |
| TESTI- ICSI | Injeção intracitoplasmática de espermatozoide de origem testicular |
| TRA         | Terapia de reprodução assistida                                    |
| TUNEL       | Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling       |

## LISTA DE UNIDADES DE REFERÊNCIA

|                    |        |
|--------------------|--------|
| Estradiol          | pg/mL  |
| FSH                | mIU/mL |
| LH                 | mIU/mL |
| Prolactina         | ng/mL  |
| Testosterona Total | ng/mL  |
| T4 Livre           | ng/dL  |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                       |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                                                     | <b>15</b> |
| 1.1      | FRAGMENTAÇÃO DE DNA                                                                                                   | 16        |
| 1.2      | USO DE ESPERMATOZOIDE TESTICULAR                                                                                      | 17        |
| 1.3      | CUSTO DO TRATAMENTO                                                                                                   | 19        |
| 1.4      | CENÁRIO ATUAL                                                                                                         | 20        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b>                                                                                                      | <b>22</b> |
| 2.1      | DESFECHOS PRIMÁRIOS                                                                                                   | 22        |
| 2.2      | DESFECHOS SECUNDÁRIOS                                                                                                 | 22        |
| <b>3</b> | <b>SELEÇÃO DE PARTICIPANTES E MÉTODOS</b>                                                                             | <b>23</b> |
| 3.1      | DESENHO DO ESTUDO                                                                                                     | 23        |
| 3.2      | PARTICIPANTES                                                                                                         | 23        |
| 3.2.1    | Os critérios de exclusão                                                                                              | 24        |
| 3.3      | TAMANHO DE AMOSTRA                                                                                                    | 25        |
| 3.4      | RANDOMIZAÇÃO                                                                                                          | 25        |
| 3.5      | GERENCIAMENTO DOS DADOS                                                                                               | 25        |
| 3.6      | APROVAÇÕES, COMITÊS E REGISTROS TÉCNICOS                                                                              | 26        |
| 3.6.1    | Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos (CEP)                                                                    | 26        |
| 3.6.2    | Registros técnicos                                                                                                    | 26        |
| 3.7      | INTERVENÇÕES                                                                                                          | 26        |
| 3.7.1    | Grupo Ejaculado                                                                                                       | 27        |
| 3.7.2    | Grupo TESE                                                                                                            | 27        |
| 3.7.3    | Riscos associados ao uso de espermatozoide testicular de homens não azoospérmicos para ICSI – Complicações cirúrgicas | 28        |
| 3.7.4    | Estímulo Ovariano Controlado (EOC)                                                                                    | 29        |
| 3.7.5    | Seguimento                                                                                                            | 29        |
| 3.8      | DEFINIÇÕES                                                                                                            | 30        |
| 3.9      | MÉTODOS ESTATÍSTICOS                                                                                                  | 30        |
| 3.10     | CONFIDENCIALIDADE                                                                                                     | 31        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS</b>                                                                                                     | <b>32</b> |

|          |                                                         |           |
|----------|---------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO</b>                                        | <b>38</b> |
| 5.1      | FATORES DE CONFUSÃO                                     | 44        |
| 5.1.1    | Idades paterna e materna                                | 44        |
| 5.1.2    | Natureza da fragmentação de DNA                         | 44        |
| 5.1.3    | Número de participantes                                 | 45        |
| 5.1.4    | Morfologia e motilidade .....                           | 45        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO</b>                                        | <b>46</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b>                                      | <b>47</b> |
|          | <b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b> |           |
|          | <b>(CEP)</b>                                            | <b>54</b> |



## 1 INTRODUÇÃO

O fator masculino é responsável por quase 50% de todos os casos de infertilidade e geralmente está associado a características anormais do sêmen<sup>1</sup>. No entanto, até 40% dos homens com dificuldade de conceber apresentam parâmetros do sêmen dentro da normalidade, de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>1</sup>.

Apesar de uma grande variação na qualidade do sêmen, a maioria dos homens inférteis tem espermatozoides suficientes no ejaculado para serem utilizados na fertilização in vitro (FIV), em particular na injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)<sup>2</sup>. Todavia, as taxas de nascidos vivos com ICSI como método de tratamento para superar a infertilidade masculina não excedem 30% por ciclo de tratamento em geral<sup>2</sup>.

Assim, embora a infertilidade masculina comumente esteja associada à presença de parâmetros anormais do sêmen, disfunções espermáticas diferentes daquelas reveladas pela análise convencional do sêmen podem ser responsáveis pela dificuldade de concepção<sup>3</sup>. Nesse contexto, o ácido desoxirribonucleico (DNA) do espermatozoide desempenha um papel crítico no desenvolvimento normal do embrião, pois a informação genética passada para a próxima geração depende da integridade do DNA do espermatozoide<sup>3</sup>.

Na presença de valores anormais, várias estratégias foram propostas para superar a fragmentação de DNA do espermatozoide (FDNA) em casais submetidos à terapia de reprodução assistida (TRA)<sup>3</sup>. Por exemplo, reparo de varicocele, terapia antioxidante oral, períodos curtos de abstinência ejacutória e ejaculações recorrentes, além de técnicas de seleção de espermatozoides em laboratório<sup>3</sup>. A técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), desenvolvida em 1992, tem sido usada para tratar pacientes com infertilidade masculina,

especialmente aqueles com criptozoospermia<sup>4</sup>.

A invenção e o desenvolvimento da ICSI permitem que pacientes com criptozoospermia se tornem pais biológicos usando poucos espermatozoides, recuperados de seu tecido testicular ou ejaculados<sup>4</sup>. A esse respeito, em 2017, Cui *et al.* relataram controvérsias em estudos anteriores quanto aos resultados de ICSI realizada preferencialmente com espermatozoides obtidos através da ejaculação em pacientes oligozoospermicos em comparação ao uso de espermatozoides testiculares<sup>4</sup>.

Evidências de inúmeras pesquisas mostraram que a ICSI com espermatozoides obtidos da ejaculação, aspiração de espermatozoide testicular (TESA) ou extração de espermatozoides testiculares (TESE) podem fertilizar oócitos maduros, produzindo embriões de alta qualidade para a gravidez<sup>4</sup>. O desenvolvimento dessa tecnologia possibilita que milhares de pacientes se tornem pais biológicos<sup>4</sup>.

Contudo, esses parâmetros tradicionais mostram valor relativamente ruim na previsão da capacidade de fertilização dos espermatozoides e resultados reprodutivos. De fato, a análise convencional do sêmen não reflete completamente a competência dos espermatozoides<sup>5</sup>. Por esse motivo, nos últimos anos, pesquisas para melhores métodos de diagnóstico que poderiam prever resultados reprodutivos, mais precisamente do lado masculino, resultaram em um foco na FDNA<sup>6</sup>.

## 1.1 FRAGMENTAÇÃO DE DNA

Nas últimas duas décadas, foi sugerido que a avaliação da integridade do DNA nuclear de espermatozoides seria um parâmetro mais objetivo que a análise convencional do sêmen na avaliação da qualidade

dos espermatozoides<sup>1</sup>. A FDNA pode ser definida como qualquer alteração química na estrutura normal do DNA, a qual pode afetar o material genético na forma de quebras de fita única ou dupla<sup>1</sup>.

Há evidências que apoiam a presença de maior dano ao DNA do espermatozoide em homens inférteis do que em férteis<sup>6,7</sup>. Isso é particularmente relevante em uma época na qual as terapias de reprodução assistida são comumente empregadas e a seleção de espermatozoides de maior qualidade pode ser realizada<sup>7,8</sup>.

Vale destacar ainda que a etiologia do dano ao DNA do espermatozoide é multifatorial e não é completamente clara. O estresse oxidativo e as espécies reativas de oxigênio (ERO) são considerados fatores prejudiciais bem conhecidos para o espermatozoide e responsáveis pela interrupção do equilíbrio prooxidante-antioxidante<sup>8,9</sup>.

Um desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade antioxidante leva a um aumento da exposição dos espermatozoides às ERO, que desempenham um papel crítico na alteração da função espermática<sup>10,11</sup>. Os níveis elevados de ERO também podem afetar a passagem do espermatozoide através de túbulos seminíferos e do epidídimo<sup>9,12</sup>.

De modo geral, estudos relatam que os altos danos no DNA de espermatozoides se associaram ao potencial de fertilização reduzido, ao desenvolvimento embrionário anormal e a um pior resultado da gravidez<sup>11</sup>.

## 1.2 USO DE ESPERMATOZOIDE TESTICULAR

A FDNA emergiu como um importante biomarcador na avaliação do potencial de fertilidade masculino<sup>13</sup>. Estima-se que 25% dos homens inférteis tenham níveis mais altos de FDNA, afetando os resultados reprodutivos de certos casais, especialmente daqueles com aborto espontâneo recorrente ou infertilidade idiopática<sup>13</sup>.

Uma revisão sistemática de Zini *et al.* indicou que homens inférteis têm FDNA significativamente mais alta do que os homens férteis<sup>14</sup>. Os danos aos espermatozoides não apenas contribuem para taxas mais altas de fertilizações com falha e perda de gravidez, mas também podem afetar os resultados da TRA em termos de qualidade embrionária, gravidez clínica e taxa de nascido vivo<sup>15</sup>.

