

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

DETERMINAÇÃO DO MELHOR PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO PRÉ-
CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL NA CLÍNICA DE REPRODUÇÃO HUMANA VIDA

CAROLINE LAURITZEN DA COSTA FERREIRA

RIO DE JANEIRO

2019

CAROLINE LAURITZEN DA COSTA FERREIRA

DETERMINAÇÃO DO MELHOR PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO PRÉ-
CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL NA CLÍNICA DE REPRODUÇÃO HUMANA VIDA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Mestrado Profissional em Pesquisa
Biomédica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas
Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Reprodução Assistida

Orientador: Prof^o. Dr. Marcel Frajblat

RIO DE JANEIRO

2019

Ficha Catalográfica

Ferreira, Caroline Lauritzen da Costa.

Determinação do melhor protocolo de processamento pré-criopreservação seminal na clínica de reprodução humana Vida. / Caroline Lauritzen da Costa Ferreira. – Rio de Janeiro:Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

56 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Marcel Frajblat.

Dissertação (mestrado profissional) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional Formação para a Pesquisa Biomédica, 2019.

Referências: f.47-56.

1. Criopreservação- métodos. 2. Preservação do Sêmen. 3. Técnicas de Reprodução Assistida. 4. Fertilização- fisiologia. 5. Centrifugação com Gradiente de Concentração. 6. Pesquisa Biomédica. - Tese. I. Frajblat, Marcel. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional Formação para a Pesquisa Biomédica. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela minha vida e por todas as realizações alcançadas até o momento.

À minha mãe, Suzana, pelo amor incondicional e pelo apoio incomparável. Obrigada por sempre acreditar em mim e ser minha inspiração.

À minha irmã, Jéssica, pelo amor, carinho e todo cuidado que sempre teve comigo.

Ao meu marido, Diego, pelo amor e todo apoio e compreensão dados durante a execução desse trabalho e na vida.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, por ter sido minha escola e contribuído tanto para minha formação acadêmica quanto pessoal.

Ao meu orientador, Marcel, por todos os conselhos, incentivos e apoio na realização do mestrado.

À equipe do laboratório da clínica Vida, por toda ajuda prestada na execução deste estudo e, em especial, ao amigo Caio, que possibilitou a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos da vida, que de alguma forma carregaram comigo o peso da realização do mestrado e tornaram as angústias mais leves. Em especial, a querida amiga Ludmila, que sempre me apoiou na vida pessoal e acadêmica.

RESUMO

Ferreira, Caroline Lauritzen da Costa. **Determinação do melhor protocolo de criopreservação seminal na Clínica de reprodução humana Vida**. 2019. 57 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Introdução: A infertilidade é um problema de saúde pública, que estimulou o desenvolvimento de um ramo da medicina com tecnologia própria para a realização da fertilização a nível laboratorial. A criopreservação de gametas e embriões surgiu paralelamente ao desenvolvimento dessa nova área. Nesse sentido, o congelamento de sêmen se tornou uma importante ferramenta na reprodução assistida, auxiliando milhares de casais a realizar o sonho da concepção. Contudo, apesar de extremamente difundida, a técnica de congelamento de sêmen ainda carece de aperfeiçoamento, visto que as taxas de recuperação de espermatozoides viáveis após o descongelamento permanecem baixas. Neste estudo foi avaliado o efeito de um método de processamento seminal prévio ao congelamento nos parâmetros seminais pós-descongelamento. **Objetivo:** Determinar o melhor protocolo de criopreservação seminal na clínica de reprodução humana “Vida – Centro de Fertilidade” (Vida). **Metodologia:** Amostras de 22 pacientes voluntários da clínica Vida foram utilizadas. Cada amostra foi dividida em dois grupos: grupo Gradiente, em que as amostras foram processadas por gradiente descontínuo de densidade e grupo Controle, em que as amostras foram mantidas brutas, com o plasma seminal. Em seguida, foi realizado o congelamento das amostras dos dois grupos. Após o descongelamento, as amostras foram avaliadas para os seguintes parâmetros: concentração de espermatozoides total, concentração de espermatozoides móveis progressivos e móveis totais, motilidade, vitalidade, morfologia e taxa de recuperação de espermatozoides. **Resultados:** O grupo Gradiente apresentou melhores taxas de motilidade progressiva e total, vitalidade e morfologia em relação ao grupo Controle, após o descongelamento. Contudo, não foram observadas diferenças entre os grupos estudados nas taxas de recuperação de espermatozoides móveis progressivos e totais, e morfologicamente normais, exceto na recuperação de espermatozoides vivos. Para esse quesito, o grupo Controle apresentou maior recuperação que o grupo Gradiente. **Conclusão:** A partir desses dados, concluiu-se que não há como determinar um protocolo padrão de congelamento para todos as amostras. A definição do melhor protocolo

de congelamento seminal pode variar, dentre outros fatores, da técnica de reprodução assistida (IIU, FIV ou ICSI) a ser aplicada como desfecho.

Palavras-chave: criopreservação seminal, gradiente descontínuo de densidade.

ABSTRACT

Ferreira, Caroline Lauritzen da Costa. **Determination of the best semen cryopreservation protocol in the human reproduction Clinic Vida**. 2019. 57 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Introduction: Infertility is a public health problem that has stimulated the development of a branch of medicine with its own technology to perform fertilization at the laboratory level. The cryopreservation of gametes and embryos emerged parallel to the development of this new area. In this sense, freezing of semen has become an important tool in assisted reproduction, helping thousands of couples achieve the dream of conception. However, although extremely widespread, semen freezing technique still lacks improvement, as the rates of recovery of viable spermatozoa after thawing remain low. In this study, the effect of a method of semen processing prior to freezing on post-thawing semen parameters was evaluated. Objective: To determine the best seminal cryopreservation protocol in the human reproduction clinic "Vida - Fertility Center" (Vida). Methodology: Samples of 22 volunteers from the Vida clinic were used. Each sample was divided into two groups: Gradient group, which the samples were processed by density discontinuous gradient and Control group, which the samples were maintained raw, with the seminal plasma. Furthermore, samples of the two groups were frozen. After thawing, samples were evaluated for the following parameters: total sperm concentration, total mobile and progressive mobile sperm concentration, motility, vitality, morphology and sperm recovery rate. Results: Gradient showed better rates of progressive and total motility, vitality and morphology in relation to the Control group after thawing. However, no differences were observed between groups studied in progressive and total mobile sperm recovery rates and morphologically normal sperm recovery rates, except for the recovery of live spermatozoa. For

this criteria, the Control group presented a greater recovery than the Gradient group.
Conclusion: From these data, it was concluded that we could not fix a standard freezing protocol for all samples. The definition of the best seminal freezing protocol may vary, among other factors, from the assisted reproduction technique (IUI, IVF or ICSI) to be applied as an outcome.

Key Words: Semen Cryopreservation, Discontinuous Density Gradient

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do desenho experimental	32
Figura 2: Motilidade Progressiva avaliada ao final do descongelamento das amostras do grupo Controle e Gradiente. Valores representados em Médias e Barras de Desvio-Padrão (%). Valor de significância adotado $p < 0,05$ (*)	36
Figura 3: Comparação da taxa de recuperação de espermatozoides móveis progressivos pós-descongelamento do grupo Controle e do grupo Gradiente, ambos em relação ao Controle Fresco (antes do congelamento). Valores representados em Médias e Barras de Desvio-Padrão. Valor de significância adotado $p < 0,05$ (*).	37
Figura 4: Motilidade total avaliada ao final do descongelamento dos grupos Controle e Gradiente. Valores apresentados em Média e Barra de desvio-padrão. Valor de significância adotado: $p < 0,05$	37
Figura 5: Comparação da taxa de recuperação de espermatozoides móveis totais pós-descongelamento do grupo Controle e do grupo Gradiente, ambos em relação ao Controle Fresco (antes do congelamento). Valores apresentados em médias e barras de desvio-padrão. Valor de significância $p < 0,05$	38
Figura 6: Porcentagem de espermatozoides vivos (Vitalidade) avaliadas ao final do descongelamento nos grupos Controle e Gradiente. Valores apresentados em médias e barras de desvio-padrão. Valor de significância $p < 0,05$	38
Figura 7: Comparação da taxa de recuperação de espermatozoides vivos pós-descongelamento do grupo Controle e do grupo Gradiente, ambos em relação ao Controle Fresco (antes do congelamento). Valores apresentados em médias e barras de desvio-padrão. Valor de significância $p < 0,05$	39

Figura 8: Porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais avaliada após o descongelamento dos grupos Controle e Gradiente. Valores representados em médias e barras de desvio-padrão. Valor de significância $p < 0,05$	39
Figura 9: Porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais do grupo Gradiente após o descongelamento comparada a porcentagem avaliada no grupo Controle fresco, antes do congelamento. Valores representados em médias e barras de desvio-padrão. Valor de significância $p < 0,05$	40
Figura 10: Comparação da taxa de recuperação de espermatozoides morfolologicamente normais pós-descongelamento do grupo Controle e do grupo Gradiente, ambos em relação ao Controle Fresco (antes do congelamento). Valores representados em médias e barras de desvio-padrão. Valor de significância $p < 0,05$	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros seminais pré-congelamento. Valores representados em médias seguidas de desvio-padrão. Foi considerado um valor de significância $p < 0,05$	34
Tabela 2: Parâmetros seminais pós-descongelamento. Valores representados em médias seguidas de desvio-padrão. Valor de significância de $p < 0,05$	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cols – Colaboradores

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

FIV – Fertilização *in vitro*

FSH - Follicle stimulating hormone ou Hormônio Folículo Estimulante

G – Gravidade

GDD – Gradiente Descontínuo de Densidade

GnRH – Gonadotropin-Releasing Hormone ou Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

ICSI – Intracytoplasmatic Sperm Injection ou Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides

IUI – Inseminação Intrauterina

LH – Luteinizing Hormone ou Hormônio Luteinizante

MESA – Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration ou Aspiração Microcirúrgica de Espermatozoides do Epidídimo

OMS – Organização Mundial de Saúde

PESA – Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration ou Aspiração Percutânea de Espermatozoides do Epidídimo

pH – Potencial de Hidrogênio

PUFA's – Polyunsaturated Fatty Acids ou Ácidos Graxos Poliinsaturados

RA – Reprodução Assistida

ROS – Reactive Oxygen Species ou Espécies Reativas de Oxigênio

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus centigrados

< - Menor

mL - Mililitro

μL – Microlitro

™ - *Trademark*

× - Multiplicação

® - Marca Registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. <u>Infertilidade</u>	16
1.1.1. <i>Reprodução Assistida</i>	16
1.2. <u>Fisiologia da Fertilização</u>	17
1.3. <u>Fisiologia da Reprodução Masculina</u>	18
1.3.1. <i>O sêmen</i>	18
1.3.2. <i>Espermatogênese</i>	19
1.3.3. <i>Análise e Processamento seminal</i>	20
1.4. <u>Histórico da criopreservação seminal</u>	21
1.4.1. <i>Criopreservação seminal</i>	22
1.4.2. <i>Criopreservação de sêmen e a Reprodução Assistida</i>	23
1.5. <u>Problema</u>	26
2. OBJETIVO	27
2.1. <u>Objetivos específicos</u>	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. <u>Critérios de exclusão</u>	28
3.2. <u>Coleta das amostras</u>	28
3.3. <u>Análises</u>	29
3.3.1. <i>Concentração e motilidade</i>	29

3.3.2.	<i>Morfologia</i>	29
3.3.3.	<i>Vitalidade</i>	30
3.3.4.	<i>Taxa de recuperação de espermatozoides</i>	30
3.4.	<u>Experimentos</u>	30
3.5.	<u>Congelamento seminal</u>	31
3.6.	<u>Descongelamento seminal</u>	32
3.7.	<u>Análises estatísticas</u>	33
4.	RESULTADOS	34
5.	DISCUSSÃO	41
6.	CONCLUSÃO	46
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infertilidade

A infertilidade é um problema mundial de saúde pública e acomete em torno de 10% da população (OMBELET et al., 2008a, b). É diagnosticada pela incapacidade de engravidar após 12 ciclos ovulatórios, com relações sexuais sem o uso de métodos contraceptivos (THIJSSSEN, et al, 2014). Cerca de 35% dos casos de infertilidade estão relacionados a fatores estritamente femininos, 30% a fatores masculinos, 20% a anormalidades encontradas em ambas as partes e 15% dos casos são classificados como idiopáticos, sem causa aparente (MASCARENHAS et al., 2012, b).

