



O DNA ESPERMÁTICO EM FOCO: A FRAGMENTAÇÃO COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA NA ANÁLISE DA FERTILIDADE MASCULINA

SPERM DNA IN FOCUS: FRAGMENTATION AS A DIAGNOSTIC TOOL IN MALE FERTILITY ANALYSIS

EL ADN DEL ESPERMA EN EL PUNTO DE MIRA: LA FRAGMENTACIÓN COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA EN EL ANÁLISIS DE LA FERTILIDAD MASCULINA

Mel Braz Barcellos Cunha¹ ; Lincoln Bastos Farias Junior² ; Amanda Conceição Pimenta Salles³ ; Mariana Duque de Mello⁴ ; Paula Fontoura Coelho de Souza⁵ ; Isabela Resende Pereira⁶ 

¹Graduada em Biomedicina pela Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói - RJ; ²Mestre pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro - RJ; ³Mestre pela Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói - RJ; ⁴Mestre pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro - RJ; ⁵Doutora pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro - RJ; ⁶ Professora Doutora na Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, - RJ.

Autor correspondente: melbrazbiomed@gmail.com

Recebido: 10/10/2025 | Aprovado: 15/01/2026 | Publicado: 16/02/2026

Resumo: A infertilidade conjugal afeta uma parcela significativa da população reprodutiva, sendo atribuída ao fator masculino em aproximadamente 50% dos casos. Houve um aumento nas pesquisas quanto aos exames que podem ser feitos além do espermograma. Os testes complementares para averiguar a qualidade seminal são muitos, neste trabalho, o foco foi o teste de fragmentação do DNA espermático. Esta revisão narrativa de literatura aborda os métodos mais comuns utilizados para medir a fragmentação do DNA, enfatizando a importância de cada um no campo das análises clínicas e da reprodução humana assistida, como: TUNEL, ensaio cometa, teste de dispersão da cromatina espermática (SCD) e ensaio de estrutura da cromatina espermática (SCSA). A busca foi realizada nas bases PubMed, Scielo e Google Acadêmico, considerando publicações entre 2015 e 2025. Os resultados indicam que o TUNEL apresenta alta sensibilidade e pode ser realizado por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência. O Ensaio Cometa, apesar de ser uma técnica detalhada para detecção de diferentes tipos de danos no DNA, requer operadores experientes. O SCD destaca-se pela simplicidade e baixo custo, tornando-se uma opção viável para laboratórios menores. Já o SCSA permite uma análise automatizada de grande volume via citometria de fluxo, sendo amplamente utilizado em centros de reprodução assistida, embora exija equipamentos especializados. Conclui-se que a análise da fragmentação do DNA espermático influencia diretamente a escolha dos tratamentos de reprodução assistida, como fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), além de orientar estratégias para redução do estresse oxidativo e seleção espermática. A implementação desses testes na rotina laboratorial pode melhorar o diagnóstico da infertilidade masculina e personalizar condutas clínicas, otimizando as chances de sucesso dos tratamentos.

Palavras-chave: Análise seminal. Integridade genômica. Infertilidade masculina. Reprodução assistida. Biomarcadores espermáticos.

Abstract: Marital infertility affects a significant portion of the reproductive population, and is attributed to the male factor in approximately 50% of cases. There has been an increase in research into tests that can be performed in addition to the sperm analysis. There are many complementary tests to assess seminal quality; in this study, the focus was on the sperm DNA fragmentation test. This narrative literature review addresses the most common methods used to measure DNA fragmentation, emphasizing the importance of each in the field of clinical analysis and assisted human reproduction, such as: TUNEL, comet assay, sperm chromatin dispersion (SCD) test, and sperm chromatin structure assay (SCSA). The search was conducted in the PubMed, Scielo, and Google Scholar databases, considering publications between 2015 and 2025. The results indicate that TUNEL has high sensitivity and can be performed by flow cytometry or fluorescence microscopy. The Comet Assay, despite being a detailed technique for detecting different types of DNA damage, requires experienced operators. The SCD stands out for its simplicity and low cost, making it a viable option for smaller laboratories. The SCSA allows for automated analysis of large volumes via flow cytometry and is widely used in assisted reproduction centers, although it requires specialized equipment. It is concluded that the analysis of sperm DNA fragmentation directly influences the choice of assisted reproduction treatments, such as *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI), in addition to guiding strategies for reducing oxidative stress and sperm selection.

The implementation of these tests in the laboratory routine can improve the diagnosis of male infertility and personalize clinical approaches, optimizing the chances of treatment success.

Keywords: Seminal analysis. Genomic integrity. Male infertility. Assisted reproduction. Sperm biomarkers.

Resumen: La infertilidad conyugal afecta a una porción importante de la población reproductiva, atribuyéndose al factor masculino en aproximadamente el 50% de los casos. Ha habido un aumento en la investigación sobre pruebas que pueden realizarse además del análisis de esperma. Existen muchas pruebas complementarias para determinar la calidad seminal; En este estudio, la atención se centró en la prueba de fragmentación del ADN del esperma. Esta revisión narrativa de la literatura aborda los métodos más comunes utilizados para medir la fragmentación del ADN, enfatizando la importancia de cada uno en el campo del análisis clínico y la reproducción humana asistida, tales como: TUNEL, ensayo cometa, prueba de dispersión de cromatina espermática (SCD) y ensayo de estructura de la cromatina espermática (SCSA). La búsqueda se realizó en las bases de datos PubMed, Scielo y Google Scholar, considerando publicaciones entre 2015 y 2025. Los resultados indican que TUNEL tiene alta sensibilidad y puede realizarse mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia. El ensayo Comet, a pesar de ser una técnica detallada para detectar diferentes tipos de daños en el DNA, requiere operadores experimentados. El SCD destaca por su simplicidad y bajo coste, convirtiéndolo en una opción viable para laboratorios más pequeños. SCSA permite el análisis automatizado de grandes volúmenes mediante citometría de flujo y es ampliamente utilizado en centros de reproducción asistida, aunque requiere equipos especializados. Se concluye que el análisis de la fragmentación del ADN espermático influye directamente en la elección de tratamientos de reproducción asistida, como la fecundación in vitro (FIV) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), además de orientar estrategias de reducción del estrés oxidativo y selección espermática. La implementación de estas pruebas en la práctica rutinaria de laboratorio puede mejorar el diagnóstico de la infertilidad masculina y personalizar los enfoques clínicos, optimizando las posibilidades de éxito de los tratamientos.