Recentemente, o uso de espermatozoide testicular em vez de espermatozoide ejaculado para injeção intracitoplasmática de espermatozoide entre homens com FDNA alta ganhou maior atenção devido a relatos de melhores taxas de gravidez<sup>16,17</sup>. Essas descobertas indicaram que as principais vias que levam à FDNA são desencadeadas durante o transporte de espermatozoides através dos túbulos seminíferos, durante o trânsito do epidídimo, ou em ambos os processos<sup>18</sup>.

A plausibilidade desse fenômeno biológico depende de três fatos importantes: a compactação da cromatina ainda está em andamento durante o trânsito do epidídimo; o excesso de ERO pode ser gerado nas células epiteliais do epidídimo sob estressores físico-químicos, como alta temperatura e condições ambientais<sup>19,20</sup>; finalmente, algumas endonucleases podem clivar o DNA de espermatozoides vivos maduros<sup>21</sup>. Como resultado, danos ao DNA do espermatozoide podem ocorrer por diferentes vias, incluindo radical hidroxila, óxido nítrico e ativação de caspases e endonucleases do espermatozoide, o que explica, assim, a alta positividade para FDNA em espermatozoides ejaculados vivos<sup>18</sup>.

Esse dano induzido por oxidação à cromatina do espermatozoide pode ser potencialmente evitado em candidatos à ICSI, desde que o epidídimo seja contornado. Portanto, o uso de espermatozoides testiculares coletados por aspiração de espermatozoides (TESA) ou extração de espermatozoides testiculares (TESE) torna-se atraente, haja vista que a probabilidade de selecionar espermatozoides livres de danos ao DNA para ICSI pode ser aumentada<sup>17</sup>. Da mesma

forma, a fertilização de um oócito por um espermatozoide testicular geneticamente intacto aumentará as chances de criação de um genoma embrionário normal, que, em última análise, aumentará a probabilidade de gravidez e nascimento vivo<sup>17</sup>.

Em 2005, Greco *et al.* foram os primeiros a demonstrar que a taxa de FDNA era menor nos espermatozoides testiculares do que nos ejaculados de pacientes com falha recorrente da TRA com ICSI. Nesse estudo, a taxa de gravidez por ICSI com espermatozoide testicular foi significativamente maior do que com espermatozoide ejaculado<sup>15</sup>.

Isso ocorre porque, após a liberação do testículo, os espermatozoides com DNA integro podem sofrer oxidação durante o trânsito do epidídimo, o que pode causar a FDNA<sup>4</sup>. No entanto, nenhuma técnica de seleção de espermatozoide (*swim up*, gradiente descontínuo ou seleção em microfluidos – Zymot) é capaz de eliminar completamente os espermatozoides com o DNA danificado<sup>4</sup>. Além disso, as técnicas existentes de seleção de espermatozoides são incapazes de selecionar os espermatozoides individuais desprovidos de danos ao DNA para ICSI<sup>4</sup>.

Diante do exposto, o uso de espermatozoides epididimários equivaleria ao uso de espermatozoides obtidos através de ejaculação, uma vez que o processo oxidativo ocorre preferencialmente no epidídimo. Em ambas as situações, os gametas tiveram a passagem ou estadia por tal estrutura anatômica.

### 1.3 CUSTO DO TRATAMENTO

Jing *et al.* analisaram o custo de tratamento de 2.259 pacientes com infertilidade (1.638 no protocolo Agonista de GnRH e 621 no protocolo Antagonista de GnRH)<sup>22</sup>. O custo total foi menor nos protocolos de Antagonista de GnRH (custos médios de US\$ 16.970,85) do que no protocolo de Agonista de GnRH (custo médio de US\$ 19.902,24) em

ciclos de embriões frescos<sup>22</sup>. Utilizando a análise de custo-efetividade, os custos médios por gravidez em andamento foram estimados em US\$ 8.176,76 e a US\$ 7.595,28 com protocolos de Antagonista de GnRH e protocolos de Agonista de GnRH, respectivamente<sup>22</sup>.

#### 1.4 CENÁRIO ATUAL

Permanece ainda o debate a respeito da escolha da fonte de espermatozoides para a ICSI. Alguns pesquisadores acreditam que os resultados da ICSI usando espermatozoides ejaculados são melhores do que os obtidos por meio de espermatozoides testiculares em pacientes com criptozoospermia, porque a taxa de fertilização está intimamente relacionada à maturidade dos espermatozoides<sup>23,24</sup>.

Na mesma linha, são necessários mais estudos com desenho e tamanho da amostra adequados para fornecer uma resposta conclusiva à questão de saber se o espermatozoide testicular pode ou não ter um papel na população geral de homens oligozoospermicos/criptozoospermicos. Ademais, são fundamentais pesquisas que abordem a relação custo-benefício do espermatozoide testicular em comparação com métodos laboratoriais para seleção de amostras.

No contexto desta tese, o atendimento aos casais inférteis é realizado no Centro de Referência da Saúde da Mulher (CRSM), localizado no Hospital Pérola Byington, atualmente renomeado de Hospital da Mulher, via Sistema Único de Saúde (SUS), logo, sem custo aos usuários. No CRSM, o número de tentativas de tratamento/ciclos é limitado a dois por casal devido ao custeio do tratamento pelo serviço público de saúde. Desse modo, a melhor alocação de recursos financeiros e a otimização dos tratamentos possibilitam aumento dos usuários assistidos/maior número de ciclos de TRA.

Mediante os dados expostos, os pacientes oligozoospermicos têm maior fragmentação de DNA, refletindo no sucesso da TRA, que consiste na taxa de nascidos vivos. Todavia, a pesquisa de fragmentação de DNA do espermatozoide não consta no rol de procedimentos da Agência Nacional de Saúde, ou seja, não tem seu custo coberto pelo SUS. O valor desse exame em serviços particulares varia entre R\$ 800,00 a R\$ 1.000,00, sendo este limitante para o perfil de usuários do SUS, em sua grande maioria.

Tendo em vista a necessidade de aumentar o acesso dos casais à TRA, já que o tempo de infertilidade é um fator prognóstico adverso e que a gravidade da infertilidade masculina é progressiva ao longo do tempo na maior parcela dos pacientes, justifica-se a relevância e o impacto deste trabalho na perspectiva do atendimento no SUS.

Nesse sentido, este estudo piloto, randomizado para uso de espermatozoides ejaculados *versus* recuperados cirurgicamente do testículo, avaliou a melhor primeira opção de tratamento em terapia de reprodução humana assistida, na ausência de testes de fragmentação de DNA do espermatozoide, com a intenção de maximizar o número de usuários do serviço e aumentar a taxa de nascidos vivos.

## **2 OBJETIVOS**

Comparar os resultados de tratamento com reprodução assistida em homens com oligozoospermia, utilizando espermatozoides de origem testicular e de ejaculação.

### **2.1 DESFECHOS PRIMÁRIOS**

O desfecho primário é a taxa de nascidos vivos.

### **2.2 DESFECHOS SECUNDÁRIOS**

São avaliadas a taxa de sucesso da TESE, a taxa de fertilização, a taxa de gravidez clínica e a taxa de aborto.



### 3 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES E MÉTODOS

#### 3.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo piloto randomizado, desenvolvido de acordo com as orientações do Consolidated Standards of Reporting Trials – CONSORT<sup>25</sup>.

#### 3.2 PARTICIPANTES

Foram incluídos casais com idade superior a 18 anos, que apresentavam, no momento da participação do estudo, os seguintes critérios:

- a. duração da infertilidade acima de 1 ano, se idade materna menor que 35 anos, ou 6 meses de infertilidade conjugal, se idade materna igual ou maior que 35 anos;
- b. mulheres com idade de 39 anos ou menos, submetidas à fertilização in vitro-ICSI;
- c. oligozoospermia (<15 milhões/mL), de acordo com as diretrizes da OMS. A análise do sêmen em pacientes foi realizada duas ou mais vezes<sup>1</sup>, sem anormalidades óbvias observadas na história médica, no exame físico e no perfil endócrino;
- d. nenhuma evidência de infecções genitais ao exame clínico e/ou leucospermia (classificada como número superior a 1 milhão de leucócitos/mL no exame de espermograma)<sup>1</sup>;
- e. ausência de testes para dosagem da fragmentação de DNA espermático prévio ao início do tratamento de reprodução assistida.

### 3.2.1 Os critérios de exclusão

**Homens:** apresentar azoospermia obstrutiva, anormalidades citogenéticas conhecidas, microdeleções do cromossomo Y, nível de testosterona menor que 300 ng/dL.

**Mulheres:** ser “*poor responder*”, de acordo com os critérios de Bologna<sup>26</sup>, apresentando pelo menos duas das três seguintes características:

- a. idade materna avançada ( $\geq 40$  anos) ou fatores de risco para má resposta;
- b. má resposta em ciclo de estimulação convencional prévio ( $\leq 3$  oócitos);
- c. provas de reserva ovariana alteradas: contagem de folículos antrais  $< 5$  ou hormônio antimulleriano  $< 0.5$  ng/mL; ou apresentar dois episódios de má resposta em ciclos com máxima estimulação (300 UI de hormônio folículo estimulante – FSH).