Diante disso, ergue-se um ramo da medicina que visa minimizar os obstáculos da infertilidade. A reprodução assistida surge perante esta vertente, desenvolvendo técnicas como a inseminação artificial, fertilização *in vitro* (FIV), criopreservação de gametas e tecido ovariano, para auxiliar casais na realização do desejo de se tornarem pais.

1.1.1. *Reprodução Assistida*

A reprodução assistida (RA) se tornou amplamente difundida com o nascimento da inglesa Louise Brown em 1978, primeiro bebê concebido pela técnica de FIV. Desde então, foram desenvolvidas novas técnicas e a RA tornou-se uma área em constante aprimoramento. As principais técnicas realizadas atualmente são a inseminação intrauterina (IIU), a FIV convencional e a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI).

A IIU consiste na introdução de espermatozoides, previamente selecionados, por meio de um cateter apropriado, na cavidade uterina da mulher. Esse evento é sincronizado com a ovulação da mulher e a seleção dos espermatozoides é feita por técnicas que serão discutidas posteriormente. Para realização da IIU é utilizado como requisito masculino que o homem apresente uma alta concentração de espermatozoides viáveis no sêmen, uma vez que nessa técnica a fertilização ocorrerá de forma fisiológica e os espermatozoides ainda terão muitas barreiras a ultrapassar (AGARWAL & ALLAMANENI, 2007).

A FIV convencional é um tratamento em que o óvulo é fecundado *in vitro* e para isso, é necessária a realização de aspiração folicular para retirada dos óvulos da mulher e sua posterior fertilização. Como em todas as técnicas de RA, é realizado um processamento para seleção dos melhores espermatozoides do ejaculado do homem. Os espermatozoides previamente selecionados serão colocados no mesmo microambiente do óvulo e dessa forma, terão menos barreiras para fertilizá-lo. Portanto, para execução dessa técnica, o homem pode apresentar menores concentrações de espermatozoides (MATSON & YOVICH, 1986).

A ICSI é considerada um subtipo da FIV. Na ICSI, assim como na FIV, a fertilização também ocorre *in vitro*, com os mesmos procedimentos associados de aspiração folicular e seleção de espermatozoides, porém com uma particularidade. A fertilização na ICSI ocorre a partir da microinjeção de um único espermatozoide no citoplasma do oócito, por meio de uma agulha apropriada. Nesse procedimento, o homem pode apresentar baixíssimas concentrações de espermatozoides, justamente pela necessidade de apenas um espermatozoide por óvulo a fecundar (DEVROEY & VAN STEIRTGHEM, 2004).

1.2. Fisiologia da Fertilização

As técnicas de reprodução assistida foram desenvolvidas baseadas na fisiologia natural da fertilização e os acontecimentos intrínsecos a esse evento. A fertilização é um fenômeno extremamente complexo, envolvendo uma variedade de mecanismos, muitos ainda não completamente elucidados. A fecundação ocorre na tuba uterina, também conhecida como oviduto, especificamente em uma região chamada de ampola (GUYTON & HALL, 2002). O encontro entre o óvulo e o espermatozoide é dependente de diversos fatores, como por exemplo, a quimiotaxia advinda tanto do óvulo como da tuba uterina e a capacitação espermática ocorrida no trajeto do útero e oviduto (YOSHIDA & YOSHIDA, 2011).

No útero, ao se distanciar do plasma seminal, o espermatozoide inicia um processo de modificação da membrana plasmática, aumentando a sua permeabilidade ao cálcio extracelular (DARSZON et al, 2011). A elevação do cálcio e o ambiente uterino levam a uma cascata de sinalização intracelular no espermatozoide, causando a hiperativação do flagelo e abertura de pontos de comunicação entre a membrana plasmática do espermatozoide e a membrana acrossomal (BROKAW, 1979; CORKIDI et al, 2017). A termotaxia e a quimiotaxia do espaço uterino, em conjunto com os receptores membranares das células do trato uterino, medeiam a

trajetória dos espermatozoides até a região do oviduto, onde ocorrerá a fertilização (PÉREZ-CEREZALES et al, 2018). Poucos espermatozoides chegam a essa região. A integridade da membrana plasmática do espermatozoide, bem como de seus receptores membranares são essenciais para a chegada dos espermatozoides a ampola. Os espermatozoides de um ejaculado apresentam uma grande variedade de características estruturais e moleculares entre si, que resultam em diferentes respostas aos fatores quimiotáticos uterinos (HOLT & VAN LOOK, 2004). Com isso, uma pequena porcentagem de espermatozoides chega ao destino final, o que gera uma seleção primária dos espermatozoides, antes mesmo de se aproximarem do oócito.

Ao encontrar o óvulo, o espermatozoide se depara com uma densa camada de células da granulosa revestindo-o, denominada *cumulus oophorus*. As pequenas perfurações na membrana plasmática do espermatozoide e acrossoma, geradas pelos eventos de influxo de cálcio, permitem a liberação de enzimas proteolíticas e de hialuronidase. A hialuronidase é uma enzima que promove a disjunção das comunicações intercelulares das células da granulosa, abrindo caminhos para o espermatozoide. Todos esses eventos são desencadeados pela conexão receptor e ligante entre espermatozoide e óvulo. Ao ligar-se aos receptores da zona pelúcida do óvulo, o espermatozoide libera todo o conteúdo acrossomal, para digerir parte da zona pelúcida e criar uma abertura para a entrada da cabeça do espermatozoide. O material genético do espermatozoide entra no óvulo e ocorre a fusão com o material genético do óvulo, gerando uma cascata de eventos que darão origem ao embrião.

1.3. Fisiologia da Reprodução Masculina

1.3.1. *O sêmen*

O plasma seminal é um fluido biológico essencial para o transporte e ativação de espermatozoides, neutralização do pH do trato vaginal feminino e, conseqüentemente, para a fecundação *in vivo*. É formado pela secreção de fluidos dos testículos, epidídimo, vesículas seminais, próstata, glândulas bulbouretrais e periuretrais, que contribuem com diferentes moléculas e íons (DRABOVICH et al., 2014). Nele, podemos encontrar lipídeos, carboidratos, como a frutose, proteínas e íons inorgânicos, como o cálcio e zinco (SCHMID et al, 2013).

Os espermatozoides e o plasma seminal possuem diferentes mecanismos antioxidantes que agem como protetores contra o dano celular causado por espécies reativas de oxigênio (ROS). De acordo com Therond e colaboradores, pode-se destacar a presença das enzimas catalase, glutatiónperoxidase e outros compostos como vitamina E, ácido ascórbico e taurina, como agentes antioxidantes presentes no líquido seminal (THEROND et al., 1996).

1.3.2. Espermatogênese

O processo de formação de espermatozoides se inicia nos testículos, especificamente nos túbulos seminíferos. É ditado pelo “hormônio folículo estimulante” (FSH) e pelo “hormônio luteinizante” (LH), ambos hormônios gonadotróficos hipofisários, dependentes do estímulo hipotalâmico do “hormônio liberador de gonadotrofinas” (GnRH). A partir da estimulação das células de Sertoli pelo hormônio FSH, é induzida a proliferação das células germinativas masculinas (RUSSEL et al, 1993). Por meio de sucessivas mitoses, as células germinativas dão origem as espermatogônias. As espermatogônias passam por um processo de crescimento, sem nenhuma divisão celular, formando assim os espermatócitos. A partir desse momento, as células de Leydig são estimuladas pelo hormônio LH a secretar testosterona e promover a meiose dos espermatócitos, produzindo assim as espermatídes. As espermatídes percorrem um processo de diferenciação, originando os espermatozoides. Nessa diferenciação ocorrem eventos de redução citoplasmática, expansão do núcleo, condensação do material genético, formação do acrossoma e desenvolvimento do flagelo do espermatozoide (ARAUJO et al., 2007).

Após a formação, os espermatozoides migram pelo epidídimo e ficam armazenados na cauda do epidídimo, onde passarão por um processo de maturação. Entre outras alterações, ocorrerá modificação da composição da membrana plasmática e membrana acrossomal do espermatozoide, além de mudanças na estrutura do flagelo. Nessa fase, o espermatozoide adquire motilidade progressiva e será mantido na cauda do epidídimo até o momento da ejaculação. Estima-se que o curso da espermatogênese se dê em torno de 70 dias, podendo ocorrer variações (SILVERTHORN, 2010).

A espermatogênese pode sofrer alterações durante todas as etapas de seu processo, devido aos mais diversos fatores. Condições como distúrbios endócrinos, febre, infecções e trauma testicular podem acarretar em falhas na produção e qualidade dos espermatozoides (AHMADI, 2014).

1.3.3. Análise e Processamento seminal

Para o delineamento da correta estratégia no tratamento de casais inférteis é primordial desvendar as causas de infertilidade. Portanto, faz-se necessária uma precisa análise seminal para investigar e diagnosticar a presença de fatores masculinos associados a tal condição.

Conforme as diretrizes da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010), análises de pH, volume seminal, viscosidade, coloração, odor, aspecto, concentração e motilidade espermática, vitalidade e morfologia são cruciais na pesquisa da infertilidade. Alterações no pH podem ser indicadores de processos inflamatórios e infecções microbianas. Variações no volume seminal podem representar desequilíbrios na produção e secreção do plasma seminal pela próstata e vesículas seminais (MANN, 1964). Baixas concentrações e motilidade espermáticas apontam para obstruções e traumas testiculares (AHMADI, 2014).

A integridade estrutural e funcional do espermatozoide é essencial para a fertilização dos oócitos e desenvolvimento embrionário. A ligação do espermatozoide com a zona pelúcida do oócito promove o desencadeamento da reação acrossômica, que provoca a excitose do conteúdo de lise do acrossoma e permite a fusão da membrana do espermatozoide com a matriz do oócito (SATI et al., 2014). Assim, é promovida a entrada do material genético do espermatozoide no óvulo. A integridade do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) do espermatozoide e a presença de RNA's mensageiros são cruciais para o correto desenvolvimento embrionário. Espermatozoides com motilidade e morfologia normais apresentam menor fragmentação de DNA e, conseqüentemente, maior potencial de fertilização (OEHNINGER et al., 2014). Dessa forma, selecionar os melhores espermatozoides representa tarefa fundamental para a fertilização e o correto desenvolvimento embrionário (SAKKAS, 2013).