Palabras-clave: Análisis seminal. Integridad genómica. Infertilidad masculina. Reproducción asistida. Biomarcadores espermáticos.

1 INTRODUÇÃO

A infertilidade masculina é responsável por aproximadamente 50% dos casos de infertilidade conjugal, sendo influenciada por fatores genéticos, ambientais, infecciosos e comportamentais (Agarwal *et al.*, 2021; Choy & Eisenberg, 2018; Sharma *et al.*, 2020). Apesar do espermograma ser amplamente utilizado como exame padrão na avaliação seminal, ele apresenta limitações importantes, pois não contempla aspectos moleculares cruciais, como a integridade do DNA espermático (Agarwal *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, a fragmentação do DNA espermático tem ganhado destaque como biomarcador promissor na avaliação da fertilidade masculina. Estudos demonstram que altos níveis de fragmentação estão associados a falhas na fertilização, desenvolvimento embrionário comprometido, aumento nas taxas de abortamento e redução das chances de nascidos vivos (Esteves *et al.*, 2015; Agarwal, Cho & Esteves, 2016). Essa abordagem molecular permite uma análise mais precisa da qualidade espermática, especialmente em casos de infertilidade idiopática, quando os parâmetros seminais estão dentro dos padrões considerados normais pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Baskaran *et al.*, 2019).

A crescente demanda por diagnósticos mais sensíveis e personalizados impulsionou o desenvolvimento de técnicas laboratoriais capazes de mensurar a fragmentação do DNA espermático. Entre os principais métodos disponíveis destacam-se o TUNEL, o Ensaio Cometa, o Teste de Dispersão da Cromatina Espermática (SCD) e o Ensaio de Estrutura da Cromatina Espermática (SCSA), cada um com características específicas, vantagens e limitações.

Diante desse cenário, este estudo tem como objetivo revisar criticamente as principais metodologias utilizadas na avaliação da fragmentação do DNA espermático, discutindo sua aplicabilidade clínica, relevância diagnóstica e impacto na escolha de estratégias terapêuticas em reprodução assistida.

2 METODOLOGIA

Este estudo trata-se de uma revisão narrativa da literatura, conduzida com base nas diretrizes metodológicas propostas por Ferrari (2015) e Rother (2007), que orientam revisões narrativas em saúde. Embora não siga um protocolo sistemático formal, foram adotados critérios de busca, seleção e análise que conferem maior rigor e transparência ao processo.

A busca bibliográfica foi realizada nas bases PubMed e SciELO, entre janeiro de 2015 e maio de 2025. O Google Acadêmico foi utilizado apenas como ferramenta complementar para rastrear referências secundárias e localizar manuais técnicos, não sendo considerado fonte primária de dados científicos. Foram utilizados descritores em inglês, como *male infertility*, *semen analysis*, *DNA fragmentation*, *sperm quality*, combinados com operadores booleanos (“and”, “or”, “not”) para refinar os resultados. Exemplos de combinações utilizadas incluem: “male infertility” and “DNA fragmentation”; “sperm chromatin” and “TUNEL” or “Comet assay”; “semen analysis” and “SCSA” not “animal model”.

Durante a busca nas bases PubMed e SciELO, foram inicialmente identificados 280 artigos relacionados ao tema. Após a remoção de duplicatas e triagem por título e resumo, 80 estudos foram selecionados para leitura completa. Destes, 35 artigos atenderam aos critérios de inclusão e foram utilizados na análise final.

Além da literatura científica, foram consultados manuais técnicos e materiais informativos de fabricantes especializados, como Intermedical IVF, Halotech e SCSA Diagnostics. Essas fontes foram utilizadas com caráter complementar, com o intuito de obter dados técnicos sobre desempenho, sensibilidade e aplicabilidade dos kits comerciais, sem comprometer o rigor científico da revisão.

Foram incluídos na análise estudos originais e de revisão que apresentavam dados clínicos ou laboratoriais relevantes para os objetivos da pesquisa, desde que apresentassem delineamento metodológico claro e compatível com a análise pretendida. Estudos com ausência de dados essenciais ou sem clareza metodológica foram excluídos da análise. Os artigos selecionados abordavam diretamente a aplicação clínica dos métodos TUNEL, Ensaio Cometa, SCD ou SCSA, e apresentavam análise estatística adequada, com uso de testes validados, valores de significância (p-valor) e intervalos de confiança. Modelos animais sem translacionalidade comprovada para a biologia reprodutiva humana, espécies não mamíferas não foram consideradas. Além disso, editoriais sem base científica e publicações com viés comercial explícito, como aquelas patrocinadas exclusivamente por fabricantes e sem revisão por pares, foram excluídas da análise. Foram levados em consideração artigos em inglês.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Tunel