Fatores de risco para má resposta ovariana:

- a. baixa reserva ovariana: idade maior que 40 anos, antecedente de quimioterapia, antecedente de cirurgias ovarianas, antecedente familiar de falência ovariana precoce, antecedente de má resposta, FSH  $> 10$  UI/L (terceiro e quinto dia do ciclo), contagem de folículos antrais menores que sete, hormônio antimulleriano menor que 1,1 ng/mL;
- b. reserva ovariana normal: obesidade, endometrioma, polimorfismo dos receptores de FSH.

Somente o primeiro ciclo de ICSI de cada paciente foi incluído neste estudo. Para os casais participantes que não conseguiram a

gravidez no primeiro ciclo de tratamento, foi oferecida uma segunda chance.

Isso posto, esta tese tem caráter assistencial, empregando procedimentos já realizados pelo Setor de Reprodução Humana do CRSM Hospital Pérola Byington. Não haverá indicação de procedimentos com finalidade exclusiva de pesquisa.

### 3.3 TAMANHO DE AMOSTRA

Por não serem encontrados estudos similares nem dados apropriados para o cálculo do tamanho da amostra, adotou-se o Teste de Simon<sup>27</sup>, utilizado para trabalhos randomizados fase II.

Assim, o tamanho da amostra foi estimado em 22 participantes em cada braço de intervenção, com o objetivo de expor o menor número de pacientes ao método e, uma vez confirmada a associação proposta, possibilitar a progressão para um trabalho randomizado com tamanho de amostra maior<sup>28</sup>.

### 3.4 RANDOMIZAÇÃO

Após preencher todos os critérios de inclusão, os participantes foram alocados de forma randomizada para o grupo Ejaculado ou grupo TESE, até que ambos apresentassem o tamanho de amostra adequado segundo cálculo amostral. A randomização foi realizada a partir do *website* Randomization.com<sup>29,30</sup>.

### 3.5 GERENCIAMENTO DOS DADOS

Os dados foram coletados e gerenciados por meios de planilhas do Microsoft Excel 2010.

### 3.6 APROVAÇÕES, COMITÊS E REGISTROS TÉCNICOS

#### 3.6.1 Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos (CEP)

Este trabalho foi submetido à Plataforma Brasil, sob n.º CAAE: 36417920.0.0000.0069, e avaliado no CEP do Centro de Referência da Saúde da Mulher (CRSM), conforme pareceres n.º 4.238.175 e n.º 4.247.875, sendo aprovado com fonte própria de financiamento (vide Anexo A).

#### 3.6.2 Registros técnicos

Trabalho registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (REBEC) e Universal Trial Number, sob identificação: U1111-1258-4687<sup>31</sup>.

### 3.7 INTERVENÇÕES

Avaliaram-se a história e o exame clínico específico para infertilidade de todos os participantes. Inicialmente, estes foram submetidos à investigação mediante exames de perfil hormonal masculino, incluindo hormônio luteinizante sérico (LH), FSH, estradiol, hormônio tireoestimulante, tiroxina livre (T4L) e testosterona total matinal, e análise de sêmen.

Nenhum homem recebeu suplementação com antioxidantes ou polivitamínicos, tampouco foi realizado tratamento hormonal prévio à terapia de reprodução assistida.

A estimulação ovariana foi conduzida segundo o protocolo de rotina longo de supressão lútea, com uso de um agonista do hormônio liberador de gonadotrofina. A recuperação dos oócitos ocorreu sob

orientação de ultrassonografia transvaginal. Depois do procedimento de ICSI, os melhores embriões foram selecionados, com a transferência de embriões efetuada no dia 3 após a recuperação dos oócitos.

### 3.7.1 Grupo Ejaculado

Nesse grupo, além das intervenções descritas acima, realizou-se a coleta seminal através de masturbação no dia da aspiração folicular da parceira, utilizando o sêmen a fresco, com abstinência ejaculatória entre 2 e 5 dias.

### 3.7.2 Grupo TESE

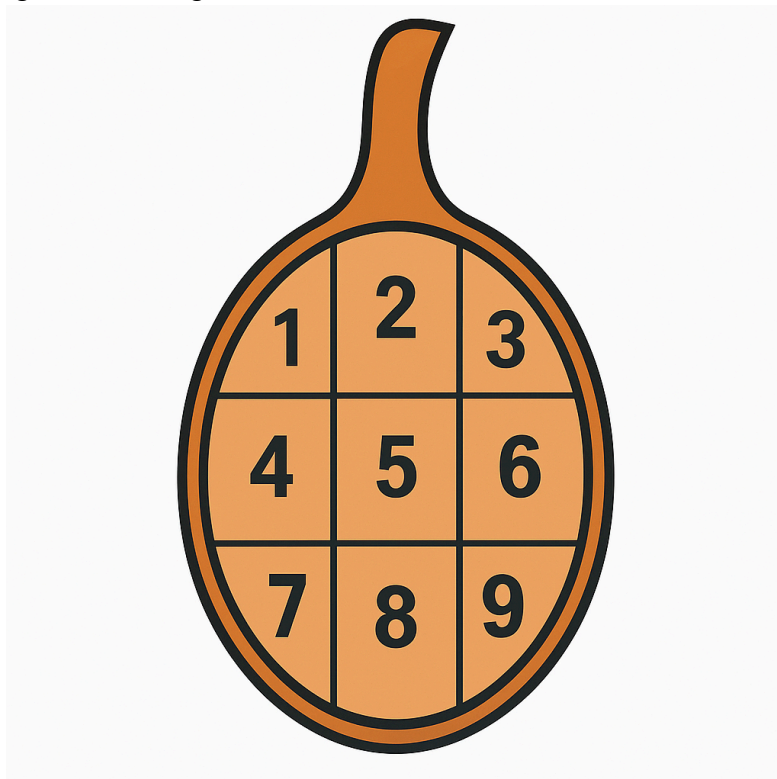
Um único urologista (J.R.P.J.) foi responsável por todos os casos, usando a técnica cirúrgica aberta padrão no testículo maior; na ausência de material testicular suficiente para fertilização dos oócitos, o procedimento foi realizado no outro testículo.

A TESE foi feita sob anestesia raquidiana, por escrototomia mediana, com dissecação por planos, expondo o testículo de maior tamanho, seguida de abertura da túnica vaginal. Procedeu-se à remoção de um fragmento de tecido testicular de aproximadamente 8 mm de extensão através de uma incisão transversal da túnica albugínea. A coleta ocorreu por meio da setorização do testículo em nove quadrantes, sendo três superiores (números 1,2,3 – de lateral para medial), três médios (números 4,5,6 – de lateral para medial) e três inferiores (números 7,8,9 – de lateral para medial), de cranial para caudal, conforme a sequência numérica.

Os fragmentos foram lavados em meio de cultura para remover o sangue e entregues ao embriologista para exame microscópico, acondicionados em placa de Petri. Caso o material testicular não fosse

suficiente para fertilização de todos os oócitos, os tempos cirúrgicos anteriores eram repetidos no testículo contralateral. A hemostasia foi realizada pressionando suavemente o tecido testicular com gaze por aproximadamente 2 minutos, seguida por microcoagulação bipolar. A abertura da túnica vaginal foi reparada com um vicryl 4.0 contínuo; a síntese do músculo cremastérico foi efetuada por meio de vicryl 3.0; e a pele do escroto teve sua síntese com monocryl 3.0.

Figura 1 – Diagrama da divisão testicular durante a TESE



Fonte: Elaboração própria.

### 3.7.3 Riscos associados ao uso de espermatozoide testicular de homens não azoospérmicos para ICSI – Complicações cirúrgicas

A remoção de tecidos no contexto de indivíduos não azoospérmicos é mínima, pois esses pacientes têm espermatogênese

ativa. Portanto, é improvável que ocorram efeitos adversos graves, incluindo redução da produção de testosterona e atrofia potencial dos testículos, que podem acontecer com grande excisão do parênquima testicular.

Por outro lado, complicações menores após a recuperação de espermatozoides são relatadas com uma incidência geral de cerca de 5% ou menos e compreendem dor, inchaço, infecção e hematoma<sup>4</sup>.

#### 3.7.4 Estímulo Ovariano Controlado (EOC)

Conforme definição de protocolo institucional:

- a. Elonva® (alfacorifolitropina) 150 mcg – D1 ao D7;
- b. Pergoveris® (150 UI de alfafolitropina + 75 UI de alfalutropina)/Merional® (gonadotrofina menopáusica humana) – 225 a 300 – D8 até a véspera da aspiração folicular;
- c. Orgalutran® (Acetato de ganirelix) 0,25 mg – D5 até o trigger;
- d. Duplo trigger com Gonapeptyl® 0,2 mg/mL (acetato de triptorrelinina) + Choriomon® 5000 UI (gonadotropina coriônica);
- e. uso de Utrogestan® 800 mg (progesterona) a partir da aspiração folicular.