A escolha do melhor método de seleção de espermatozoides também constitui etapa fundamental para pacientes inférteis submetidos aos tratamentos de reprodução assistida. Entre eles podemos citar os mais comumente aplicados em laboratórios de RA, como o *sperm wash*, o *swim-up* e gradiente descontínuo de densidade.

O *sperm wash* é uma técnica simples, que objetiva concentrar os espermatozoides e separá-los do plasma seminal, a partir da lavagem com um meio tamponado e suplementado, pelo método de centrifugação. É rotineiramente realizada em casos de amostras

oligoastenozoospermicas, isto é, com baixa concentração e motilidade de espermatozoides. Todavia, está relacionada à elevação da fragmentação de DNA dos espermatozoides devido a presença de células mortas e outros tipos celulares, geradores de ROS, como também pelo processo de centrifugação da amostra (WHO, 2010).

O *swim-up* é um método que se utiliza da capacidade de migração dos espermatozoides móveis progressivos para um meio mais fluido, separando-se do plasma seminal. O plasma seminal é posto no fundo de um tubo contendo um meio tamponado, em uma angulação de 45 °C e os espermatozoides nadam para a superfície do meio tamponado, já que este é mais fluido que o sêmen (YAMANAKA et al., 2016). A técnica seleciona uma amostra livre de espermatozoides mortos e outros tipos celulares e recupera uma fração de espermatozoides com alta motilidade. Apresenta como vantagem a ausência de etapas de centrifugação, que podem aumentar a fragmentação do DNA do espermatozoide. Como desvantagem, observa-se a baixa recuperação de espermatozoides (WHO, 2010).

O “gradiente descontínuo de densidade” (GDD) é um procedimento que possibilita a migração dos espermatozoides, com a ajuda do mecanismo de centrifugação e sedimentação. Neste procedimento, é imposto um obstáculo para seleção dos melhores e mais rápidos espermatozoides e retenção de células mortas, espermatozoides fragmentados, leucócitos e outros tipos celulares. Este obstáculo é formado por uma substância colóide, que pode ser aplicada em monocamada ou dupla camada, com densidades diferentes (WHO, 2010; ZHAO et al., 2016). É um bom mecanismo de seleção, recuperando espermatozoides com boa motilidade e morfologia, porém apresenta taxa de recuperação de espermatozoides mediana (FACIO et al., 2016).

1.4. Histórico da criopreservação seminal

O primeiro evento de criopreservação seminal humana de sucesso ocorreu em 1949, quando o pesquisador Polge obteve recuperação de espermatozoides móveis após o congelamento seminal, a partir do uso da substância glicerol durante o processo. Essa foi a primeira descrição do glicerol como crioprotetor (POLGE et al., 1949). Em 1954, Sherman e colaboradores provaram a eficácia da técnica de congelamento com a fertilização de óvulos e desenvolvimento embrionário normal a partir de espermatozoides criopreservados (SHERMAN et al, 1954). Até então, o congelamento era realizado utilizando-se dióxido de

carbono solidificado, a uma temperatura de $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$, para o resfriamento. Mais tarde, foi demonstrado que as taxas de sobrevivência e viabilidade dos espermatozoides eram aumentadas quando aplicada a técnica de resfriamento com vapor de nitrogênio líquido e armazenamento das amostras a uma temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, em nitrogênio líquido (SHERMAN, 1962).

Em 1963, foi relatado o primeiro nascimento de bebês fecundados por inseminação artificial a partir de sêmen criopreservado pelo protocolo de vapor de nitrogênio líquido (SHERMAN, 1963). O evento foi um marco na história da criopreservação seminal humana e desde então, as técnicas vêm sendo aprimoradas.

1.4.1. Criopreservação seminal

A criopreservação de sêmen é uma técnica de preservação de espermatozoides a baixas temperaturas ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), que induz os espermatozoides a um estado de latência, o que permite o seu armazenamento por tempo indeterminado. É clinicamente indicada para pacientes submetidos à vasectomia, quimioterapia e radioterapia, doação de sêmen, baixa qualidade seminal e exposição a fatores de risco, como produtos químicos e calor excessivo (MATTOS et al., 2003). Além desses, pacientes com azoospermia obstrutiva, isto é, ausência de espermatozoides no ejaculado devido a uma obstrução anatômica do trato reprodutor masculino, são também orientados a realizar o congelamento. Nesse caso, os pacientes, impreterivelmente, necessitam realizar um procedimento exploratório de busca de espermatozoides, como PESA- aspiração percutânea do epidídimo- ou MESA – aspiração microcirúrgica do epidídimo (ESTEVEES e VARGHESE, 2012).

O PESA consiste na punção do epidídimo, local de maturação dos espermatozoides, com uma seringa agulhada e meio tamponado, através da bolsa escrotal. O MESA é um procedimento cirúrgico que expõe os túbulos do epidídimo por meio de microincisão da bolsa escrotal e do epidídimo, seguido de aspiração do fluido tubular. A criopreservação dos espermatozoides recuperados tanto no PESA quanto no MESA é importante para evitar a repetição destes procedimentos, em casos de falhas dos procedimentos de fertilização (PATRIZIO, 2000). Múltiplos PESA's e MESA's podem causar danos irreversíveis aos testículos, como a atrofia testicular (GANGRADE, 2013). Além disso, a preservação dos espermatozoides testiculares e epididimais evita a execução destes procedimentos no mesmo dia da punção folicular dos oócitos. Os procedimentos de PESA e MESA não garantem a

recuperação de espermatozoides, visto que a espermatogênese pode ser alterada por múltiplos fatores, como descrito anteriormente.

A criopreservação é uma ferramenta muito importante no ramo da reprodução assistida, porém está associada a diversas injúrias aos espermatozoides. Tais injúrias são conduzidas pela geração de um ambiente de alto “stress” oxidativo, inerente ao processo, que altera significativamente a integridade do DNA do espermatozoide e, conseqüentemente, a morfologia e a motilidade (GRIZARD et al., 1999). O processo de congelamento e descongelamento dos espermatozoides leva a perda de aproximadamente 50% dos espermatozoides vivos, variando entre indivíduos e amostras (COUNSEL et al., 2004).

O congelamento dos espermatozoides envolve etapas de redução da temperatura, desidratação celular e alteração da estrutura da membrana e acrossoma. Durante esse processo, os espermatozoides são submetidos a diversos riscos, como por exemplo, a formação de cristais de gelo, choque osmótico, modificação da fluidez e flexibilidade da membrana, redução do potencial mitocondrial de membrana, entre outros (BRUGNON et al., 2013; STANIC et al., 2000).

Diversos protocolos e meios de congelamento são utilizados, empregando crioprotetores como forma de reduzir as injúrias aos espermatozoides. De modo geral, os meios de congelamento se baseiam em alguns componentes principais e conservados, com pequenas variações. São utilizados soluções tampão, para a manutenção do pH do meio. Sais para manter o equilíbrio osmótico. Moléculas que fornecem energia, como frutose e glicose (FABOZZI et al., 2016). A gema de ovo de galinha inativada também é um componente muito frequente nos meios de congelamento. Acredita-se que as lipoproteínas de baixa densidade presentes na gema de ovo forneçam proteção a membrana do espermatozoide contra o choque-térmico (GRIZARD et al., 1999).

O glicerol é o crioprotetor mais frequentemente utilizado, promovendo o equilíbrio osmótico do espermatozoide com o meio, impedindo a formação de cristais de gelo. Entretanto, apesar de reduzir a formação de cristais e os danos estruturais às células, é uma substância tóxica, que aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (WUNDRICH et al., 2006).

1.4.2. Criopreservação de sêmen e a Reprodução Assistida

Com o aperfeiçoamento das técnicas de reprodução assistida, tornou-se cada vez mais recorrente a busca por um eficaz protocolo de criopreservação de espermatozoides. A técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) elevou as probabilidades de gravidez

a partir da fertilização de oócitos com amostras apresentando baixas concentrações de espermatozoides móveis, incentivando a preservação destas células (PALERMO et al., 2009). Além disso, amostras de sêmen criopreservadas podem ser aplicadas em outros procedimentos de RA, como a inseminação artificial e a FIV. Contudo, para estes procedimentos é necessário obter uma melhor qualidade de espermatozoides, visto que os espermatozoides terão outras barreiras a enfrentar (SHABTAIE, et al., 2016).

A fecundação entre espermatozoides e oócitos é um evento diretamente dependente da integridade e ativação da membrana do espermatozoide. A interação entre os receptores de membrana do oócito e do espermatozoide é essencial para a indução da reação acrossômica e, conseqüentemente, para a fertilização (KHOSROWBEYGIA&ZARGHAMI, 2007). A estabilidade estrutural da membrana do espermatozoide é vinculada à sua composição lipídica, dependendo diretamente da presença de ácidos graxos poliinsaturados ligados a fosfolipídeos (PUFA's), que lhe conferem fluidez e flexibilidade (MARTÍNEZ-SOTO et al, 2013). Os PUFA's das membranas são frequentes sítios de ação das espécies reativas de oxigênio, gerando peroxidação dos lipídeos e danos aos espermatozoides (AGARWAL et al., 2008).

Durante o processo de descongelamento dos espermatozoides criopreservados, o "stress" mitocondrial leva a uma produção excessiva de ROS, que causa injúrias à membrana do espermatozoide. Tais injúrias se dão devido à peroxidação lipídica da membrana e afetam diretamente as taxas de fertilização dos procedimentos de inseminação artificial e fertilização *in vitro* (LIU et al., 2016). Além disso, as espécies reativas de oxigênio provocam também considerável aumento da fragmentação de DNA, que apresenta relação direta com as falhas nas taxas de fertilização dos oócitos (TAVILANI et al., 2008).

Os protocolos convencionais de congelamento de espermatozoides determinam a criopreservação dos espermatozoides a fresco, sem qualquer tipo de processamento, com a presença do plasma seminal (GRIZARD et al., 1999). Apesar do desenvolvimento de novas tecnologias e da ampla literatura na área da criopreservação de espermatozoides, com testes de novas variações de protocolos e meios, os métodos convencionais permanecem sendo os mais utilizados. Não há um consenso na literatura sobre os protocolos alternativos aos convencionais e as taxas de recuperação de espermatozoides após o descongelamento continuam baixas.

Como descrito anteriormente, acredita-se que o plasma seminal e suas propriedades antioxidantes sejam essenciais para a proteção do espermatozoide contra o "stress" oxidativo que ocorre durante o congelamento e descongelamento. Por outro lado, a presença do líquido seminal altera a estrutura da membrana plasmática do espermatozoide e a capacitação que o espermatozoide sofre ao se ligar ao oócito, interferindo na fertilização (BARTHELEMY et al.,

1990). Os espermatozoides mortos, células epiteliais, leucócitos e agentes microbianos que normalmente estão presentes no sêmen elevam significativamente a geração de ROS do sêmen criopreservado, além do processo de criopreservação em si (SHEKARRIZ, et al., 1995).

Estabelecer um novo protocolo de congelamento de espermatozoides que apresente significativo aumento da taxa de recuperação de espermatozoides e, principalmente, da qualidade dos mesmos, é imprescindível. Melhorar a qualidade dos espermatozoides criopreservados utilizados nos procedimentos de reprodução assistida apresenta um potencial de elevação das taxas de fertilização e, conseqüentemente, de gravidez.