A técnica de TUNEL, que em português significa marcação da extremidade de corte da desoxinucleotidil transferase terminal dUTP, é uma técnica utilizada para detectar fragmentação do DNA espermático através da marcação de quebras na fita de DNA. Ele se baseia na ação da enzima Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT), que adiciona nucleotídeos fluorescentes ou marcados enzimaticamente nos pontos de quebra da cadeia de DNA (Moore *et al.*, 2021). O TdT catalisa a adição de nucleotídeos marcados nas extremidades livres do DNA fragmentado, permitindo sua visualização por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo e não há diferença significativa entre essas duas formas (Chatzimeletiou *et al.*, 2023). A TdT interage com um dUTP fluorescente como o FITC (coloração verde, mas pode ser utilizado outro tipo de corante também) para conectar uma uridina ao terminal 3'-hidroxila (3'OH) em desacoplamentos de DNA. O corante 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) em azul, se liga às ligações de fita dupla, servindo de contraponto (Moore *et al.*, 2021). A análise por fluorescência depende de um observador treinado e pode haver variação entre os observadores, como no ensaio cometa e SCD; já a de citometria de fluxo tem os mesmos prós e contras de SCSA. Um estudo publicado na revista Medicina comparou a eficiência e sensibilidade do TUNEL com a citometria de fluxo e outros métodos de avaliação da fragmentação do DNA espermático. Os pesquisadores concluíram que o TUNEL é altamente preciso na detecção direta de quebras no DNA, enquanto técnicas como SCSA e SCD avaliam danos com base em alterações na estrutura da cromatina (Chatzimeletiou *et al.*, 2023). A utilização de citometria de fluxo para identificar espermatozoides com fragmentação de DNA através do TUNEL é vista como uma técnica de alta confiabilidade, uma vez que possibilita a medição automatizada e rápida de um grande volume de espermatozoides (Grèze *et al.*, 2019). Tanto o SCSA quanto o TUNEL por citometria de fluxo apresentam resultados semelhantes, então caso o laboratório deseje um método por citometria de fluxo, os dois são boas escolhas (Paria Behdarvandian *et al.*, 2023). Como mostrado no estudo de Arifulin *et al.* (2017), a citometria de imagem foi comprovada como uma técnica eficaz, rápida e sensível para medir a fragmentação do DNA em espermatozoides através do método TUNEL. Devido à sua replicabilidade e capacidade de automação, é vista como propícia para aplicação em contexto clínico.

Vantagens: 1) O TUNEL é classificado como um método direto de detecção de quebras na fita de DNA, o que pode fornecer uma estimativa mais acurada da integridade genômica dos espermatozoides; Analisa uma grande quantidade de espermatozoides de uma vez (Grèze *et al.*, 2019). 2) Detecta fragmentações em espermatozoides viáveis, sendo assim mais representativo dos danos com impacto potencial na fertilização e desenvolvimento embrionário. 3) Quando acoplado a citometria de fluxo, o TUNEL permite exclusão de interferentes, como corpos apoptóticos, e distinção entre subpopulações celulares, aumentando a precisão da medição da fragmentação espermática (Ragosta *et al.*, 2024). 4) Pode ser realizado em poucos espermatozoides, inclusive em amostras frescas ou congeladas, o que o torna viável para casos de baixa contagem espermática (Marinero & Schlegel, 2023).

Limitações: 1) O ensaio TUNEL exige infraestrutura, tempo e capacitação técnica superiores aos métodos mais simples, como o SCD. 2) Pequenas diferenças nos protocolos como por exemplo, permeabilização celular, tipo de detecção e preparo da amostra, podem afetar significativamente os resultados, limitando a comparabilidade interlaboratorial. 3) A interpretação dos resultados pode ser influenciada pela subjetividade do operador quando

realizada por microscopia e haverá um número limitado de células analisadas (Ragosta *et al.*, 2024). 4) Requer microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo, restringindo sua aplicação em laboratórios com infraestrutura limitada, além de ser muito custoso (Marinero & Schlegel, 2023).

3.2 Ensaio Cometa

Técnica eletroforética que avalia diretamente danos no DNA por migração de fragmentos em gel (Gajski *et al.*, 2019; Simon *et al.*, 2016). É um método sensível que pode ser realizado mesmo em pacientes com contagens de espermatozoides muito baixas, no entanto, precisa de um observador experiente e pode haver variabilidade na análise entre os observadores, tornando sua interpretação subjetiva (Cho *et al.*, 2017). O método é capaz de identificar tanto rupturas nas fitas de DNA quanto regiões alcalino-lábeis, detectando danos em uma faixa que pode variar de algumas centenas até milhares de quebras por célula. Essa variação cobre desde níveis baixos de dano endógeno, comuns em células saudáveis, até níveis mais elevados que, apesar de expressivos, ainda não comprometem a viabilidade celular (Langie *et al.*, 2015). Em comparação ao teste TUNEL, o ensaio cometa oferece uma avaliação mais detalhada sobre a magnitude e diversidade dos danos ao DNA (Pastuszek *et al.*, 2017). A formação visual dos cometas é porque a lise desloca as histonas, enquanto o DNA continua conectado à matriz celular, bem enrolado. Em espermatozoides o DNA é enovelado com protaminas e não com histonas, por isso, o protocolo de ensaio cometa em espermatozoides é adaptado a esse caso. A proteção da informação genética através da condensação do DNA do espermatozoide por meio de proteínas facilita a transferência de material genético intacto para o embrião futuro. Isso é de grande importância, já que a danificação do DNA do espermatozoide foi sugerida como uma alteração significativa que pode estar por trás da falha na fertilização, do desenvolvimento insatisfatório do embrião, do aborto espontâneo e da geração de filhos não saudáveis. As quebras do DNA desafrouxam o superenrolamento e ocasionam a extensão das alças de DNA na eletroforese, fazendo assim a cauda de cometa (Gajski *et al.*, 2021). A versão alcalina detecta rupturas de fita simples e dupla, com alta sensibilidade mesmo em amostras de baixa concentração (Bivehed *et al.*, 2023; Pastuszek *et al.*, 2017). A versão do ensaio cometa neutro mantém o pH em condições fisiológicas, permitindo a detecção específica de quebras de fita dupla. Alterações nos resultados deste ensaio podem estar associadas à falha na implantação embrionária, pois as quebras de fita dupla representam danos genômicos severos (Javed *et al.*, 2019).