#### 3.7.5 Seguimento

Os participantes foram seguidos até a 12ª semana de forma direta e por contato telefônico realizado mensalmente até o aborto ou o nascimento. Após a 12ª semana, as mulheres são referenciadas ao setor de maternidade/obstetrícia, e os homens recebem alta do seguimento ambulatorial do serviço.

### 3.8 DEFINIÇÕES

A taxa de nascidos vivos corresponde à razão entre o número de partos, resultando em pelo menos um nascimento, e o número de ciclos iniciados.

A taxa de sucesso da TESE é estimada pela recuperação de espermatozoides viáveis entre os pacientes submetidos ao procedimento.

A fertilização é definida como o número total de oócitos fertilizados sobre o número total de oócitos injetados por ciclo de ICSI.

A gravidez clínica é determinada pela visualização de um saco gestacional com um embrião, mostrando atividade cardíaca no ultrassom nas semanas 5 a 7.

O aborto é caracterizado como uma gravidez clínica inviável, observada no acompanhamento por ultrassom até a semana gestacional 20.

### 3.9 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Uma análise descritiva das variáveis foi realizada para descrever o perfil da população estudada. Para as variáveis quantitativas, avaliou-se a aderência à distribuição normal por meio do teste de Shapiro-Wilk. Quando apresentaram distribuição normal, a comparação das variáveis quantitativas entre os grupos foi feita a partir do teste T de Student; quando não apresentaram, foram analisadas utilizando-se o teste de Mann-Whitney.

As variáveis qualitativas, como as taxas de fertilização, gravidez clínica, aborto e de nascidos vivos, bem como de sucesso da TESE, foram comparadas entre os grupos pelo teste exato de Fisher.

Para as análises, adotou-se o nível de significância de 5%, e todas as etapas estatísticas foram conduzidas no programa Stata®



(StataCorp, LC) versão 11.0. Ademais, os valores com aderência ao padrão de normalidade são expressos em média e desvio-padrão (DP) e os valores sem aderência à distribuição normal são expressos em mediana e intervalo interquartil (IQR).

### 3.10 CONFIDENCIALIDADE

Apenas pacientes que deram seu consentimento informado ao procedimento e à utilização anônima de seus dados clínicos foram incluídos no estudo.

#### 4 RESULTADOS

Os participantes do estudo apresentaram idade média de 37,9 anos entre os homens e de 37 anos entre as mulheres, sendo a infertilidade de etiologia primária em 84,1% dos casos, com duração mediana de 70 meses (Tabela 1).

Os parâmetros seminais apresentaram volume mediano de 3 mL, concentração seminal mediana de 2,4 milhões/mL, com espermatozoides móveis progressivos com valores medianos de 22%. Já os exames bioquímicos apresentaram os valores medianos a seguir: FSH, 7,9 UI/mL; LH, 5,2 UI/L; prolactina, 9,9 ng/mL; testosterona total, 454,5 ng/mL. A tiroxina livre apresentou valor médio de 1,08 ng/dL e o estradiol, de 26,8 pg/mL, como exposto na tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização da amostra estudada

| <b>Variáveis</b>                              | <b>Valores</b> |
|-----------------------------------------------|----------------|
| <b>Clínicas</b>                               |                |
| Idade masculina, média (DP)                   | 37,9 (4,5)     |
| Mínimo: 28; Máximo: 46                        |                |
| Idade feminina, mediana (IQR)                 | 37,0 (5,0)     |
| Mínimo: 29; Máximo: 39                        |                |
| Etiologia – Secundária (N, %)                 | 7 (15,9)       |
| Etiologia – Primária (N, %)                   | 37 (84,1)      |
| Tempo de infertilidade (meses), mediana (IQR) | 70,0 (49,0)    |
| Mínimo: 24; Máximo: 240                       |                |
| <b>Espermograma</b>                           |                |
| Volume (mL), mediana (IQR)                    | 3,0 (2,2)      |
| pH, mediana (IQR)                             | 7,5 (0,5)      |
| Concentração (milhões/mL), mediana (IQR)      | 2,4 (6,1)      |
| Mínimo: 0,0001; Máximo: 11,6                  |                |
| A + B (%), mediana (IQR)                      | 22,0 (35,5)    |
| Mínimo: 0; Máximo: 86                         |                |
| A + B + C, média (DP)                         | 38,6 (24,9)    |
| Mínimo: 0; Máximo: 86                         |                |
| Imóveis, média (DP)                           | 60,5 (22,3)    |
| Kruger (%), média (DP)                        | 2,82 (2,1)     |
| <b>Exames bioquímicos</b>                     |                |
| FSH, mediana (IQR)                            | 7,9 (7,5)      |
| LH, mediana (IQR)                             | 5,2 (2,5)      |
| Prolactina, mediana (IQR)                     | 9,9 (6,5)      |
| Testosterona Total, mediana (IQR)             | 454,5 (324,5)  |
| T4L, média (DP)                               | 1,08 (0,18)    |
| Estradiol, média (DP)                         | 26,8 (12,3)    |
| <b>Varicocele, N (%)</b>                      |                |
| Não                                           | 32 (72,7)      |
| Sim                                           | 12 (27,3)      |

Fonte: Elaboração própria.

Conforme a tabela 2, a população geral do estudo atingiu a mediana de seis oócitos por ciclo de estímulo, dos quais cinco eram maduros, e mediana de fertilização de 3 oócitos, gerando em média 2,05 embriões em D3. A taxa média de embrião transferido foi de 1,3 embrião. Nesse contexto, observou-se a gravidez bioquímica em 18 casos (46,2%), com 13 nascidos vivos em 44 tratamentos (29,5%).

Tabela 2 – Descrição dos desfechos reprodutivos na população estudada

| Variáveis                         | Valores     |
|-----------------------------------|-------------|
| Número de oócitos, mediana (IQR)  | 6,0 (4,0)   |
| Oócitos maduros, mediana (IQR)    | 5,0 (2,5)   |
| Fertilizados, mediana (IQR)       | 3,0 (2,0)   |
| Embrião D3, média (DP)            | 2,05 (1,10) |
| Transferências, média (DP)        | 1,0 (0,4)   |
| Embriões transferidos, média (DP) | 1,3 (0,56)  |
| <b>Beta HCG, N (%)</b>            |             |
| Não                               | 21 (53,8)   |
| Sim                               | 18 (46,2)   |
| <b>Nascidos vivos, N (%)</b>      |             |
| Não                               | 5 (17,8)    |
| Sim                               | 13 (72,2)   |

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a tabela 3, a comparação entre os grupos Ejaculado vs. TESE evidencia uma diferença estatística nas idades: 35,5 vs. 40,3 ( $p < 0,001$ ) entre os homens e 34,0 vs. 38,0 entre as mulheres ( $p = 0,008$ ), respectivamente. Quanto ao tempo de infertilidade, houve diferença estatística entre os grupos: 90 meses no grupo Ejaculado vs. 55 meses no TESE. Além disso, a etiologia primária mostrou-se mais prevalente no grupo TESE (95,4%) do que no grupo Ejaculado (72,7%), com  $p = 0,047$ .

Tabela 3 – Comparação das características clínicas entre os grupos Ejaculado e TESE

| Variáveis                                     | Ejaculado<br>22 (50,0%) | TESE<br>22 (50,0%) | $p^*$    |
|-----------------------------------------------|-------------------------|--------------------|----------|
| <b>Clínicas</b>                               |                         |                    |          |
| Idade masculina, média (DP)                   | 35,5 (4,1)              | 40,3 (3,5)         | $<0,001$ |
| Idade feminina, mediana (IQR)                 | 34,0 (7,0)              | 38,0 (3,0)         | 0,008    |
| <b>Etiologia</b>                              |                         |                    |          |
| Primária                                      | 16 (72,7)               | 21 (95,4)          | 0,047    |
| Secundária                                    | 6 (27,27)               | 1 (4,6)            |          |
| Tempo de infertilidade (meses), mediana (IQR) | 90,0 (38,0)             | 55,0 (48,0)        | 0,012    |
| <b>Varicocele, N (%)</b>                      |                         |                    |          |
| Não                                           | 17 (77,27)              | 15 (68,18)         | 0,368    |
| Sim                                           | 5 (22,73)               | 7 (31,82)          |          |

Nota: \*Teste de Mann-Whitney para comparações das medianas; Teste t de Student para comparações das médias.

Fonte: Elaboração própria.

Não houve diferença estatística entre os valores da análise seminal nos grupos Ejaculado vs. TESE, exceto em relação ao valor do pH (7,5 vs. 7,8), embora dentro da faixa de normalidade. Ainda assim, verificou-se menor concentração seminal no grupo Ejaculado (1,9 milhão/mL) quando comparado ao grupo TESE (6,0 milhões/mL) (Tabela 4).