O “Vida – Centro de Fertilidade” é especialista em Medicina Reprodutiva e já ajudou milhares de casais inférteis a engravidar. O “Vida” realiza hoje em média de 4 a 7 congelamentos de espermatozoides por mês. Casais receptores de ovodação são frequentes casos de criopreservação de espermatozoides na clínica, por questões éticas. A ovodação é anônima e o congelamento de sêmen evita o contato dos pacientes com os doadores no ambiente da clínica. Pacientes submetidos a cirurgia, quimio e radioterapia, PESA, e àqueles que estarão ausentes nas datas das punções foliculares também são muito indicados para a criopreservação seminal. O protocolo utilizado atualmente na clínica segue o tradicional, sendo realizado com o sêmen a fresco, ou seja, com o plasma seminal, seguindo os *guidelines* de andrologia, salvo algumas exceções. Há eventos de pacientes que solicitam a criopreservação do sêmen no mesmo dia do procedimento de fertilização, após já ter sido realizado o processamento seminal convencional de rotina para a fertilização. Os pacientes recorrem a essa alternativa inesperada para evitar o stress e o inconveniente de uma nova coleta seminal, caso ocorram falhas e sejam necessários outros ciclos de fertilização.

Os descongelamentos de sêmen no “Vida” costumam atingir taxas de recuperação de espermatozoides móveis abaixo de 50%, o que demonstra a difícil reprodutibilidade dos protocolos fornecidos pelos fabricantes e registrados na literatura. Os espermatozoides tendem a apresentar morfologia muito alterada, exceto quando a amostra inicial, antes do congelamento, apresentava parâmetros muito acima da normalidade. As causas de infertilidade dos casais que frequentam a clínica são muito variadas, o que dificulta a computação da estatística de falhas de fertilização e desenvolvimento embrionário devido ao sêmen criopreservado, como fator isolado. As eventuais amostras seminais criopreservadas após o processamento seminal, principalmente, pela técnica de GDD, apresentaram melhor qualidade dos espermatozoides após o descongelamento, inclusive em relação à morfologia espermática. Esse fato gerou questionamentos acerca do protocolo atualmente utilizado na clínica. Melhorar

a qualidade dos espermatozoides criopreservados após o descongelamento apresenta um potencial na melhora das taxas de fertilização da clínica com sêmen criopreservado.

1.5. Problemática

Apesar de ser uma técnica estabelecida e utilizada em todas as clínicas de medicina reprodutiva, o congelamento de espermatozoides ainda apresenta uma taxa de recuperação que necessita ser melhorada. A presença do plasma seminal durante o congelamento ainda é uma questão controversa e devido à falta de consenso sobre o tema, cada clínica escolhe o seu protocolo padrão.

Este projeto foi realizado para responder a esta pergunta: para os procedimentos realizados na Clínica Vida, o plasma seminal deve ou não ser mantido durante o processo de congelamento de espermatozoides?

2. OBJETIVO

Desenvolver um protocolo de processamento pré-criopreservação seminal que apresente melhores taxas de recuperação de espermatozoides e espermatozoides de melhor qualidade, quanto à motilidade, morfologia e vitalidade, após o descongelamento, para aplicação na rotina da clínica Vida.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar os resultados do congelamento de espermatozoides com e sem a presença do plasma seminal, removido pela técnica de gradiente descontínuo de densidade.
- Avaliar a viabilidade do uso de ambas técnicas na rotina da Clínica Vida.
- Determinar o melhor protocolo operacional padrão de congelamento seminal para as rotinas de andrologia da clínica de reprodução humana “Vida”.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras seminais de 45 indivíduos voluntários da clínica de reprodução humana Vida foram avaliadas neste estudo. Foram incluídas neste trabalho amostras seminais de 22 indivíduos, todas previamente autorizadas pelos mesmos, por meio do termo de consentimento livre e esclarecido. Os indivíduos que se voluntariaram para o estudo estavam em tratamento na clínica, porém não apresentavam necessariamente o diagnóstico de infertilidade masculina. O diagnóstico de infertilidade é dado levando em consideração o casal e nesse trabalho foram inclusos indivíduos que tanto estavam em investigação de infertilidade com suas esposas quanto aqueles que já possuíam o diagnóstico.

A idade média dos indivíduos que doaram as amostras foi de $35,4 \pm 4,3$ anos, sendo o paciente mais jovem com 25 anos e o mais velho com 42 anos.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, pelo parecer número 15193319.3.0000.5257. Após a finalização de todas as análises, as amostras foram descartadas, de acordo com as normas de biossegurança da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

3.1. Critérios de exclusão

Amostras seminais que apresentavam volume inicial abaixo de 1,5mL e concentração inicial de espermatozoides abaixo de 10 milhões/mL foram excluídas dessa pesquisa, devido a necessidade da divisão das amostras em duas alíquotas com espermatozoides viáveis e volume suficiente para execução de todas as análises do início ao fim. No total, foram excluídas amostras de 23 pacientes.

3.2. Coleta das amostras

Os indivíduos voluntários realizaram a coleta das amostras seminais em uma sala apropriada dentro da clínica Vida, com comunicação indireta com o laboratório de andrologia. As amostras foram coletadas por masturbação, sem uso de preservativos, em um pote coletor estéril. Foi solicitado um período de 2 a 5 dias de abstinência sexual aos voluntários.

3.3. Análises

Após liquefação, de acordo com os normas da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010), foram analisados os parâmetros viscosidade, volume, pH, motilidade, concentração e vitalidade espermática. Foi avaliada também a morfologia dos espermatozoides, de acordo com os critérios de Kruger (KRUGER et al., 1987).

3.3.1. *Concentração e motilidade*

Para análise de concentração e motilidade foi utilizada a câmara Makler. Uma alíquota de 10µL de amostra foi colocada sob a câmara de Makler e coberta por lamínula própria. Em seguida, realizada a contagem de espermatozoides presentes nos 100 quadrados da câmara, por meio de um microscópio óptico, com aumento de 200x. Os valores encontrados foram multiplicados por 1000000 e os resultados da concentração de espermatozoides fornecidos na unidade de “milhões por mililitro”. Durante a contagem na câmara Makler, os espermatozoides foram divididos em três categorias de motilidade: A, B e C. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o parâmetro A refere-se aos espermatozoides móveis progressivos; B refere-se aos espermatozoides móveis não-progressivos; C refere-se aos espermatozoides imóveis. A partir dessa contagem diferencial, obteve-se a motilidade A,B e C em valores absolutos e em valores percentuais (a partir da divisão de cada parâmetro pela concentração de espermatozoides total, seguida de multiplicação por 100).

3.3.2. *Morfologia*

A morfologia dos espermatozoides foi avaliada pela coloração diferencial com o kit Spermastain™ (fabricante FertiPro), de acordo com o protocolo do fabricante. Foi utilizado um microscópio óptico, com aumento de 1000x e óleo de imersão para contagem dos espermatozoides. Foram considerados normais os espermatozoides que apresentavam cabeça ligeiramente ovalada e lisa, com região acrossomal compreendendo 40 – 70% da cabeça e com um limite de dois pequenos vacúolos nessa região; a peça intermediária deveria estar alinhada

com a cabeça, apresentando comprimento compatível com a cabeça e contornos regulares; a cauda deveria estar lisa, fina, sem gotas citoplasmáticas e de comprimento três vezes maior que a peça intermediária (MENKVELD et al., 2001; KRUGER et al., 1986). Foram contabilizados de 100 a 200 espermatozoides e geradas as proporções de espermatozoides normais.

3.3.3. *Vitalidade*

A vitalidade dos espermatozoides foi avaliada pela coloração desses com o corante eosina-nigrosina do kit Vitalscreen™ (fabricante FertiPro). A coloração foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante e os espermatozoides corados em vermelho foram considerados mortos e os espermatozoides não-corados considerados vivos. Com o auxílio de um microscópio óptico, com aumento de 1000x e óleo de imersão, foram contabilizados de 100 a 200 espermatozoides e geradas as proporções de espermatozoides vivos.

3.3.4. *Taxa de recuperação de espermatozoides*

A taxa de recuperação de espermatozoides foi medida pela divisão do valor absoluto de espermatozoides encontrados após o descongelamento das amostras, de cada grupo estudado, pelo valor absoluto de espermatozoides avaliados antes do congelamento das amostras, sendo esse último parâmetro sempre referente à análise realizada do sêmen ejaculado (controle fresco). O parâmetro taxa de recuperação de espermatozoides foi medido para os critérios espermatozoides móveis progressivos, espermatozoides móveis totais, espermatozoides morfolologicamente normais e espermatozoides vivos. Sempre se baseando na concentração desses critérios.

3.4. Experimentos

O volume seminal de cada paciente foi dividido em dois grupos: Controle e Gradiente.

O **grupo Controle** foi submetido diretamente à criopreservação, utilizando o protocolo de congelamento seminal da clínica Vida.

O **grupo Gradiente** foi submetido à capacitação, por meio do protocolo de seleção de espermatozoides de gradiente descontínuo de densidade da *LifeGlobal® Group* (ROUEN et al., 2013), utilizando o kit “AllGrad®” 45% e 90% e o meio de lavagem “AllGradWash®, para isolamento do líquido seminal, dos espermatozoides mortos e outros tipos celulares. Em um tubo cônico, foi adicionado 1mL do meio “AllGrad 90%” (densidade 90%), em seguida, adicionado lentamente 1mL do meio “AllGrad 45%” (densidade 45%), para não haver mistura entre os dois meios. Após estabilização dos meios “AllGrad®”, foi gotejado 1mL de sêmen pela parede do tubo (proporção 1:1, meio AllGrad®: sêmen). A amostra foi submetida a centrifugação por 20 minutos, a 200 g, em temperatura ambiente. Após este período, ocorreu a formação de um *pellet*. O sobrenadante da amostra foi descartado e o *pellet* homogeneizado com 2mL de meio de lavagem “AllGradWash®”. Novamente, a amostra foi centrifugada para retirar os resquícios do meio “AllGrad 45% e 90%®”, por 10 minutos, a 200 g e temperatura ambiente. Ocorreu a formação de um novo *pellet* e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi homogeneizado em 0,32mL de meio tamponado “AllGradWash®”. Ao final do processamento, foi verificada a motilidade e concentração dos espermatozoides, além da morfologia e vitalidade espermática. Em seguida, a amostra capacitada foi criopreservada seguindo o protocolo de congelamento seminal da clínica “Vida”.

As amostras dos dois grupos permaneceram congeladas por pelo menos uma semana e foram descongeladas seguindo o protocolo de descongelamento da clínica “Vida”. Após o descongelamento, foram avaliados os seguintes parâmetros: concentração de espermatozoides total; concentração de espermatozoides móveis progressivos total; motilidade; vitalidade; morfologia; taxa de recuperação de espermatozoides pós descongelamento.

Fluxograma do desenho experimental demonstrado na figura 1.

3.5. Congelamento seminal

O protocolo de congelamento de amostras seminais da clínica “Vida” é realizado com o meio de criopreservação “TYB – Test-Yolk buffer - com gema de ovo inativada por calor, glicerol e gentamicina”, da *Irvine Scientific* (HAMMADEH, 2001). O congelamento foi realizado a partir da lenta incorporação do meio TYB, na proporção de 1:1 (sêmen:meio) e permaneceu estabilizando nesta solução por 10 minutos, a temperatura ambiente. Uma alíquota de 0,5mL desta solução foi envasada e selada em palheta própria para o congelamento (CryoBio

System™), previamente identificada. Em seguida, a palheta foi imediatamente transferida para um refrigerador, a 4 °C (± 2 °C), e mantida por 20 minutos. Após isso, a palheta foi transferida para um freezer, a - 20 °C (± 2 °C), por 20 minutos. Logo após, a palheta foi transferida para um dispositivo que permitiu a permanência da palheta no vapor de nitrogênio líquido, a uma distância de 10 cm, por 20 minutos. Depois, a palheta foi mergulhada diretamente no nitrogênio líquido.