Vantagens: 1) Detecta diversos tipos de lesões no DNA, incluindo quebras de fita simples, dupla, bases alteradas e danos em regiões compactadas por protaminas. 2) Permite avaliar individualmente cada espermatozoide, o que gera resultados mais precisos e possibilita a detecção de heterogeneidade celular. 3) Resultados confiáveis e reprodutíveis podem ser obtidos com apenas 50 espermatozoides analisados. 4) Comparado a outras técnicas de fragmentação, o Ensaio Cometa é simples e barato de se fazer. 5) Ensaios repetidos demonstraram baixa variabilidade intraensaio, o que reforça sua confiabilidade analítica. 6) Avanços tecnológicos têm permitido a automação da análise do ensaio Cometa, elevando sua aplicabilidade em larga escala, com aumento de mais de 90% na velocidade de análise (Bach & Schlegel, 2016).

Limitações: 1) A leitura manual é demorada e de baixa produtividade, mesmo em sistemas semi automatizados. 2) Requer microscopia de fluorescência e infraestrutura laboratorial compatível, o que pode limitar sua implementação em centros com poucos recursos (Bach & Schlegel, 2016).

3.2 SCD

O teste de dispersão de cromatina espermática (SCD) ou ensaio de halo é um tipo de teste de fragmentação que pode ser realizado a partir de kits disponíveis no mercado, de baixo custo e simples, podendo ser implementado em pequenos e médios laboratórios. Esse método baseia-se na capacidade dos espermatozoides de formar halos de dispersão de cromatina após serem submetidos a um processo de lise celular. Quanto menor o halo formado, maior a fragmentação do DNA. (Rochdi *et al.*, 2024; Halotech, 2023). Isso acontece porque a protamina, presente em núcleos de espermatozoides, é lisada durante a desproteinização, criando um halo nas fitas de DNA obtidas através da reação com ácido e detergente do teste, quando o DNA encontra-se preservado (Okubo *et al.*, 2023). Segundo um estudo de Grèze *et al.* (2019), o teste SCD apresenta uma alta concordância em relação ao TUNEL, sendo visto como um excelente teste para aplicação no laboratório. Contudo, o SCD costuma subestimar levemente os danos no DNA quando comparado ao TUNEL.

Vantagens: 1) Técnica relativamente simples, sem necessidade de equipamentos complexos, como citometria de fluxo, e pode ser realizada com microscopia óptica convencional, é rápida de ser feita. 2) Existem kits comerciais disponíveis que padronizam o protocolo, facilitando sua implementação em clínicas de reprodução assistida (Rochdi *et al.*, 2024; Halotech, 2023). 3) Estudos encontraram correlação entre os resultados obtidos pelo SCD e pelo ensaio TUNEL, sugerindo que o SCD é um bom teste, embora com sensibilidade um pouco menor (Grèze *et al.*, 2019; Ragosta *et al.*, 2024).

Limitações: 1) O SCD não detecta quebras diretamente, mas sim a suscetibilidade à desnaturação ácida da cromatina, o que o torna menos preciso que métodos diretos, como o TUNEL. 2) Pode detectar predominantemente fragmentação em espermatozoides inviáveis, subestimando a presença de danos em células viáveis, o que pode limitar sua utilidade clínica (Ragosta *et al.*, 2024). 3) Pacientes com valores de fragmentação intermediários (20%–29%) apresentaram maior variação nos resultados entre testes pareados, sugerindo que esses casos requerem repetição da análise antes de qualquer decisão clínica. 4) Por ser um método manual baseado na observação do halo de dispersão de cromatina, o SCD pode ser influenciado pela subjetividade do avaliador, especialmente em casos limítrofes (Esteves *et al.*, 2021).

3.3 SCSA

O ensaio de estrutura da cromatina espermática, do inglês *Sperm Chromatin Structure Assay*, foi aprimorado para oferecer informações quantitativas e altamente reprodutíveis sobre a fragmentação do DNA em espermatozóides, empregando como tecnologia base a citometria de fluxo. É uma das técnicas mais frequentemente empregadas para verificar a qualidade do DNA espermático, em especial em ambientes clínicos e laboratoriais de grande porte (Evenson, 2016). Esse ensaio se baseia na susceptibilidade do DNA à desnaturação induzida por calor ou ácido, seguida da análise por citometria de fluxo. O SCSA utiliza a citometria

de fluxo para medir a fragmentação do DNA espermático por meio do corante Acridine Orange. A técnica se baseia na suscetibilidade do DNA à desnaturação em áreas com rupturas ou danos estruturais. O corante se intercala com regiões intactas do DNA de fita dupla, emitindo fluorescência verde, enquanto nas áreas fragmentadas, devido a quebras na cadeia, a fluorescência é vermelha. Assim, a taxa de fragmentação é determinada pela proporção de espermatozoides que apresentam fluorescência vermelha em relação ao total analisado (Brakel *et al.*, 2017; Evenson, 2016; Evenson, 2022).