Tabela 4 – Comparação dos parâmetros do espermograma entre os grupos Ejaculado e TESE

| Variáveis                                | Ejaculado<br>22 (50,0%) | TESE<br>22 (50,0%) | <i>p</i> * |
|------------------------------------------|-------------------------|--------------------|------------|
| Volume (mL), mediana (IQR)               | 2,7 (2,1)               | 3,3 (2,2)          | 0,295      |
| pH, mediana (IQR)                        | 7,5 (0,3)               | 7,8 (0,5)          | 0,001      |
| Concentração (milhões/mL), mediana (IQR) | 1,9 (2,9)               | 6,0 (8,8)          | 0,145      |
| A + B (%), mediana (IQR)                 | 30,0 (48,0)             | 24,5 (12,0)        | 0,290      |
| A + B + C, média (DP)                    | 44,5 (30,1)             | 32,6 (16,9)        | 0,129      |
| Imóveis, média (DP)                      | 55,5 (30,1)             | 66,7 (16,5)        | 0,128      |
| Kruger (%), média (DP)                   | 3,4 (2,1)               | 2,1 (1,9)          | 0,117      |

Nota: \*Teste de Mann-Whitney para comparações das medianas; Teste t de Student para comparações das médias.

Fonte: Elaboração própria.

Os níveis de prolactina foram significativamente mais altos no grupo TESE (12,0 ng/mL) em comparação ao grupo Ejaculado (6,7 ng/mL), com  $p < 0,001$ , porém dentro dos níveis fisiológicos. As medições de FSH, LH, testosterona total e T4L não mostraram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 5).

Tabela 5 – Comparação dos parâmetros bioquímicos entre os grupos Ejaculado e TESE

| Variáveis                         | Ejaculado<br>22 (50,0%) | TESE<br>22 (50,0%) | <i>p</i> * |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------------|------------|
| FSH, mediana (IQR)                | 6,3 (5,9)               | 9,2 (7,9)          | 0,318      |
| LH, mediana (IQR)                 | 4,2 (2,9)               | 5,8 (2,1)          | 0,093      |
| Prolactina, mediana (IQR)         | 6,7 (4,3)               | 12,0 (9,0)         | <0,001     |
| Testosterona Total, mediana (IQR) | 445,0 (327,0)           | 465,0 (255,0)      | 0,943      |
| T4L, média (DP)                   | 1,1 (0,1)               | 1,1 (0,2)          | 0,319      |
| Estradiol, média (DP)             | 31,9 (12,4)             | 21,9 (10,2)        | 0,006      |

Nota: \*Teste de Mann-Whitney para comparações das medianas; Teste t de Student para comparações das médias.

Fonte: Elaboração própria.

No que se refere aos desfechos reprodutivos (Tabela 6), o número de embriões transferidos foi significativamente maior no grupo Ejaculado (1,5) comparado ao grupo TESE (1,1), com  $p = 0,035$ . Outros desfechos, como o número de oócitos maduros e fertilizados, não mostraram diferenças significativas. Foram 103 oócitos maduros no grupo TESE, com 65 oócitos fertilizados e 37 embriões em D3. Já no grupo Ejaculado, foram 138 oócitos maduros, com 82 oócitos fertilizados e 45 embriões em D3.

Apesar de não haver diferença estatística para nascidos vivos entre os grupos, o grupo TESE obteve 8 nascidos em 22 tratamentos (36,36%), enquanto o grupo Ejaculado apresentou 5 nascidos vivos em 22 tratamentos (22,72%). Em dois tratamentos do grupo TESE, não foram encontrados espermatozoides para fertilização. No grupo Ejaculado, houve um aborto com idade gestacional menor que 12 semanas e um nascimento gemelar. Ademais, não houve complicações cirúrgicas maiores durante o período de acompanhamento nem registros de hipogonadismo após procedimento, no mesmo período.

Tabela 6 – Comparação dos parâmetros reprodutivos entre os grupos Ejaculado e TESE

| Variáveis                               | Ejaculado<br>22 (50,0%) | TESE<br>22 (50,0%) | <i>p</i> |
|-----------------------------------------|-------------------------|--------------------|----------|
| Número de oócitos, mediana (IQR)        | 7,0 (6,0)               | 6,0 (4,0)          | 0,239    |
| Oócitos maduros, mediana (IQR)          | 5,5 (4,0)               | 4,0 (3,0)          | 0,147    |
| Fertilizados, mediana (IQR)             | 3,0 (2,0)               | 3,0 (2,0)          | 0,443    |
| Embrião D3, média (DP)                  | 2,1 (1,2)               | 1,9 (1,0)          | 0,584    |
| Transferências, média (DP)              | 1,0 (0,3)               | 1,1 (0,4)          | 0,647    |
| Embriões transferidos, média (DP)       | 1,5 (0,6)               | 1,1 (0,5)          | 0,035    |
| Taxa de fertilização (%), mediana (IQR) | 25,0 (8,3)              | 33,3 (30,0)        | 0,648    |
| <b>Beta HCG</b>                         |                         |                    |          |
| Não                                     | 13 (61,90)              | 8 (44,44)          | 0,221    |
| Sim                                     | 8 (38,10)               | 10 (55,56)         |          |

Nota: Teste de Mann-Whitney para comparações das medianas; Teste t de Student para comparações das médias; Teste de Fisher para comparações dos percentuais.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 7 – Modelos preditivos da taxa de nascidos vivos entre os grupos Ejaculado e TESE

| Modelo                | Taxa de nascidos vivos<br>OR (IC 95%) | p*    | R <sup>2</sup> |
|-----------------------|---------------------------------------|-------|----------------|
| <b>Clínico</b>        |                                       | 0,484 | 0,151          |
| Grupo                 | 0,50 (0,02; 11,4)                     | 0,671 |                |
| Idade masculina       | 1,11 (0,76; 1,63)                     | 0,563 |                |
| Idade feminina        | 0,91 (0,58; 1,44)                     | 0,185 |                |
| <b>Espermograma</b>   |                                       | 0,655 | 0,03           |
| Grupo                 | 3,61 (0,18; 69,04)                    | 0,393 |                |
| pH                    | 0,15 (0,001; 18,66)                   | 0,445 |                |
| <b>Bioquímico</b>     |                                       | 0,820 | 0,04           |
| Grupo                 | 0,42 (0,01; 14,29)                    | 0,632 |                |
| Prolactina            | 1,19 (0,78; 1,81)                     | 0,411 |                |
| Estradiol             | 0,98 (0,86; 1,12)                     | 0,844 |                |
| <b>Reprodutivo</b>    |                                       | 0,051 | 0,25           |
| Grupo                 | 0,49 (0,03; 7,30)                     | 0,611 |                |
| Embriões transferidos | 0,08 (0,01; 0,95)                     | 0,046 |                |

Legenda: IC 95%: Intervalo de Confiança de 95%; R<sup>2</sup>: Capacidade preditiva do modelo.

Nota: \*Regressão Logística.

Fonte: Elaboração própria.

Os modelos preditivos (Tabela 7) indicaram que a taxa de nascidos vivos não foi significativamente diferente entre os grupos, com *odds ratios* variados. O modelo bioquímico e o clínico mostraram uma capacidade preditiva moderada, mas com *p*-valores não significativos, sendo o coeficiente de determinação baixo.

## 5 Discussão

Mehta *et al.* relataram uma série de casos envolvendo 24 homens com oligozoospermia (<5 milhões/mL) e FDNA > 7% por TUNEL, com tentativas anteriores de ICSI utilizando espermatozoide ejaculado<sup>16</sup>. Os pacientes foram submetidos à extração de espermatozoides testiculares por microdissecção (micro-TESE), e os espermatozoides recuperados foram usados para a ICSI<sup>16</sup>. A gravidez clínica foi alcançada em 50% dos 24 casais no ciclo de Testi-ICSI, e todas as gestações resultaram em entregas de bebês saudáveis. O nível médio de fragmentação de DNA pelo método de TUNEL foi de 24,5% para espermatozoide ejaculado e 4,6% para espermatozoide testicular<sup>16</sup>.

Em outro estudo recente, Pabuccu *et al.* analisaram retrospectivamente os resultados de ICSI de 71 casais com repetidas falhas de TRA (> 2 tentativas de ICSI malsucedidas), nas quais o parceiro masculino teve normozoospermia (segundo critérios da OMS<sup>1</sup>) e alta FDNA (> 30%) por TUNEL<sup>32</sup>. Os espermatozoides testiculares e ejaculados foram utilizados para ICSI em 31 e 40 casais, respectivamente. Apesar de as taxas de fertilização e implantação serem semelhantes, as taxas de gravidez clínica (41,9% vs. 20,0%;  $p = 0,04$ ) e em andamento (38,7% vs. 15,0%;  $p = 0,02$ ) por ciclo inicial foram maiores com espermatozoides testiculares em comparação aos ejaculados<sup>32</sup>.

Nesse sentido, o uso de espermatozoides testiculares podem levar a melhores resultados em ICSI do que o uso de espermatozoides ejaculados<sup>4</sup>. Provavelmente, os poucos espermatozoides remanescentes no ejaculado de pacientes com criptozoospermia são contaminados e destruídos em decorrência dos danos causados pelos radicais livres de oxigênio ao passar pelo trato urogenital, enquanto os espermatozoides testiculares não são afetados por esses fatores<sup>4</sup>.