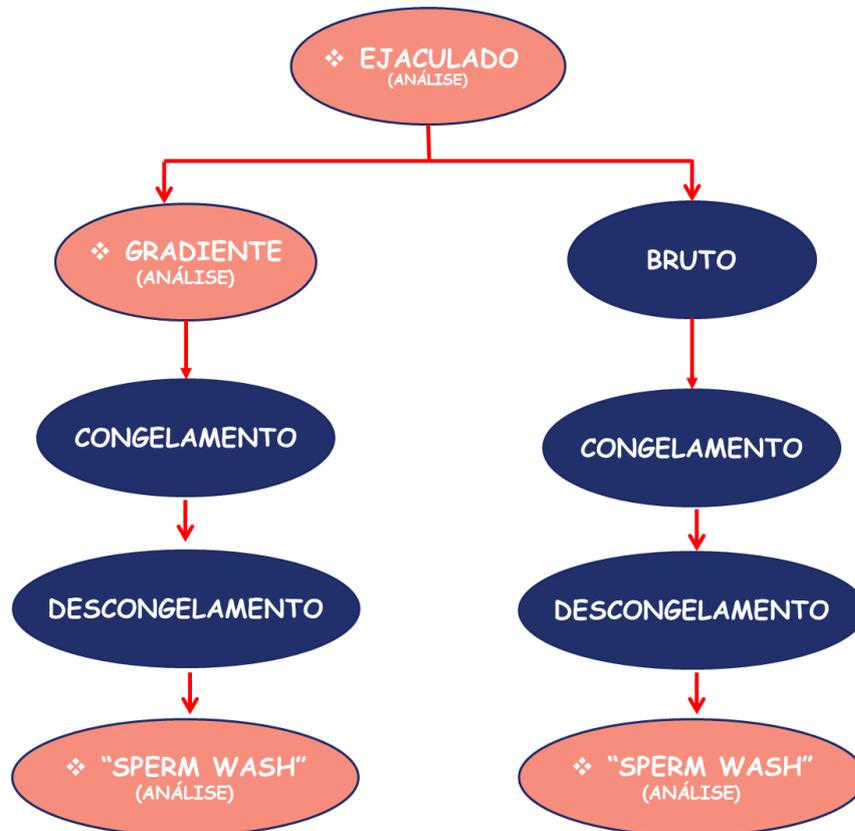


Figura 1: Esquema do desenho experimental

3.6. Descongelamento seminal

O protocolo de descongelamento seminal da clínica “Vida” ocorre pela retirada das palhetas do nitrogênio líquido e imediata imersão das palhetas em um banho-maria, a 37 °C, por 30 segundos. Em seguida, as extremidades das palhetas são cortadas e o desvase da amostra realizado com o auxílio de uma seringa em um tubo, previamente identificado. Após isso, é adicionado 2 mL de meio de lavagem “AllGradWash”® e as amostras são centrifugadas por 10 minutos, a 200 g, em temperatura ambiente. Ocorre a formação de um *pellet* e o sobrenadante é descartado, para limpar os resquícios do meio de congelamento. O *pellet* é

homogeneizado em 0,25mL de meio tamponado "AllGradWash®" e a amostra está pronta para uso.

3.7. Análises estatísticas

Para avaliação estatística dos dados, foram comparadas as diferenças de cada grupo pelo teste T não-paramétrico Wilcoxon pareado, já que a população amostral não segue uma distribuição Gaussiana, normal. Foi adotado um valor de significância de $p < 0,05$, isto é, um grau de confiabilidade de 95%. O p valor quando significativo foi identificado por *.

4. RESULTADOS

Nos parâmetros seminais prévios ao congelamento, o grupo Controle apresentou maior concentração de espermatozoides ($96,6 \pm 56,9 \times 10^6/\text{mL}$) comparado ao grupo Gradiente ($61,0 \pm 55,0 \times 10^6/\text{mL}$). Não houve diferenças significativas entre os grupos na concentração de espermatozoides móveis totais e móveis progressivos. A motilidade progressiva e motilidade total do grupo Gradiente ($65,9\% \pm 21,4$; $67,8\% \pm 21,4$, respectivamente) foi maior que no grupo Controle ($53,3\% \pm 15,2$; $57,9\% \pm 15,3$, respectivamente). Para os parâmetros vitalidade e morfologia, foram observados melhores resultados no grupo Gradiente ($81,1\% \pm 11,91$; $2,6\% \pm 2,42$, respectivamente) em relação ao Controle ($69,9 \pm 10,21$; $1,7 \pm 1,64$, respectivamente) (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros seminais pré-congelamento. Valores representados em médias seguidas de desvio-padrão. Foi considerado um valor de significância $p < 0,05$

Parâmetros seminais pré-congelamento					
	Controle		Gradiente		P valor
	Média \pm DP	Mín; Máx	Média \pm DP	Mín; Máx	
Concentração de espermatozoides ($\times 10^6/\text{mL}$)	96,6 \pm 56,9	26,0 - 237,0	61,0 \pm 55,0	19,0 - 217,0	0,0002*
Concentração de espermatozoides progressivos ($\times 10^6/\text{mL}$)	53,6 \pm 41,8	12,0 - 192,0	46,3 \pm 53,9	3,0 - 210,0	0,1186
Concentração de espermatozoides móveis ($\times 10^6/\text{mL}$)	57,2 \pm 42,3	14,0 - 194,0	47,2 \pm 53,9	3,0 - 210,0	0,0558
Motilidade Progressiva (%)	53,3 \pm 15,2	15,4 - 81,0	65,9 \pm 21,4	15,8 - 96,8	0,0015*
Motilidade total (%)	57,9 \pm 15,3	15,3 - 81,6	67,8 \pm 21,5	15,8 - 96,8	0,0113*
Vitalidade (%)	69,9 \pm 10,2	48,0 - 90,0	81,1 \pm 11,9	50,0 - 98,0	0,0001*
Morfologia Normal (%)	1,7 \pm 1,6	0,0 - 5,0	2,6 \pm 2,4	0,0 - 7,0	0,0005*

*Análises estatisticamente significativas

Após o descongelamento das amostras, foi verificada menor concentração de espermatozoides no grupo Gradiente ($34,1 \pm 28,4 \times 10^6/\text{mL}$) que no grupo Controle ($60,4 \pm 41,05$), como também observado nesse mesmo parâmetro antes do congelamento das amostras. Não houve diferença significativa nos parâmetros concentração de espermatozoides móveis e

concentração de espermatozoides progressivos entre os grupos. Quanto a motilidade progressiva e motilidade total, o grupo Gradiente ($24,0\% \pm 18,81$; $27,5\% \pm 19,78$, respectivamente) apresentou maiores médias que o Controle ($15,6\% \pm 11,07$; $17,7\% \pm 12,01$, respectivamente). A taxa de vitalidade e de espermatozoides com morfologia normal foi maior no grupo Gradiente ($56,3\% \pm 22,12$; $2,3\% \pm 2,23$, respectivamente) que no grupo Controle ($43,6\% \pm 15,92$; $1,3\% \pm 1,49$, respectivamente) (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros seminais pós-descongelamento. Valores representados em médias seguidas de desvio-padrão. Valor de significância de $p < 0,05$.

Parâmetros seminais pós-descongelamento					
	Controle		Gradiente		P valor
	Média \pm DP	Mín; Máx	Média \pm DP	Mín; Máx	
Concentração de espermatozoides ($\times 10^6/\text{mL}$)	60,4 \pm 41,1	11,0 - 150,0	34,1 \pm 28,4	4,9 - 135,0	0,0001*
Concentração de espermatozoides progressivos ($\times 10^6/\text{mL}$)	10,6 \pm 14,9	1,0 - 66,0	10,3 \pm 19,5	1,0 - 88,0	0,5082
Concentração de espermatozoides móveis ($\times 10^6/\text{mL}$)	11,7 \pm 15,4	1,0 - 69,0	11,3 \pm 19,9	1,0 - 89,0	0,5023
Motilidade Progressiva (%)	15,6 \pm 11,1	2,2 - 44,0	24,0 \pm 18,8	3,5 - 65,2	0,0063*
Motilidade total (%)	17,7 \pm 12,0	2,2 - 46,0	27,5 \pm 19,8	3,5 - 69,1	0,0014*
Vitalidade (%)	43,6 \pm 15,9	12,0 - 74,0	56,3 \pm 22,1	20,0 - 88,0	0,0002*
Morfologia Normal (%)	1,3 \pm 1,5	0,0 - 5,0	2,3 \pm 2,2	0,0 - 7,0	0,0005*

*Análises estatisticamente significativas

A motilidade progressiva pós-descongelamento foi maior no grupo Gradiente que no Controle (Figura 1). Contudo, quando comparamos a taxa de recuperação de espermatozoides móveis progressivos descongelados do grupo Gradiente em relação ao controle fresco com o grupo Controle também em relação ao Controle fresco, não há diferenças significativas entre os dois experimentos (Figura 2). A motilidade progressiva é um dado percentual da amostra e nesse caso, é comparada apenas entre os dados obtidos no pós-descongelamento de cada grupo. Já a taxa de recuperação de espermatozoides móveis progressivos pós-descongelamento mede os valores absolutos de espermatozoides encontrados ao final do descongelamento de cada

grupo (Controle descongelado e Gradiente descongelado) em relação ao Controle fresco, antes do congelamento.

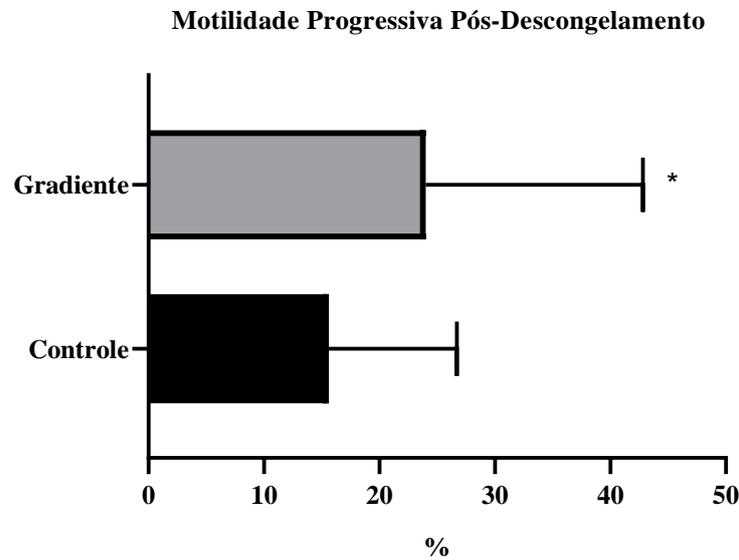


Figura 2: Motilidade Progressiva avaliada ao final do descongelamento das amostras do grupo Controle e Gradiente. Valores representados em Médias e Barras de Desvio-Padrão (%). Valor de significância adotado $p < 0,05$ (*)

A motilidade total pós-descongelamento foi melhor no grupo Gradiente que no grupo Controle (Figura 3). Entretanto, a taxa de recuperação de espermatozoides móveis totais pós descongelamento em relação ao Controle Fresco, pré-congelamento, não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos (Figura 4).