Vantagens: 1) Como é baseado em citometria de fluxo, reduz o viés de interpretação individual presente em técnicas manuais. 2) A citometria de fluxo permite a análise automatizada de milhares de espermatozoides por segundo, com alta precisão na identificação de células e biomarcadores. 3) A técnica fornece dados quantitativos confiáveis sobre a fragmentação do DNA espermático e é padronizada, sendo amplamente utilizada em ambientes clínicos e laboratoriais de grande porte (Evenson, 2016; Evenson, 2022). 4) A técnica pode ser empregada em diferentes condições de armazenamento seminal, como frescas e congeladas (Marinero & Schlegel, 2023).

Limitações: 1) A técnica exige citômetro de fluxo e infraestrutura técnica avançada, o que eleva o custo e dificulta sua aplicação em laboratórios menos equipados. 2) O método pode ser afetado por falhas de máquina, calibração inadequada e limitações de software de análise. 3) Para uma análise confiável, o SCSA demanda uma concentração mínima de espermatozoides, entre $1-2 \times 10^6$ / ml. Em casos de oligospermia severa, onde a contagem espermática é inferior a 500.000 espermatozoides por ml, a contagem pode ser inconclusiva (SCSA Diagnostics, 2025). O valor do exame é alto, o que pode limitar seu público e sua adesão (Marinero & Schlegel, 2023).

3.5 Relevância Clínica e Escolha da Técnica

A análise da fragmentação do DNA espermático (SDF) tem se consolidado como ferramenta diagnóstica complementar essencial na avaliação da fertilidade masculina, especialmente em casos de infertilidade idiopática, falhas recorrentes em reprodução assistida e abortos espontâneos. Níveis elevados de SDF estão associados à redução da taxa de fertilização, formação de blastocistos de baixa qualidade, maior risco de aborto e até baixo peso ao nascer em recém-nascidos gerados por Fertilização *In Vitro* (FIV) (Colaco & Sakkas, 2018; Marinero & Schlegel, 2023).

Cada técnica de avaliação da SDF apresenta vantagens e limitações que devem ser consideradas conforme o perfil clínico do paciente, os recursos laboratoriais disponíveis e o objetivo terapêutico. O teste TUNEL é considerado o mais sensível, pois detecta diretamente quebras de fita simples e dupla, sendo ideal para casos complexos, como falhas recorrentes em FIV ou suspeita de infertilidade por estresse oxidativo. No entanto, sua aplicação exige infraestrutura avançada e padronização rigorosa, já que pequenas variações técnicas podem afetar os resultados (Chatzimeletiou *et al.*, 2023; Moore *et al.*, 2021;).

O ensaio SCSA, por sua vez, apresenta alta reprodutibilidade e padronização, sendo amplamente utilizado em centros especializados. Ele permite a quantificação do índice de fragmentação (DFI) por citometria

de fluxo e pode ser aplicado em amostras frescas ou congeladas, sendo útil em triagens populacionais ou estudos longitudinais (Evenson, 2016; Evenson, 2022).

O teste SCD, embora menos sensível, é uma opção viável para triagem inicial em clínicas com menor infraestrutura. Estudos demonstram boa correlação com o TUNEL, mas o SCD tende a subestimar os danos em espermatozoides viáveis, o que pode comprometer a tomada de decisão clínica em casos limítrofes (Grèze *et al.*, 2019; Ragosta *et al.*, 2024). Essa menor sensibilidade ocorre porque o método depende da formação de halos de dispersão, que são menos evidentes em células com danos sutis ou em espermatozoides metabolicamente ativos. Portanto, embora o SCD seja útil como triagem, o TUNEL é mais indicado para avaliações precisas e decisões clínicas críticas.

O Ensaio Cometa destaca-se pela capacidade de detectar diversos tipos de lesões, incluindo danos em regiões compactadas por protaminas. É útil para avaliar a heterogeneidade celular e pode ser aplicado mesmo em amostras com baixa contagem espermática, sendo considerado versátil e de baixo custo (Gajski *et al.*, 2021; Pastuszek *et al.*, 2017).

A escolha da técnica pode impactar diretamente a conduta terapêutica. Pacientes com DFI elevado podem se beneficiar de estratégias como extração de espermatozoides testiculares, suplementação antioxidante ou seleção espermática por microfluídica (Meseguer *et al.*, 2024; Pardiñas *et al.*, 2025). Em ciclos de FIV e ICSI, a análise da integridade genética pode ser decisiva para o sucesso do tratamento, influenciando a escolha do protocolo, o tipo de espermatozoide utilizado e o momento da fertilização (Esteves *et al.*, 2015; Simon *et al.*, 2016).

As diretrizes da American Urological Association (AUA) e da European Association of Urology (EAU) reconhecem a importância da SDF na avaliação da infertilidade masculina, recomendando sua inclusão como exame complementar em casos selecionados (Cho *et al.*, 2017). Avanços tecnológicos, como inteligência artificial aplicada à morfologia espermática e sistemas automatizados de análise, apontam para um futuro promissor na medicina reprodutiva, com maior padronização, precisão diagnóstica e acessibilidade (Noy *et al.*, 2022; Mccallum *et al.*, 2019).

Quadro 1 - Comparação entre técnicas de fragmentação do DNA espermático.