Embora espermatozoides com fragmentação de DNA



aumentada tenham potencial de fertilização semelhante ao de homólogos sem FDNA, a injeção de espermatozoides com cromatina danificada pode resultar em diminuição do implante de embriões e perda precoce da gravidez<sup>2</sup>. À vista disso, Moskovtsev *et al.*, ao compararem a incidência de fragmentação de DNA nos espermatozoides ejaculados *versus* testiculares, verificaram valores significativamente menores nas amostras testiculares ( $39,7\% \pm 14,8$  *versus*  $13,3\% \pm 7,3$ , respectivamente)<sup>33</sup>.

Em 2016, Abhyankar, Kathrins e Niederberger conduziram uma revisão sistemática (Quadro 1), seguida de metanálise, de estudos que compararam os resultados de ICSI usando espermatozoide ejaculado ou espermatozoide testicular em homens com oligozoospermia grave ou criptozoospermia<sup>34</sup>. Os autores identificaram cinco estudos retrospectivos, com tamanhos de coorte que variavam de 2 a 192 casais<sup>34</sup>, e chegaram à conclusão de que o espermatozoide testicular não deve ser recomendado preferencialmente ao espermatozoide ejaculado em homens com oligozoospermia grave ou criptozoospermia<sup>34</sup>. Contudo, vale ressaltar que nenhum dos pacientes incluídos foi testado para FDNA<sup>34</sup>.

Quadro 1 – Características dos estudos incluídos na metanálise (adaptado)

| Estudo                    | Desfecho                        | N.º de casais | N.º de ciclos de ICSI    | Idade média materna (anos) | Idade média paterna (anos) | Parâmetros seminais (ejaculado)                                                                                           | Ejaculado antes do testicular?                                    | Variáveis ajustadas                                            | Método de extração cirúrgica |
|---------------------------|---------------------------------|---------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------|
|                           |                                 |               | Ejaculado/<br>Testicular | Ejaculado/<br>Testicular   | Ejaculado/<br>Testicular   |                                                                                                                           |                                                                   |                                                                |                              |
| <b>Ben-Ami (2013)</b>     | Taxa de fertilização e gravidez | 17            | 68 / 48                  | 29,1 ± 3,4 / 30,9 ± 4,1    | 32,8 ± 5,3 / 36,3 ± 6,6    | Não disponível                                                                                                            | Sim                                                               | Viés de falha nos ciclos com ejaculado                         | TESE                         |
| <b>Amirjannati (2012)</b> | Taxa de fertilização            | 192           | 208 / 19                 | 31,85 ± 5,76 / 35,0 ± 5,91 | 36,8 ± 5,3 / 40,7 ± 4,9    | Contagem total de espermatozoides: 0,65 ± 0,31 ( $\times 10^6$ )<br>Morfologia: 4,1% ± 4,5%<br>Vitalidade: 68,4% ± 18,07% | Não aplicável                                                     | Número de oócitos recuperados, idade da mulher, idade do homem | Micro-TE SE                  |
| <b>Bendikson (2008)</b>   | Taxa de fertilização e gravidez | 16            | 27 / 21                  | 33,6 ± 5,6 / 32,7 ± 5,5    | 36,7 ± 5,0 / 37,0 ± 4,0    | Contagem total de espermatozoides: 0,01 ± 0,02 $\times 10^3$                                                              | Não                                                               | Falência testicular progressiva com o tempo                    | TESE                         |
| <b>Hauser (2011)</b>      | Taxa de fertilização e gravidez | 13            | 34 / 59                  | 32,7 ± 4,5 / 34,1 ± 5,1    | 36,7 ± 8,3 / —             | Não disponível                                                                                                            | 5 TESE primeiro por azoospermia transitória, 8 ejaculado primeiro | Nenhuma                                                        | TESE                         |
| <b>Weissman (2008)</b>    | Taxa de gravidez                | 2             | 13 / 2                   | 31,25 ± 3,75 / —           | 32,75 ± 2,75 / —           | Não disponível                                                                                                            | Sim                                                               | Nenhuma                                                        | TESE                         |

Fonte: Abhyankar, Kathrins e Niederberger<sup>34</sup>, p. 1472.

Além disso, a metanálise mencionada acima foi baseada em estudos retrospectivos de tamanho limitado de amostra, que não relataram taxas de nascidos vivos. Portanto, permanece ambíguo se esses pacientes com FDNA alto no sêmen podem se beneficiar do Testi-ICSI<sup>34</sup>.

Já Esteves *et al.* realizaram um estudo prospectivo avaliando o uso de espermatozoides testiculares e ejaculados de homens inférteis oligozoospermicos com alto índice de FDNA nos resultados da ICSI<sup>17</sup>. Essa pesquisa baseou-se principalmente na recuperação de espermatozoides testiculares, que permitiu obter gametas móveis para injeção em todos os casos. Os autores adotaram o critério restrito de não incluir pacientes com oligozoospermia grave (<5 milhões/mL), pois a quantidade presumivelmente menor de espermatozoides recuperados poderia comprometer a avaliação da FDNA no material testicular.

Entre os 147 casais submetidos à FIV-ICSI, todos com parceiros masculinos diagnosticados com oligospermia e FDNA elevada, verificou-se índice de fragmentação significativamente menor nos espermatozoides testiculares em comparação aos ejaculados (8,3% *versus* 40,7%, respectivamente). Em adição, houve melhora significativa nas taxas de nascidos vivos e redução na taxa de aborto, com risco relativo de 0,29 para aborto e 1,76 para nascimento vivo<sup>17</sup>.

Nesse ponto, convém sinalizar que existem diferentes métodos, não comparáveis entre si, para determinação da fragmentação do DNA do espermatozoide<sup>35</sup>:

- a. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) – detecta quebras simples e duplas de DNA por meio da incorporação de dUTPs marcados pela enzima TdT diretamente nos locais de fragmentação;
- b. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) – baseia-se na vulnerabilidade da cromatina à desnaturação ácida. Utiliza

laranja de acridina, que emite fluorescência verde quando o DNA está íntegro e vermelha quando se encontra desnaturado.

- c. Sperm Chromatin Dispersion Test (SCD), também chamado de teste do halo – após desnaturação controlada, espermatozoides com DNA íntegro formam halos de cromatina, enquanto os fragmentados não formam;
- d. Comet Assay (Teste do Cometa) – fundamentado na eletroforese de espermatozoides embebidos em gel. As quebras de DNA resultam em migração do material genético, formando imagem semelhante a um cometa.

Nas técnicas de TRA, danos no DNA do espermatozoide têm sido apontados como responsáveis por menores taxas de fertilização, desenvolvimento embrionário prejudicado e maior incidência de perda gestacional precoce<sup>11,36</sup>. Assim, em homens inférteis submetidos à TRA, uma estratégia proposta para reduzir o dano ao DNA adquirido durante o trânsito epididimário e pós-testicular é o uso de espermatozoides testiculares<sup>3</sup>.

Adicionalmente, o uso de espermatozoides testiculares para ICSI associou-se a melhores desfechos gestacionais, mesmo em pacientes com parâmetros seminais dentro da normalidade, porém com FDNA elevada, apresentando taxas de gravidez clínica de 13% vs. 8% ( $p = 0,045$ ) e gravidez em andamento de 12% vs. 6% ( $p = 0,023$ )<sup>32</sup>.

Alharbi *et al.* demonstraram que as taxas de gravidez clínica por transferência a fresco, de aborto e de nascidos vivos no grupo Testi-ICSI não diferiram significativamente do grupo ICSI com ejaculado e alta FDNA (48,0% vs. 38,7%; 11,1% vs. 16,7%; 36,4% vs. 30,0%, respectivamente; todos  $p > 0,05$ )<sup>37</sup>. Embora essa coorte tenha sido considerada adequada para comparação, os grupos não eram completamente equivalentes, uma vez que a fragmentação de DNA era

maior no grupo Testi-ICSI ( $37,6 \pm 15,9$  vs.  $26 \pm 8,6$ ;  $p < 0,001$ ), assim como a concentração e a motilidade eram superiores no grupo ejaculado<sup>37</sup>.

Em revisão de literatura, Esteves, Roque e Garrido observaram maiores taxas de gravidez clínica e nascidos vivos no grupo que utilizou espermatozoides testiculares em relação ao que recorreu a espermatozoides ejaculados<sup>3</sup>.

Arafa *et al.*, comparando os resultados do ICSI com espermatozoides testiculares e ejaculados, não observaram diferenças nas taxas de fertilização ou na classificação embrionária ( $46,4\%$  vs.  $47,8\%$ ;  $50,2\%$  vs.  $53,4\%$ )<sup>38</sup>. Todavia, a gravidez clínica foi significativamente maior no grupo TESA ( $38,9\%$  vs.  $13,8\%$ )<sup>38</sup>, do mesmo modo que a taxa de nascidos vivos ( $38,9\%$  vs.  $8\%$ ;  $p < 0,0001$ )<sup>38</sup>, enquanto a perda gestacional foi maior no grupo ejaculado.