A taxa de vitalidade após o descongelamento encontrada no grupo Gradiente foi maior que no grupo Controle (Figura 5). Todavia, quando avaliada a taxa de recuperação de espermatozoides vivos pós descongelamento em relação ao Controle fresco, o grupo Controle apresentou maior taxa que o Gradiente (Figura 6).

A taxa de espermatozoides normais encontrada após o descongelamento no grupo Gradiente foi significativamente maior que o grupo Controle (Figura 7). Assim como a taxa de espermatozoides normais encontrada após o descongelamento no grupo Gradiente foi significativamente maior que a taxa de espermatozoides normais do Controle fresco, antes do congelamento (Figura 8). Contudo, ao avaliar a taxa de recuperação de espermatozoides morfolologicamente normais encontrada após o descongelamento em relação ao Controle fresco

de cada grupo, não houve diferença significativa entre os grupos Controle e Gradiente (Figura 9).

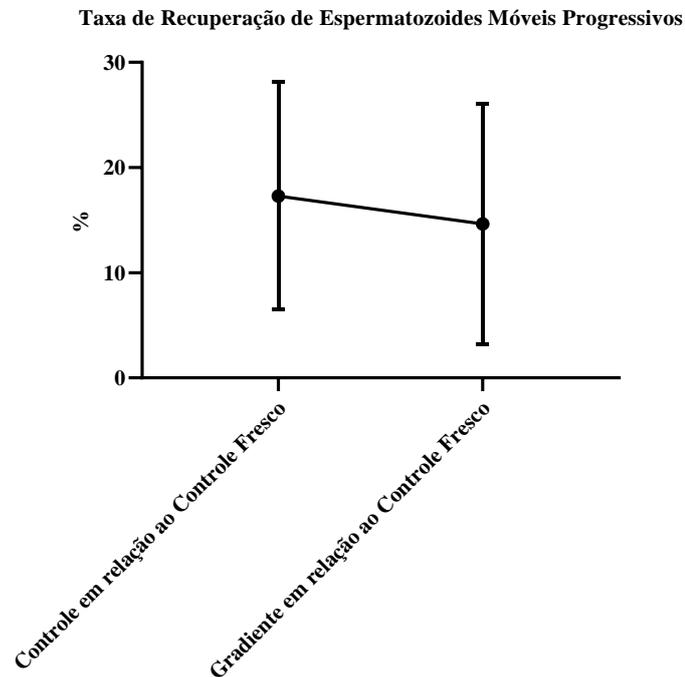


Figura 3: Comparação da taxa de recuperação de espermatozoides móveis progressivos pós-descongelamento do grupo Controle e do grupo Gradiente, ambos em relação ao Controle Fresco (antes do congelamento). Valores representados em Médias e Barras de Desvio-Padrão. Valor de significância adotado $p < 0,05$ (*).

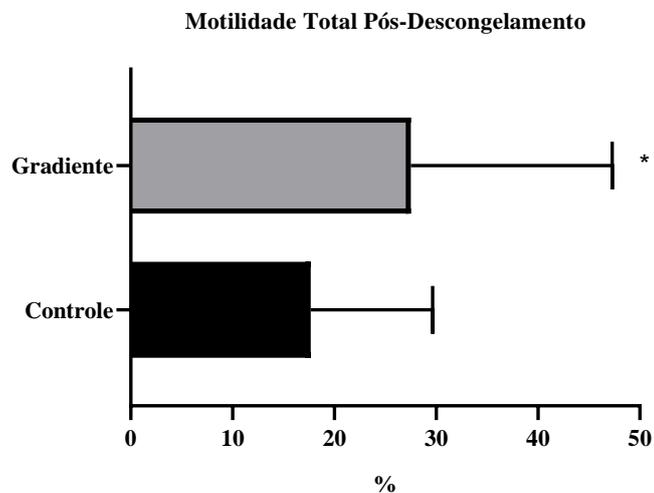


Figura 4: Motilidade total avaliada ao final do descongelamento dos grupos Controle e Gradiente. Valores apresentados em Média e Barra de desvio-padrão. Valor de significância adotado: $p < 0,05$.

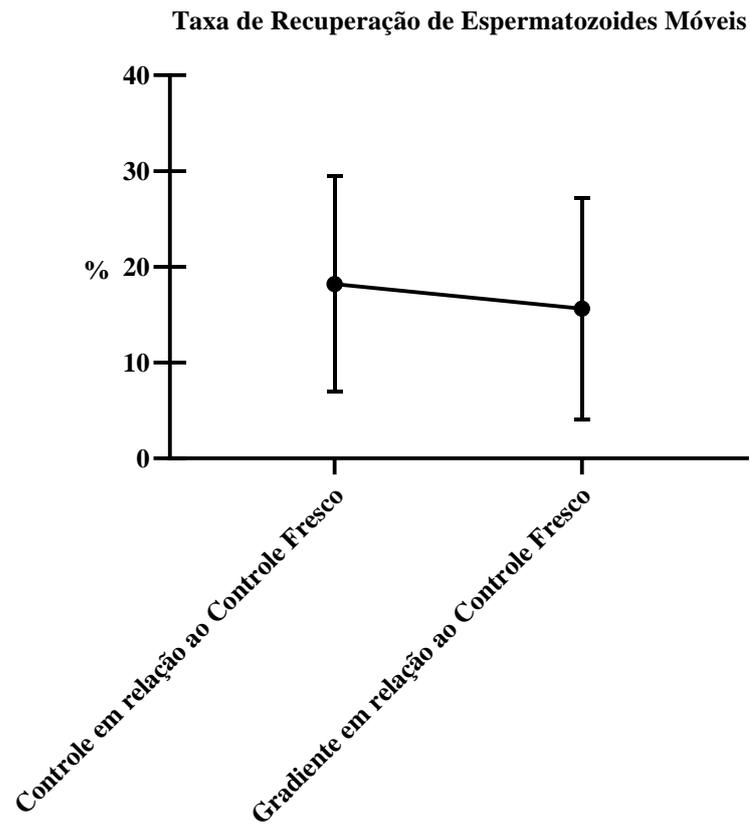


Figura 5: Comparação da taxa de recuperação de espermatozoides móveis totais pós-descongelamento do grupo Controle e do grupo Gradiente, ambos em relação ao Controle Fresco (antes do congelamento). Valores apresentados em médias e barras de desvio-padrão. Valor de significância $p < 0,05$.

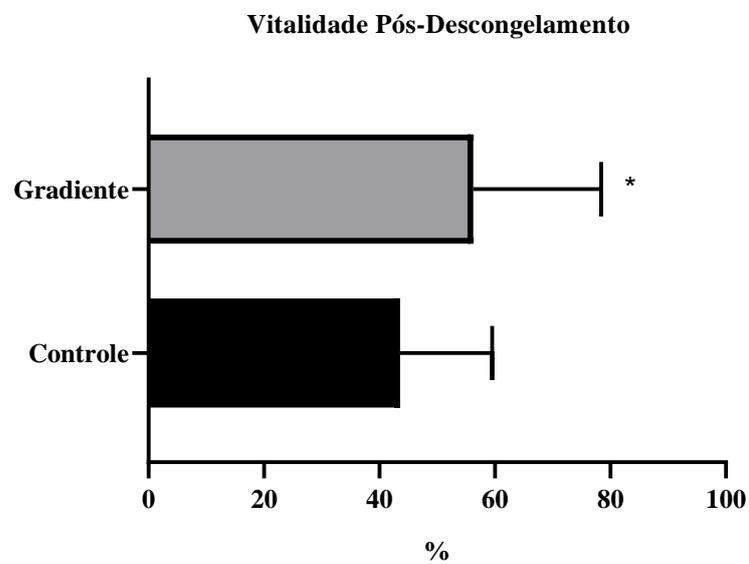


Figura 6: Porcentagem de espermatozoides vivos (Vitalidade) avaliadas ao final do descongelamento nos grupos Controle e Gradiente. Valores apresentados em médias e barras de desvio-padrão. Valor de significância $p < 0,05$.

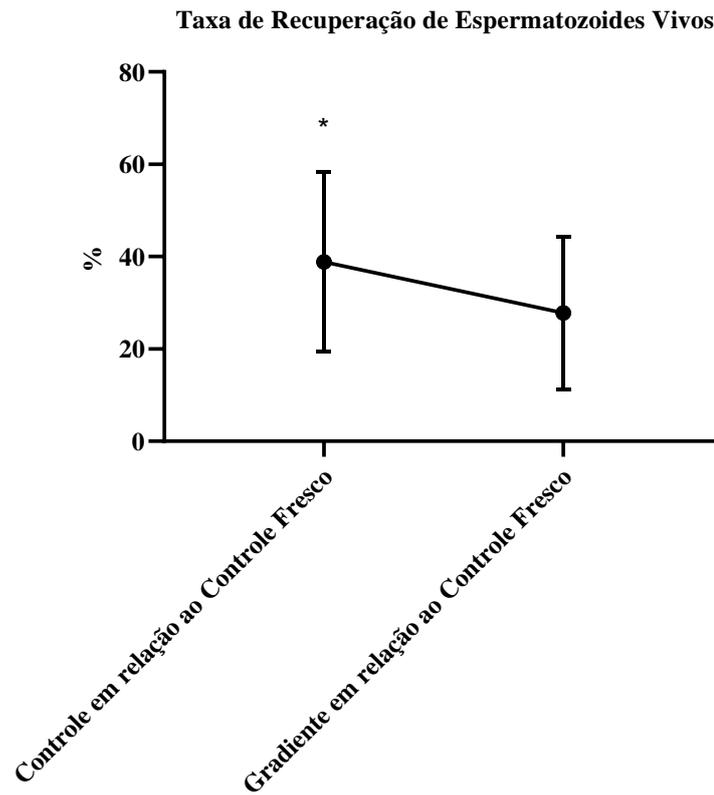


Figura 7: Comparação da taxa de recuperação de espermatozoides vivos pós-descongelamento do grupo Controle e do grupo Gradiente, ambos em relação ao Controle Fresco (antes do congelamento). Valores apresentados em médias e barras de desvio-padrão. Valor de significância $p < 0,05$.

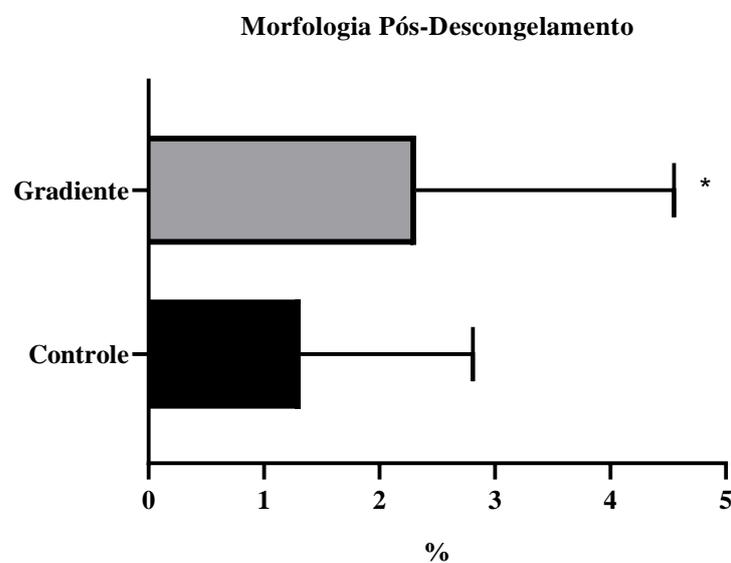


Figura 8: Porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais avaliada após o descongelamento dos grupos Controle e Gradiente. Valores representados em médias e barras de desvio-padrão. Valor de significância $p < 0,05$.