Critérios	Ensaio Cometa	SCD	SCSA	TUNEL
Tipos de detecção	Direta	Indireta	Indireta	Direta
Equipamento necessário	Microscópio de fluorescência	Microscópio	Citômetro de fluxo	Citômetro de fluxo ou microscopia de fluorescência
Requisitos de amostra	Pode ser aplicado em poucas células	200 células por análise é o ideal	Idealmente de 1-2 x 10 ⁶ /ml	Pode ser usada em baixa concentração

Sensibilidade	Alta	Alta a moderada	Alta	Alta e a mais sensível
Especialidade	Moderada	Moderada	Alta a moderada	Alta
Vantagens principais	Alta sensibilidade, detecta diferentes tipos de danos, baixo custo e permite análise individual de espermatozoides	Simple, mais acessível, fácil de implementar, precisa apenas de microscópio óptico e boa correlação com TUNEL em alguns estudos	Alta reprodutibilidade e análise automatizada de milhares de espermatozoides	Detecta quebras reais, pode ser aplicado com alta precisão via citometria e útil mesmo em oligospermia
Limitações principais	Subjetividade na leitura e requer microscópio de fluorescência	Subjetividade na leitura e menos preciso que métodos diretos	Exige estrutura avançada, não aplicável em casos de oligospermia grave e custo alto	Suscetível a variações técnicas ou subjetividade na leitura e alto custo

Elaborado pela autora com base nos estudos de Grèze *et al.* (2019), Evenson (2016, 2022), Moore *et al.* (2021), Chatzimeletiou *et al.* (2023), Marinaro & Schlegel (2023), Ragosta *et al.* (2024), Rochdi *et al.* (2024), Esteves *et al.* (2021), Gajski *et al.* (2019), Gajski *et al.*, (2021), Pastuszek *et al.* (2017), Javed *et al.* (2019), Brakel *et al.* (2017) e SCSA Diagnostics (2025).

Perspectivas Futuras: O campo da reprodução assistida tem se beneficiado de avanços tecnológicos que prometem transformar profundamente os métodos de seleção espermática. Entre as inovações mais promissoras está a microfluídica, técnica que simula o ambiente fisiológico das vias genitais femininas, permitindo a seleção de espermatozoides com maior motilidade e integridade funcional. Essa abordagem biomimética tem demonstrado superioridade em relação aos métodos tradicionais, como swim-up e gradiente de densidade, ao favorecer espermatozoides estruturalmente intactos e com menor fragmentação de DNA (Meseguer *et al.*, 2024; Pronúcleo, 2024).

Outra tendência emergente é a aplicação da Inteligência Artificial (IA) na análise espermática. Algoritmos de aprendizado de máquina têm sido utilizados para identificar padrões morfológicos e funcionais em imagens não coradas, permitindo a predição de alterações subcelulares, como a fragmentação do DNA. Essa abordagem automatizada contribui para a padronização dos critérios diagnósticos e para a redução da subjetividade inerente à análise manual. A convergência entre microfluídica, IA e sistemas automatizados aponta para um cenário em que a medicina de precisão será aplicada à reprodução humana. Essa integração permitirá intervenções personalizadas com base no perfil espermático individual, favorecendo melhores taxas de sucesso nos tratamentos e uma compreensão mais aprofundada dos fatores que influenciam a fertilidade masculina (Mccallum *et al.*, 2019; Noy *et al.*, 2022).

Dessa forma, a seleção espermática tende a deixar de ser um processo empírico para se tornar uma prática baseada em evidências, tecnologia e personalização, alinhada às demandas da medicina reprodutiva contemporânea.

4 Conclusão

A fragmentação do DNA espermático representa um parâmetro molecular essencial na avaliação da fertilidade masculina, especialmente em casos de infertilidade inexplicada, falhas recorrentes em técnicas de reprodução assistida e alterações seminais que se apresentam dentro dos padrões considerados normais. Esta revisão sintetizou as principais técnicas utilizadas para mensurar esse parâmetro, destacando seus fundamentos metodológicos, aplicabilidade clínica e implicações diagnósticas.

Embora não haja consenso sobre uma técnica padrão ouro, a escolha do método deve considerar fatores como sensibilidade, complexidade técnica, infraestrutura disponível e custo. O SCD apresenta vantagens como simplicidade e viabilidade em laboratórios com menor estrutura, enquanto o TUNEL e o SCSA oferecem alta sensibilidade e precisão, sendo mais indicados para ambientes especializados. O Ensaio Cometa destaca-se pela sua versatilidade e capacidade de detectar múltiplos tipos de danos ao DNA.

A integração desses testes na rotina laboratorial permite uma abordagem mais personalizada e eficiente na reprodução assistida, aprimorando o diagnóstico da infertilidade masculina e contribuindo para estratégias terapêuticas mais direcionadas, como suplementação antioxidante e seleção espermática baseada na integridade genética.

Além disso, o avanço de tecnologias emergentes, como inteligência artificial, microfluídica e sistemas automatizados, aponta para uma nova era na medicina reprodutiva, marcada pela padronização dos critérios diagnósticos, maior precisão na seleção espermática e ampliação da acessibilidade aos métodos avançados. Essa convergência entre ciência e tecnologia reforça a transição de um modelo empírico para uma prática baseada em evidências, inovação e personalização.

Conflitos de interesses

Os autores declaram que não há conflitos de interesse. Todos os autores estão cientes da submissão do artigo.

Contribuições dos autores

Mel Braz Barcellos Cunha: Responsável pela concepção do estudo, levantamento bibliográfico, redação inicial do manuscrito, revisão crítica dos dados e elaboração da versão final do artigo. Lincoln Bastos Farias Junior: Participou do refinamento metodológico, validação técnica das informações sobre as técnicas laboratoriais e revisão do conteúdo científico da discussão. Amanda Conceição Pimenta Salles: Contribuiu com o desenvolvimento conceitual do trabalho, auxiliando na organização das etapas e no aprimoramento das ideias que fundamentaram o estudo. Mariana Duque de Mello: Contribuiu com o desenvolvimento conceitual do trabalho, auxiliando na organização das etapas e no aprimoramento das ideias que fundamentaram o estudo.