Em homens com oligozoospermia, os espermatozoides testiculares apresentam menor fragmentação de DNA<sup>2,3,15,16,17</sup> e maior taxa de aneuploidia<sup>22,33</sup> do que os ejaculados, equilíbrio crucial na decisão sobre realizar a recuperação cirúrgica de espermatozoides para FIV<sup>2,3</sup>. Alguns estudos demonstraram maiores taxas de aneuploidia em espermatozoides testiculares, principalmente em homens com disfunção espermatogênica grave, como na azoospermia não obstrutiva<sup>22,33</sup>. Em homens com oligozoospermia, o ejaculado tende a apresentar menor taxa de aneuploidia devido à eliminação natural de gametas comprometidos durante a maturação epididimária<sup>2,22,33</sup>. Assim, o uso de espermatozoides ejaculados pode oferecer vantagens genéticas em casos selecionados<sup>2,22</sup>.

Diante dos dados disponíveis e dos achados do presente estudo, sugere-se que o uso de espermatozoides testiculares para FIV em oligozoospermia, sem avaliação prévia de FDNA, apresenta tendência a maior taxa de nascidos vivos, possivelmente configurando a melhor opção clínica.

No contexto do serviço público, maiores taxas de nascidos

vivos reduzem a necessidade de um segundo ciclo, ampliando o acesso à TRA. Considerando um tempo mediano de infertilidade de 70 meses e a necessidade de otimizar recursos, estima-se que, a cada 22 pacientes tratados com TESE-ICSI, obtenham-se 3 nascidos vivos adicionais. Para 300 casos/ano, isso representaria aproximadamente 40 nascidos vivos adicionais ao ano.

## 5.1 FATORES DE CONFUSÃO

### 5.1.1 Idades paterna e materna

O valor preditivo da FDNA é influenciado pela idade materna, que determina a capacidade do oócito de reparar danos ao DNA<sup>39</sup>. A qualidade do DNA do espermatozoide também se deteriora com o avanço da idade paterna<sup>40</sup>. Neste estudo, as idades paterna e materna foram maiores no grupo TESE, podendo acentuar o efeito deletério da FDNA<sup>41</sup>. Em função disso, é fundamental controlar tal fator por critérios de inclusão ou análise estatística apropriada<sup>3</sup>.

### 5.1.2 Natureza da fragmentação de DNA

O espermatozoide testicular não resolve todas as formas de FDNA, já que parte dos danos ocorre ainda no testículo por apoptose ou defeitos na remodelação da cromatina<sup>42</sup>. Esses espermatozoides podem atravessar o trato genital sem sofrer danos adicionais<sup>18</sup>. Dessa maneira, a vantagem do espermatozoide testicular se aplica principalmente à FDNA pós-testicular<sup>3</sup>. Além disso, 20-40% dos homens com sêmen normal apresentam FDNA elevada<sup>43,44</sup>, podendo também se beneficiar da abordagem testicular.

### 5.1.3 Número de participantes

O tamanho amostral reduzido se justifica por se tratar de ensaio clínico fase II, evitando exposição desnecessária a procedimento cirúrgico. Não há estudos randomizados comparando espermatozoide ejaculado *versus* testicular como primeira opção de FIV em oligozoospermia não avaliada para FDNA. A maioria dos estudos não inclui homens com oligozoospermia grave, como aconteceu nesta tese.

### 5.1.4 Morfologia e motilidade

A análise de morfologia e motilidade em material testicular é limitada devido à imaturidade e imobilidade fisiológica do espermatozoide testicular. Algumas amostras apresentaram concentração muito baixa, dificultando uma avaliação precisa.

## 6 CONCLUSÃO

O uso de espermatozoide testicular para TRA *versus* o uso de ejaculado resultou em tendência de aumento da taxa de nascidos vivos. Logo, apesar de não atingir significância estatística. Sendo este trabalho um estudo piloto abre-se um cenário de possível emprego na prática clínica.

Com isso, pode-se pleitear, junto ao Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos, a habilitação de ensaio clínico de fase III, com maior amostra, a fim de aprofundar a análise e avaliar os desfechos do uso de espermatozoides testiculares em FIV, como primeira opção, no quadro de oligozoospermia com fragmentação de DNA espermático não testada.



## REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> OMS. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 5. ed. Geneva: OMS, 2010.
- <sup>2</sup> LOPES, L. S.; ESTEVES, S. C. Testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in non-azoospermic men: a paradigm shift. **Panminerva Medica**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 178-186, jun. 2019. DOI: 10.23736/S0031-0808.18.03534-6. Disponível em: <https://www.minervamedica.it/en/journals/panminerva-medica/article.php?cod=R41Y2019N02A0178>. Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>3</sup> ESTEVES, S. C.; ROQUE, M.; GARRIDO, N. Use of testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with high sperm DNA fragmentation: a SWOT analysis. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. 20, n. 1, 1-8, fev. 2018. DOI: 10.4103/aja.aja\_7\_17. Disponível em: [https://journals.lww.com/ajandrology/fulltext/2018/20010/use\\_of\\_testicular\\_sperm\\_for\\_intracytoplasmic\\_sperm.1.aspx](https://journals.lww.com/ajandrology/fulltext/2018/20010/use_of_testicular_sperm_for_intracytoplasmic_sperm.1.aspx). Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>4</sup> CUI, X. *et al.* Comparison of ICSI outcomes between spermatozoa from testicular biopsy and ejaculate in cryptozoospermic patients. **Urology**, [s. l.], v. 102, p. 106-110, abr. 2017. DOI: 10.1016/j.urology.2016.08.071. Disponível em: [https://www.goldjournal.net/article/S0090-4295\(16\)30902-5/abstract](https://www.goldjournal.net/article/S0090-4295(16)30902-5/abstract). Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>5</sup> SIGMAN, M.; ZINI, A. Semen analysis and sperm function assays: what do they mean? **Seminars in Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 115-123, mar. 2009. DOI: 10.1055/s-0029-1202300. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0029-1202300>. Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>6</sup> OEHNINGER, S.; OMBELET, W. Limits of current male fertility testing. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 111, n. 5, p. 835-841, maio 2019. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.03.005. Disponível em: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(19\)30248-1/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(19)30248-1/fulltext). Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>7</sup> AGARWAL, A. *et al.* Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 86, n. 4, p. 878-885, 2006. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.02.111. Disponível em: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(06\)01161-7/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(06)01161-7/fulltext). Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>8</sup> ZINI, A.; SAN GABRIEL, M.; BAAZEEM, A. Antioxidants and sperm DNA

damage: a clinical perspective. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 427-432, ago. 2009. DOI: 10.1007/s10815-009-9343-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10815-009-9343-5>. Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>9</sup> WAGNER, H.; CHENG, J. W.; KO E. Y. Role of reactive oxygen species in male infertility: an updated review. **Arab Journal of Urology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 35-43, mar. 2018. DOI: 10.1016/j.aju.2017.11.001. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1016/j.aju.2017.11.001>. Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>10</sup> CALISKAN, Z. *et al.* Evaluation of sperm DNA fragmentation in male infertility. **Andrologia**, [s. l.], v. 54, n. 11, e14573, set. 2022. DOI: 10.1111/and.14587. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.14587>. Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>11</sup> AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. **Reproductive Biomedicine Online**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 727-33, abr. 2007. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60676-1. Disponível em: [https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(10\)60676-1/pdf](https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(10)60676-1/pdf). Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>12</sup> ILACQUA, A. *et al.* Lifestyle and fertility: influence of stress and quality of life on male fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s. l.], v. 16, n. 115, p. 1-11, nov. 2018. DOI: 10.1186/s12958-018-0436-9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12958-018-0436-9>. Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>13</sup> MOUSTAFA, M. *et al.* Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 129-138, jan. 2004. DOI: 10.1093/humrep/deh024. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article-abstract/19/1/129/690102?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>14</sup> ZINI, A. *et al.* Sperm DNA damage is associated with increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 2663-2668, dez. 2008. DOI: 10.1093/humrep/den321. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article-abstract/23/12/2663/613426?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 9 fev. 2026.

- <sup>15</sup> GRECO, E. *et al.* Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 226-230, jan. 2005. DOI: 10.1093/humrep/deh590. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article-abstract/20/1/226/671628?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>16</sup> MEHTA, A. *et al.* Higher pregnancy rates using testicular sperm in men with severe oligospermia. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 104, n. 6, p.1382-1387, dez. 2015. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.08.008. Disponível em: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(15\)01762-8/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(15)01762-8/fulltext). Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>17</sup> ESTEVES, S. C. *et al.* Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing ICSI with ejaculated and testicular sperm. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 104, n. 6, p. 1398-1405, dez. 2015. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.08.028. Disponível em: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(15\)01874-9/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(15)01874-9/fulltext). Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>18</sup> MURATORI, M. *et al.* Investigation on the origin of sperm DNA fragmentation: role of apoptosis, immaturity and oxidative stress. **Molecular Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 109-122, jan. 2015. DOI: 10.2119/molmed.2014.00158. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.2119/molmed.2014.00158>. Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>19</sup> HAMADA, A.; ESTEVES, S. C.; AGARWAL, A. Insight into oxidative stress in varicocele-associated infertility: part 2. **Nature Reviews Urology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 26-37, 2013. DOI: 10.1038/nrurol.2012.198. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrurol.2012.198>. Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>20</sup> BANKS, S. *et al.* Impact of mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. **Reproduction**, [s. l.], v. 129, n. 4, p. 505-514, abr. 2005. DOI: 10.1530/rep.1.00531. Disponível em: <https://academic.oup.com/reproduction/article/129/4/505/8252153?login=false>. Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>21</sup> SOTOLONGO, B. *et al.* An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 272-280, mar./abr. 2005. DOI: 10.1002/j.1939-4640.2005.tb01095.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.1939-4640.2005.tb01095.x>. Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>22</sup> JING, M. *et al.* Cost-effectiveness analysis of GnRH agonist long protocol and antagonist protocol for IVF. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 8732, p. 1-8, maio 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-65558-0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-65558-0>. Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>23</sup> HAMEED, H. N.; OZTURK, O. O. Testicular versus epididymal spermatozoa in intracytoplasmic sperm injection treatment cycles. **Journal of Ayub Medical College Abbottabad**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 159-163, out./dez. 2010.