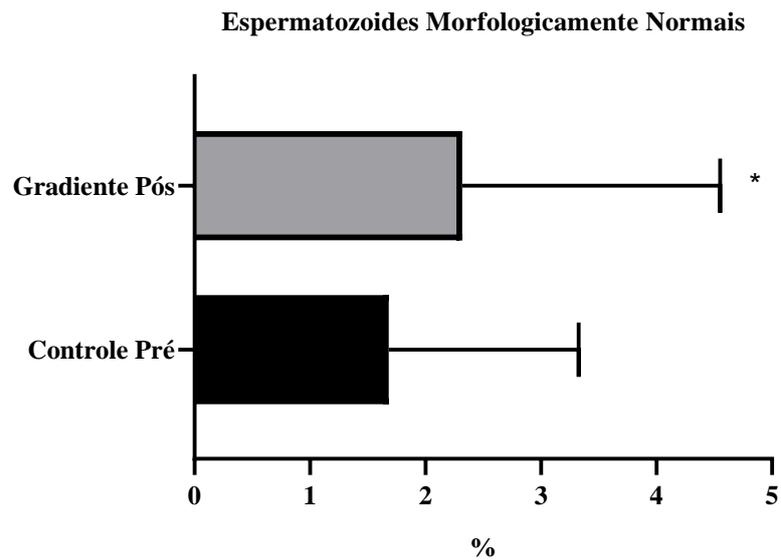


Figura 9: Porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais do grupo Gradiente após o descongelamento comparada a porcentagem avaliada no grupo Controle fresco, antes do congelamento. Valores representados em médias e barras de desvio-padrão. Valor de significância $p < 0,05$.

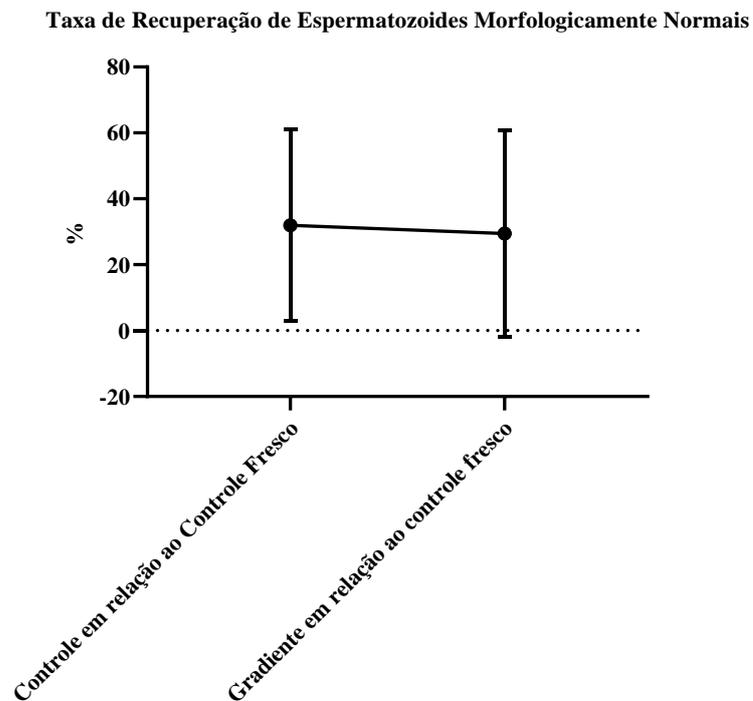


Figura 10: Comparação da taxa de recuperação de espermatozoides morfolologicamente normais pós-descongelamento do grupo Controle e do grupo Gradiente, ambos em relação ao Controle Fresco (antes do congelamento). Valores representados em médias e barras de desvio-padrão. Valor de significância $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

A criopreservação de espermatozoides é uma ferramenta muito importante e amplamente difundida na medicina reprodutiva. Entretanto, as taxas de recuperação de espermatozoides viáveis no descongelamento ainda se mostram muito abaixo do ideal (100%) e uma constante busca por procedimentos mais eficazes se torna necessário.

Os parâmetros seminais avaliados nesse trabalho foram concentração de espermatozoides totais, de espermatozoides móveis progressivos e móveis totais, e os percentuais de motilidade progressiva e motilidade total, morfologia e vitalidade. Esses critérios são apontados na literatura como indicadores da qualidade seminal e consequentemente, são utilizados como preditores de taxas de sucesso de fertilização. Contudo, diversos trabalhos questionam a sensibilidade e eficiência desses parâmetros como indicativos de boas taxas de fertilização. Agarwal e Allamaneni relatam que em torno de 15% dos pacientes com fator masculino de infertilidade comprovada não apresentam alterações desses parâmetros (AGARWAL & ALLAMANENI, 2005). Defeitos na reação acrossômica do espermatozoide e na interação dos espermatozoides com a zona pelúcida do oócito estão associados a baixas taxas de fertilização, além de falha total na fertilização (BARRATT et al., 2011; OEHNINGER et al., 2014). Tais defeitos foram encontrados em homens inférteis com análises seminais básicas dentro da normalidade. A OMS descreve alguns testes funcionais, isto é, que não inviabilizam a amostra seminal como um todo, que avaliam de forma mais adequada o potencial de fertilização dos espermatozoides (WHO, 2010). Dentre esses testes, podemos citar a avaliação da ligação do espermatozoide aos receptores da zona pelúcida, liberação do conteúdo acrossomal e fusão com a membrana vitelínica do óvulo. Todavia, esses testes ainda são de difícil aplicação na rotina laboratorial, apesar de terem sido demonstrados como mais efetivos na determinação do potencial de fertilização do espermatozoide. Além disso, já foi mostrado que o congelamento seminal altera a composição da membrana plasmática (BELL et al., 1993) e membrana acrossomal do espermatozoide (MCLAUGHLIN, 1993), levando a erros na interação deste com o óvulo e bloqueios na liberação do conteúdo acrossomal. Essas disfunções estão diretamente associadas às baixas taxas de fertilização a partir de sêmen criopreservado (OEHNINGER, 2000). Dessa forma, apesar de não serem análises de fácil aplicação e viabilidade na rotina laboratorial, poderiam ser mais eficazes na comparação dos espermatozoides criopreservados em cada grupo neste trabalho.

A técnica de GDD já está muito bem consolidada na literatura e é aplicada diariamente no preparo seminal de amostras para técnicas de reprodução assistida. Já foi provado por diversos autores que o GDD aumenta a motilidade, vitalidade e morfologia de amostras seminais (HAMMADEH et al, 2001; SAKKAS et al, 2000). Além desses parâmetros, é comprovada a redução de ROS (DAS et al, 2008; TAKESHIMA et al, 2017) e de espermatozoides com fragmentação de DNA pelo processamento por GDD (PUNJABI et al, 2018). Os dados pré-congelamento do grupo Gradiente apresentados no presente estudo corroboram os dados da literatura, visto que a técnica de GDD melhorou os parâmetros analisados. Os resultados descritos nesse trabalho e na literatura justificam a escolha do processamento por GDD como um bom método para separação do plasma seminal e seleção dos melhores espermatozoides das amostras.

Muitos trabalhos foram realizados para investigar os efeitos do processamento seminal antes do congelamento e/ou após o descongelamento. Análises de diferentes parâmetros foram realizadas com o intuito de melhorar as taxas de recuperação de espermatozoides e as taxas de fertilização destes. Fabozzi e colaboradores compararam a criopreservação de espermatozoides com e sem plasma seminal (isolado pela técnica *Sperm Wash*), com dois meios comerciais de congelamento diferentes. Eles observaram que a motilidade e viabilidade dos espermatozoides (porcentagem de espermatozoides vivos) congelados diretamente com o plasma seminal após o descongelamento eram estatisticamente melhores que o teste sem o plasma seminal, independente do meio e congelamento utilizado (FABOZZI, 2016). Por outro lado, Petyim e colaboradores mostraram que a motilidade após o descongelamento de espermatozoides criopreservados processados, pela técnica de *swim-up* antes do congelamento, eram maiores que os espermatozoides processados após o descongelamento (PETYIM et al, 2014). Uma provável explicação dos achados contraditórios de Petyim aos de Fabozzi é que no estudo realizado por Petyim, além da separação do plasma seminal dos espermatozoides, a técnica de *swim-up* também seleciona os espermatozoides e descarta espermatozoides mortos e debris geradores de ROS. Em contrapartida, Allamaneni e colaboradores descreveram resultados que apontam a técnica de processamento por GDD previamente ao congelamento como superior nos quesitos motilidade e taxa de recuperação de espermatozoides vivos (sobrevivência) comparado com a técnica de *swim-up* (ALLAMANENI et al, 2005).

No presente trabalho, a motilidade progressiva, motilidade total, vitalidade e morfologia normal dos espermatozoides foram superiores no grupo processado pela técnica de GDD previamente à criopreservação ao grupo não processado. Entretanto, não houve diferenças

significativas nas taxas de recuperação de espermatozoides móveis progressivos e móveis totais e morfológicamente normais. A comparação das taxas de recuperação desses três parâmetros nos grupos estudados foi considerada relevante para esse estudo, uma vez que essas taxas refletem melhor o impacto do protocolo proposto nos experimentos do que simplesmente as porcentagens de motilidade e morfologia medidas ao final do descongelamento. Nossos resultados corroboram parcialmente os encontrados no artigo publicado por Brugnon e colaboradores. Assim como no presente estudo, Brugnon e colaboradores (cols.) mostraram que as taxas de recuperação de espermatozoides morfológicamente normais não diferem em amostras criopreservadas processadas ou não por GDD. Contudo, Brugnon e cols. também relataram que as taxas de recuperação de espermatozoides móveis progressivos e móveis totais em amostras criopreservadas por GDD são superiores às não processadas. Podemos sugerir que essa diferença dos achados de Brugnon e cols. aos nossos, foram causadas pelos altos níveis de força de centrifugação aplicadas às amostras. Em nosso trabalho, foram aplicadas forças de centrifugação de 200g e em Brugnon e cols., forças de 750g, pois esses autores afirmam que de acordo com a sua experiência prática, essas forças promovem melhores taxas de recuperação de espermatozoides (BRUGNON et al, 2013).

Ao avaliarmos a vitalidade dos espermatozoides ao final do descongelamento nos grupos estudados, foi constatada superioridade do grupo Gradiente em relação ao grupo Controle. Por outro lado, a taxa de recuperação de espermatozoides vivos do grupo Gradiente após o descongelamento foi significativamente inferior ao grupo Controle. Como abordado anteriormente, é comprovado na literatura que o processamento por GDD seleciona espermatozoides de melhor motilidade, morfologia, vitalidade e melhor integridade de material genético, sendo esse último um dado não avaliado neste trabalho, mas bem estabelecido na reprodução assistida. De fato, observamos uma maior perda de espermatozoides vivos no grupo Gradiente em relação ao Controle. Contudo, podemos justificar essa considerável perda do grupo Gradiente pela baixa qualidade dos espermatozoides nas amostras iniciais, do ejaculado antes do congelamento. Encontrar mais espermatozoides vivos isoladamente não significa encontrar espermatozoides de melhor qualidade.