Paula Fontoura Coelho de Souza: Contribuiu com o desenvolvimento conceitual do trabalho, auxiliando na organização das etapas e no aprimoramento das ideias que fundamentaram o estudo. Isabela Resende Pereira: Orientou o desenvolvimento geral do trabalho, supervisionou todas as etapas da redação e revisão, contribuiu

para a estrutura acadêmica e assegurou a consistência científica na versão final.

REFERÊNCIAS

- Agarwal, A., Cho, C.-L., & Esteves, S. (2016). Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Asian Journal of Andrology*, 18(2), 186. <https://doi.org/10.4103/1008-682x.170441>
- Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C.-L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., & Shah, R. (2021). Male Infertility. *The Lancet*, 397(10271), 319–333. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32667-2)
- Agarwal, A., Majzoub, A., Baskaran, S., Panner Selvam, M. K., Cho, C. L., Henkel, R., Finelli, R., Leisegang, K., Sengupta, P., Barbarosic, C., Parekh, N., Alves, M. G., Ko, E., Arafa, M., Tadros, N., Ramasamy, R., Kavoussi, P., Ambar, R., Kuchakulla, M., & Robert, K. A. (2020). Sperm DNA Fragmentation: A New Guideline for Clinicians. *The World Journal of Men's Health*, 38(4), 412–471. <https://doi.org/10.5534/wjmh.200128>
- Arifulin, E. A., Bragina, E. E., Kurilo, L. F., & Sheval, E. V. (2017). High-throughput analysis of TUNEL-stained sperm using image cytometry. *Cytometry Part A*, 91(9), 854–858. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23164>
- Bach, P. V., & Schlegel, P. N. (2016). Sperm DNA damage and its role in IVF and ICSI. *Basic and Clinical Andrology*, 26. <https://doi.org/10.1186/s12610-016-0043-6>
- Baskaran, S., Agarwal, A., Panner Selvam, M. K., Finelli, R., Robert, K. A., Iovine, C., Pushparaj, P. N., Samanta, L., Harlev, A., & Henkel, R. (2019). Tracking research trends and hotspots in sperm DNA fragmentation testing for the evaluation of male infertility: a scientometric analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0550-3>
- Bivehed, E., Hellman, B., Fan, Y., Haglöf, J., & Buratovic, S. (2023). DNA integrity under alkaline conditions: An investigation of factors affecting the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 891, 503680. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2023.503680>
- Brakel, J. van, M. Dinkelman-Smit, de, F., F. W. J. Hazebroek, & Dohle, G. R. (2017). Sperm DNA damage measured by sperm chromatin structure assay in men with a history of undescended testes. *Andrology*, 5(4), 838–843. <https://doi.org/10.1111/andr.12384>
- CANFRAG. *Intermedical IVF*. Recuperado de <<https://intermedicalivf.com.br/produtos/canfrag/>>.
- Chatzimeletiou, K., Fleva, A., Nikolopoulos, T.-T., Markopoulou, M., Glykeria Zervakakou, Papanikolaou, K., Anifandis, G., Gianakou, A., & Grigoris Grimbizis. (2023). Evaluation of Sperm DNA Fragmentation Using Two Different Methods: TUNEL Via Fluorescence Microscopy, and Flow Cytometry. *Medicina-Lithuania*, 59(7), 1313–1313. <https://doi.org/10.3390/medicina59071313>
- Cho, C.-L., Agarwal, A., Majzoub, A., & Esteves, S. C. (2017). Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: concise practice recommendations. *Translational Andrology and Urology*, 6(S4), S366–S373. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.07.28>
- Choy, J. T., & Eisenberg, M. L. (2018). Male infertility as a window to health. *Fertility and Sterility*, 110(5), 810–814. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.08.015>
- Colaco, S., & Sakkas, D. (2018). Paternal factors contributing to embryo quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(11), 1953–1968. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1304-4>
- Esteves, S. C., Sánchez-Martín, F., Sánchez-Martín, P., Schneider, D. T., & Gosálvez, J. (2015). Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. *Fertility and Sterility*, 104(6), 1398–1405. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.028>

Esteves, S. C., López-Fernández, C., Martínez, M. G., Silva, E. A., & Gosálvez, J. (2021). Reliability of the sperm chromatin dispersion assay to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with infertility. *Fertility and Sterility*, 117(1), 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.08.045>

Evenson, D. P. (2022). Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) for Fertility Assessment. *Current Protocols*, 2(8). <https://doi.org/10.1002/cpz1.508>

Evenson, D. P. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*, 169, 56–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017>

Ferrari, R. (2015). Writing narrative style literature reviews. *Medical Writing*, 24(4), 230–235. <https://doi.org/10.1179/2047480615Z.000000000329>

Gajski, G., Gerić, M., Živković Semren, T., Tariba Lovaković, B., Oreščanin, V., & Pizent, A. (2019). Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage from frozen human whole blood samples: Implications for human biomonitoring. *Toxicology Letters*, 319, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.11.010>

Gajski, G., Ravlić, S., Godschalk, R., Collins, A., Dusinska, M., & Brunborg, G. (2021). Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage in mature sperm. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 788, 108398. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108398>

Grèze, C., Guttman, A., Pons-Rejraji, H., Vasson, M.-P., Lornage, J., Ouchchane, L., & Brugnon, F. (2019). Can the SCD test and terminal uridine nick-end labeling by flow cytometry technique (TUNEL/FCM) be used interchangeably to measure sperm DNA damage in routine laboratory practice? *Basic and Clinical Andrology*, 29(1). <https://doi.org/10.1186/s12610-019-0098-2>

Halotech HaloSperm® G2 DNA Fragmentation Test. *Andrology Store*. Recuperado de <<https://andrologystore.com/product/halotech-halosperm-g2-ht-hsg2/>>.