<sup>24</sup> O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Mitochondrial DNA deletions and nuclear DNA fragmentation in testicular and epididymal sperm. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 1565-1570, jun. 2002. DOI: 10.1093/humrep/17.6.1565. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article-abstract/17/6/1565/2919217?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>25</sup> SCHULZ, K. F.; ALTMAN, D. G.; MOHER, D. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for randomized trials. **BMJ**, [s. l.], v. 340, 1-13, mar. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.c332>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20332509/>. Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>26</sup> FERRARETTI, A. P. *et al.* ESHRE consensus on the definition of poor ovarian response: the Bologna criteria **Human Reproduction**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 1616-1624, jul. 2011. DOI: 10.1093/humrep/der092. Disponível em: [https://academic.oup.com/humrep/article/26/7/1616/2913872?login=false#google\\_vignette](https://academic.oup.com/humrep/article/26/7/1616/2913872?login=false#google_vignette). Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>27</sup> CCRB. **Simon's Randomized Phase II Design**. 1985. Disponível em: <https://www2.ccrb.cuhk.edu.hk/stat/phase2/Randomized.htm#2>. Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>28</sup> SIMON, R.; WITTES, R. E.; ELLENBERG, S. S. Randomized phase II clinical trials. **Cancer Treatment Reports**, [s. l.], v. 69, n. 12, p. 1375-1381, dez. 1985.

<sup>29</sup> BITNOS. **Randomization.com**. [2025]. Disponível em: <https://www.bitnos.com/info/randomization-com>. Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>30</sup> KIM, J.; SHIN, W. How to do random allocation (randomization). **Clinics in Orthopedic Surgery**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 103-109, mar. 2014. DOI: 10.4055/cios.2014.6.1.103. Disponível em: <https://eios.org/DOIx.php?id=10.4055/cios.2014.6.1.103>. Acesso em: 9 fev. 2026.

- <sup>31</sup> THE UNIVERSAL Trial Number (UTN). **OMS**, [s. l.], 2026. Disponível em: [https://www.who.int/clinical-trials-registry-platform/unambiguous-trial-identification/the-universal-trial-number-\(utn\)](https://www.who.int/clinical-trials-registry-platform/unambiguous-trial-identification/the-universal-trial-number-(utn)). Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>32</sup> PABUCCU, E. G. *et al.* Testicular versus ejaculated spermatozoa in ICSI cycles of normozoospermic men with high sperm DNA fragmentation and previous ART failures. **Andrologia**, [s. l.], v. 49, n. 2, e12609, mar. 2017. DOI: 10.1111/and.12609. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.12609>. Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>33</sup> MOSKOVTSSEV, S. I. *et al.* Testicular spermatozoa have lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa in patients with unsuccessful oral antioxidant treatment. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 1142-1146, mar. 2010. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.11.005. Disponível em: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(08\)04551-2/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(08)04551-2/fulltext). Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>34</sup> ABHYANKAR, N.; KATHRINS, M.; NIEDERBERGER, C. Use of testicular vs ejaculated sperm for ICSI among men with cryptozoospermia: a meta-analysis. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 105, n. 6, p. 1469-1475, jun. 2016. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.02.013. Disponível em: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(16\)00097-2/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(16)00097-2/fulltext). Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>35</sup> ESTEVES, S. C. *et al.* Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. **Andrologia**, [s. l.], v. 53, n. 2, e13874, mar. 2021. DOI: 10.1111/and.13874. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.13874>. Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>36</sup> ROBINSON, L. *et al.* The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 2908-2917, out. 2012. DOI: 10.1093/humrep/des261. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article-abstract/27/10/2908/749072?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 9 fev. 2026.
- <sup>37</sup> ALHARBI, M. *et al.* Use of testicular sperm in couples with SCSA-defined high sperm DNA fragmentation and failed intracytoplasmic sperm injection using ejaculated sperm. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 348-353, jul./ago. 2020. DOI: 10.4103/aja.aja\_99\_19. Disponível em: [https://journals.lww.com/ajandrology/fulltext/2020/22040/use\\_of\\_testicular\\_](https://journals.lww.com/ajandrology/fulltext/2020/22040/use_of_testicular_)

sperm\_in\_couples\_with.3.aspx. Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>38</sup> ARAFA, M. *et al.* ICSI outcome in patients with high DNA fragmentation: Testicular versus ejaculated spermatozoa. **Andrologia**, [s. l.], v. 50, n. 1, e12835, 2018. DOI: 10.1111/and.12835. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.12835>. Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>39</sup> MESEGUER, M. *et al.* Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 124-128, jan. 2011. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.05.055. Disponível em: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(10\)00927-1/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(10)00927-1/fulltext). Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>40</sup> WYROBEK, A. J. *et al.* Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, São Francisco, CA, v. 103, n. 25, p. 9601-9606, abr. 2006. DOI: 10.1073/pnas.0506468103. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0506468103>. Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>41</sup> JIN, J. *et al.* Effect of sperm DNA fragmentation on the clinical outcomes for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in women with different ovarian reserves. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 103, n. 4, p. 910-916, 2015. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.01.014. Disponível em: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(15\)00052-7/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(15)00052-7/fulltext). Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>42</sup> GOSÁLVEZ, J. *et al.* Unpacking the mysteries of sperm DNA fragmentation: ten frequently asked questions. **Journal of Reproductive Biotechnology and Fertility**, [s. l.], v. 4, p. 2058915815594454, ago. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1177/2058915815594454>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2058915815594454>. Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>43</sup> SALEH, R. A. *et al.* Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 313-318, ago. 2002. DOI: 10.1016/s0015-0282(02)03219-3. Disponível em: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(02\)03219-3/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(02)03219-3/fulltext). Acesso em: 9 fev. 2026.

<sup>44</sup> GIWERCMAN, A. *et al.* Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. **International Journal of Andrology**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. e221-e227, jan. 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2009.00995.x. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2605.2009.00995.x>.  
Acesso em: 9 fev. 2026.

## ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

CENTRO DE REFERÊNCIA DA  
SAÚDE DA MULHER - CRSM



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** TRATAMENTO DE INFERTILIDADE CONJUGAL RELACIONADO A DIMINUIÇÃO DA QUANTIDADE E QUALIDADE DOS ESPERMATOZÓIDES

**Pesquisador:** JOAO ROBERTO PALADINO JUNIOR

**Área Temática:** Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):  
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 36417920.0.0000.0069

**Instituição Proponente:** Centro de Referência da Saúde da Mulher

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.247.875

**Apresentação do Projeto:**

Idem ao Parecer Número do Parecer: 4.238.175

**Objetivo da Pesquisa:**

Idem ao Parecer Número do Parecer: 4.238.175

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Idem ao Parecer Número do Parecer: 4.238.175

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

As pendência emitidas no parecer 4.238.175 foram atendidas pelo pesquisador.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

DE acordo com a normatização vigente.

**Recomendações:**

N.D.N.

**Endereço:** Av. Brigadeiro Luiz Antonio, 683

**Bairro:** Bela Vista

**CEP:** 01.317-010

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3248-8087

**Fax:** (11)3248-8080

**E-mail:** dircient@gmail.com



## CENTRO DE REFERÊNCIA DA SAÚDE DA MULHER - CRSM



Continuação do Parecer: 4.247.875

### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma pendência ou inadequação.

### Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado Ad Referendum

### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento                                            | Arquivo                                       | Postagem               | Autor                        | Situação |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1568239.pdf | 27/08/2020<br>13:27:52 |                              | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | Doutorado_projeto_portugues6.docx             | 27/08/2020<br>13:27:03 | JOAO ROBERTO PALADINO JUNIOR | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | termo_consentimento.doc                       | 27/08/2020<br>13:25:19 | JOAO ROBERTO PALADINO JUNIOR | Aceito   |
| Folha de Rosto                                            | Folha_rosto.pdf                               | 07/08/2020<br>10:39:45 | JOAO ROBERTO PALADINO JUNIOR | Aceito   |

### Situação do Parecer:

Aprovado

### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 31 de Agosto de 2020

\_\_\_\_\_  
Assinado por:  
**Roberto Euzebio dos Santos**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Av. Brigadeiro Luiz Antonio, 683

**Bairro:** Bela Vista

**CEP:** 01.317-010

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3248-8087

**Fax:** (11)3248-8080

**E-mail:** dircient@gmail.com