Javed, A., Talkad, M. S., & Ramaiah, M. K. (2019). Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 46(1), 14–21. <https://doi.org/10.5653/cerm.2019.46.1.14>

Langie, S. A. S., Azqueta, A., & Collins, A. R. (2015). The comet assay: past, present, and future. *Frontiers in Genetics*, 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00266>

Marinero, J., & Schlegel, P. N. (2023). Sperm DNA Damage and Its Relevance in Fertility Treatment: A Review of Recent Literature and Current Practice Guidelines. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1446–1446. <https://doi.org/10.3390/ijms24021446>

McCallum, C., Riordon, J., Wang, Y., Tian Fook Kong, Jae Bem You, Sanner, S., Lagunov, A., Hannam, T., Jarvi, K., & Sinton, D. (2019). Deep learning-based selection of human sperm with high DNA integrity. *Communications Biology*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0491-6>

Meseguer, F., Rodríguez, C. G., Egea, R. R., Sisternas, L. C., Remohí, J. A., & Meseguer, M. (2024). Can Microfluidics Improve Sperm Quality? A Prospective Functional Study. *Biomedicines*, 12(5), 1131–1131. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12051131>

Moore, C. L., Savenka, A. V., & Basnakian, A. G. (2021). TUNEL Assay: A Powerful Tool for Kidney Injury Evaluation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 412. <https://doi.org/10.3390/ijms22010412>

Noy, L., Barnea, I., Mirsky, S. K., Kamber, D., Levi, M., & Shaked, N. T. (2022). Sperm-cell DNA

fragmentation prediction using label-free quantitative phase imaging and deep learning. *Cytometry Part A*, 103(6), 470–478. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24703>

Okubo, T., Onda, N., Hayashi, T., Kobayashi, T., Omi, K., & Segawa, T. (2023). Performing a sperm DNA fragmentation test in addition to semen examination based on the WHO criteria can be a more accurate diagnosis of IVF outcomes. *BMC Urology*, 23(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12894-023-01257-y>

Pardiñas, M. L., Rivera-Egea, R., Maria de Los Santos, J., Vidal, C., Giles, J., Ortega-Jaen, D., Gil, J., Martín, A., Viloria, T., & Jose de Los Santos, M. (2025). Impact of a microfluidic-based selection device on sperm deoxyribonucleic acid fragmentation and intracytoplasmic sperm injection cycles. *F&S Science*, S2666-335X(25)000424. <https://doi.org/10.1016/j.xfss.2025.05.002>

Paria Behdarvandian, Nasr-Esfahani, A., Marziyeh Tavalae, Kosar Pashaei, Naderi, N., Zahra Darmishonnejad, Eduardo, J., R. John Aitken, Parviz Gharagozloo, Drevet, J. R., & Mohammad Hossein Nasr-Esfahani. (2023). Sperm chromatin structure assay (SCSA®) and flow cytometry-assisted TUNEL assay provide a concordant assessment of sperm DNA fragmentation as a function of age in a large cohort of approximately 10,000 patients. *Basic and Clinical Andrology*, 33(1). <https://doi.org/10.1186/s12610-023-00208-9>

Pastuszek, E., Kiewisz, J., Skowronska, P., Liss, J., Lukaszuk, M., Bruszczyńska, A., Jakiel, G., & Lukaszuk, K. (2017). An investigation of the potential effect of sperm nuclear vacuoles in human spermatozoa on DNA fragmentation using a neutral and alkaline Comet assay. *Andrology*, 5(2), 392–398. <https://doi.org/10.1111/andr.12324>

Seleção Espermática por Microfluídica. PRONÚCLEO. Recuperado em <https://pronucleo.com.br>.

Ragosta, E. M., Traini, G., Tamburrino, L., Degl'Innocenti, S., Maria Grazia Fino, Dabizzi, S., Vignozzi, L., Baldi, E., & Marchiani, S. (2024). Sperm Chromatin Dispersion Test Detects Sperm DNA Fragmentation Mainly Associated with Unviable Spermatozoa and Underestimates the Values with Respect to TUNEL Assay. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8), 4481–4481. <https://doi.org/10.3390/ijms25084481>

Rochdi, Larbi Allai, Ibtissam Bellajdel, Taheri, H., Saadi, H., Mimouni, A., & Choukri, M. (2024). Evaluation of Sperm DNA Fragmentation Using Halosperm Technique after the Freezing–Thawing Process in Men: A Study on the Validation of the SCD Protocol. *JOURNAL of REPRODUCTION and INFERTILITY*. <https://doi.org/10.18502/jri.v25i1.15194>

Rother, E. T. (2007). Systematic Literature Review X Narrative Review. *Acta Paulista de Enfermagem*, 20(2), v–vi. <https://www.scielo.br/j/ape/a/z7zZ4Z4GwYV6FR7S9FHTByr/?lang=en>
SCSA Diagnostics (2025). Recuperado de <https://www.scsadiagnostics.com/>

Sharma, A., Minhas, S., Dhillon, W. S., & Jayasena, C. N. (2020). Male infertility due to testicular disorders. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 106(2), e442–e459. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa781>

Simon, L., Zini, A., Dyachenko, A., Ciampi, A., & Carrell, D. (2016). A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on IVF and ICSI outcome. *Asian Journal of Andrology*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.4103/1008-682x.182822>

Simon, L., Aston, K. I., Emery, B. R., Hotaling, J., & Carrell, D. T. (2016). Sperm DNA damage output parameters measured by the alkaline Comet assay and their importance. *Andrologia*, 49(2), e12608. <https://doi.org/10.1111/and.12608>