Diante da superioridade demonstrada nesse estudo quanto aos critérios motilidade, vitalidade e morfologia do grupo Gradiente, mas não das taxas de recuperação de espermatozoides de móveis, vivos e morfológicamente normais, sugerimos uma abordagem diferente das amostras na decisão do protocolo de congelamento. O melhor protocolo de congelamento de amostras seminais depende da particularidade de cada amostra analisada.

Propomos com esse trabalho que o protocolo de preparo das amostras para criopreservação não seja padronizado. O panorama da qualidade seminal de homens inférteis é extremamente variável, apresentando muitos parâmetros seminais divergentes entre si, dentro da mesma amostra seminal e amostras diferente do mesmo paciente. Dessa forma, recomendamos que o protocolo de preparo seminal para criopreservação adotado seja baseado no procedimento de reprodução assistida que será aplicado como desfecho final de uso da amostra criopreservada. Amostras seminais que seriam congeladas com a finalidade de realização de IIU deveriam ser criopreservadas a partir do protocolo convencional (grupo Controle), com o plasma seminal. Como a técnica de IIU requer uma alta concentração de espermatozoides, o protocolo convencional seria mais adequado, pois esse apresenta maior recuperação de espermatozoides.

No entanto, caso a finalidade fosse ICSI, o protocolo mais adequado seria o proposto no grupo Gradiente. Como o protocolo do grupo Gradiente fornece amostras com maior proporção de espermatozoides móveis, vivos e morfologicamente normais, esse protocolo seria mais conveniente. Na ICSI, é mais relevante ter maiores probabilidades de encontrar espermatozoides de boa qualidade, em termos de motilidade, vitalidade e morfologia (porcentagem), do que valores absolutos desses parâmetros (concentração de espermatozoides).

Infelizmente, em alguns casos não é possível determinar a técnica de RA que será aplicada (IIU, FIV ou ICSI) para o paciente futuramente, no momento da coleta da amostra para criopreservação. Nesses casos, é orientado que a decisão da estratégia do congelamento seja feita a partir dos parâmetros seminais da amostra, levando em consideração os dados obtidos em nossa pesquisa.

Com o advento da ICSI, tornou-se possível a fertilização de óvulos a partir de sêmens com alterações críticas nos parâmetros seminais, alcançando melhores resultados de gestação, mesmo a partir de amostras criopreservadas. Essa conquista pode ter suprimido a busca por um protocolo ideal de congelamento seminal. Poucos artigos foram publicados na comunidade acadêmica acerca do assunto nos últimos anos e os existentes apresentam abordagens muito divergentes em relação as possíveis melhorias no congelamento. Além disso, os resultados disponíveis sobre as mesmas linhas de abordagem também apresentam muitas disparidades entre si.

O trabalho em questão apresentou resultados preliminares de comparação do congelamento de espermatozoides entre amostras seminais não processadas e processadas pela

técnica de GDD. Mais desdobramentos se fazem necessários para determinação do protocolo ideal de congelamento seminal, como por exemplo, avaliações da taxa de fertilização, implantação de embriões e gestações a termo, a partir de sêmens criopreservados.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, não foi possível determinar um melhor protocolo padrão único de criopreservação para todas as amostras a serem congeladas. O melhor protocolo de congelamento pode variar, dentre outros fatores, da técnica de RA que será aplicada como desfecho.

Para IIU, o melhor protocolo de congelamento é o tradicional, realizado no grupo Controle, isto é, com a presença do plasma seminal. Já para ICSI, o protocolo mais indicado seria o aplicado no grupo Gradiente, isto é, sem a presença do plasma seminal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A. & ALLAMANENI, S.S. **Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come.** *Fertility and Sterility*; v. 8; p. 850–3 (2005).

AGARWAL, A. & ALLAMANENI, S. S. R. **Artificial Insemination.** *Infertility and Recurrent Pregnancy Loss.* v. 6, n. 36 (2007).

AGARWAL, A.; MAKKER, K. & SHARMA, R. **Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update.** *American Journal of Reproductive Immunology*, n. 59, p. 2–11 (2008).

AHMADI, M.; YASEMI, M.; PEYMAN, H.; HEMATI, K.; KHAJAVIKHAN, J.; YAGHOUBI, M.; BIMANAND, L. **Associated Factors with Male Infertility: A Case Control Study.** *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 8, n. 9; p. 11- 13 (2014).

ALLAMANENI, S.S.R.; AGARWAL, A.; RAMA, S.; RANGANATHAN, P.; SHARMA, R.K. **Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa.** *Asian Journal of Andrology*; v. 7, n. 1: p. 86–92 (2005).

ARAÚJO, C.H.M.; ARAÚJO, M.C.P.M.; MARTINS, W.P.; FERRIANI, R.B.; REIS, R.M. **Gametogênese: Estágio fundamental do desenvolvimento para reprodução humana.** *Medicina, Ribeirão Preto*; v.40, n.4; p. 551-8 (2007).

BARRATT, C.L., MANSELL, S., BEATON, C., TARDIF, S., OXENHAM, S.K. **Diagnostic tools in male infertility-the question of sperm dysfunction.** *Asian Journal of Andrology*; v. 13: p. 53–8 (2011).

BELL, M., WANG, R., HELLSTROM, W.J.G., SIKKA, S.C. **Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm.** *Journal of Andrology*, n. 14: p. 472–478 (1993).

BARTHELEMY, C., ROYERE, D., HAMAMAH, S., LEBOS, C., THARANNE, M.J. & LANSAC, J. **Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation.** *Archives of Andrology*. v. 25, p. 29 – 40 (1990).

BROKAW, C. J. **Calcium-induced asymmetrical beating of triton-demembrated sea urchin sperm flagella.** *The Journal of Cell Biology*, v. 82, p. 401–411 (1979).

BRUGNON, F.; OUCHCHANE, L.; PONS-REJRAJIL, H.; ARTONNE, C.; FARIGOULE, M. and JANNY, L. **Density gradient centrifugation prior to cryopreservation and hypotaurine supplementation improve post-thaw quality of sperm from infertile men with oligoasthenoteratozoospermia.** *Human Reproduction*, v.28, No.8 p. 2045–2057, (2013).

CORDIKI, G., MONTOYA, F., HERNANDEZ-HERRERA, P., RIOS-HERRERA, W. A., MULLER, M. F., TREVINO, C. L., DARSZON, A. **Are there intracellular Ca²⁺ oscillations correlated with flagellar beating in human sperm? A three vs. two-dimensional analysis.** *Molecular Human Reproduction*, v. 23, p. 583–593 (2017).

COUNSEL, M.; BELLINGE, R. and BURTON, P. **Vitality of Oligozoospermic Semen Samples Is Improved by Both Swim-Up and Density Gradient Centrifugation Before Cryopreservation.** *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 21, No. 5 (2004).

DARSZON, A., NISHIGAKI, T., BELTRAN, C., TREVIÑO, C.L. **Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa.** *Physiological Reviews - American Journal of Physiology*, n. 4, p. 1305-55 (2011).

DAS, S., CHATTOPADHYAY, R., JANA, S.K., NARENDRA, B.K., CHAKRABORTY, C., CHAKRAVARTY, B., CHAUDHURY, K. **Cut-off value of reactive oxygen species for predicting semen quality and fertilization outcome.** *Systems Biology in Reproductive Medicine*, v. 54; p. 47–54 (2008).

DEVROEY, P. and VAN STEIRTEGHEM, A. **A review of ten years experience of ICSI.** *Human Reproduction Update*, v.10, No.1 p. 19- 28 (2004).

DRABOVICH, A. P.; SARAON, P.; JARVI, K.; DIAMANDIS, E.P. **Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders.** *Nature Reviews Urology* n. 11, p. 278–288 (2014).

ESTEVEZ, S.C.; VARGHESE, A.C. **Laboratory handling of epididymal and testicular spermatozoa: What can be done to improve sperm injections outcome.** *Journal of Human Reproduction Science*. p. 233-43 (2012).

FABOZZI, G., STARITA, M.F., REGA, E., ALTERI, A.1., COLICCHIA, A., PISCITELLI, C., GIANNINI, P. **Evaluation of the Efficiency of Two Different Freezing Media and Two Different Protocols to Preserve Human Spermatozoa from Cryoinjury.** *International Journal of Reproductive Medicine* (2016).

FACIO, C.L., PREVIATO, L.F., MACHADO-PAULA, L.A., MATHEUS, P.C., ARAÚJO, E. F. **Comparison of two sperm processing techniques for low complexity assisted fertilization: sperm washing followed by swim-up and discontinuous density gradient centrifugation.** *JBRA Assisted Reproduction*. v. 1; 20 (4); p. 206-211 (2016).

GANGRADE, B.K. **Cryopreservation of testicular and epididymal sperm: techniques and clinical outcomes of assisted conception.** *Clinics (Sao Paulo)*; 68 Suppl 1:131-40 (2013).

GRIZARD, G.V.; CHEVALIER, J.F.; GRIVEAU, D.; LANNOU, L., BOUCHER, D. **Influence of seminal plasma on cryopreservation of human spermatozoa in a biological**

material free-medium: study of normal and low quality sêmen. *International Journal of Andrology*, n. 22; p. 190-196 (1999).

GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica** 10. Ed. Rj . Guanabara Koogan, (2002).

HAMMADEH, M.E.; KUHNEN, A.; AMER, A.S.; ROSENBAUM, P.; SCHMIDT, W. **Comparison of sperm preparation methods: effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer.** *International Journal of Andrology*; n. 24: p. 360–8 (2001).

HOLT, W.V., VAN LOOK, K.J.W. **Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality.** *Reproduction*; n. 127: p. 527–535 (2004).

LIU, T.; GAO, J.; ZHOU, N.; MO, M.; WANG, X.; ZHANG, X.; YANG, H.; CHEN, Q.; AO, L.; LIU, J.; CUI, Z.; CAO, J.; **The effect of two cryopreservation methods on human sperm DNA damage.** *Cryobiology* (2016).

KHOSROWBEYGIA, A. and ZARGHAMIB, N. **Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males.** *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* n. 77, p. 117–121 (2007).

KRUGER, T.F.; MENVELD, R.; STANDER, F.S.H.; LOMBARD, C.J.; VANDER MERWER, J.P.; VANZYL, J.A.; SMITH, K.. **Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization.** *Fertility and Sterility*, n. 46: p. 1118-23 (1986).

KRUGER, T.F.; ACOSTA, A.A.; SIMMONS, K.F.; SWANSON, J.; MATTA, J.F.; VEECK, L.L.; MORSHEDI, M.; BRUGO, S.; **New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization.** *Urology*, v. 30, n. 3, p. 248-251, September (1987).

MCLAUGHLIN, E.A., FORD, W.C.L., HULL, M.G.R.: **Effects of cryopreservation on the human sperm acrosome and its response to A23187.** *Journal of Reproduction and Fertility*, n. 99: p. 71–76 (1993).

MANN, T. **The Biochemistry of Semen and the Male Reproductive Tract.** 2nd edition, ~21. Methuen and Co. Ltd. London (1964).

MARTÍNEZ-SOTO, J.C.; LANDERAS, J.; GADEA, J. **Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success.** *Andrology*, v. 1, p. 365–375 (2013).

MASCARENHAS, M.N.; FLAXMAN, S.R.; BOERMA, T.; VANDERPOEL, S; STEVENS, G.A. **National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys.** *PLoS Med* ; v. 9:p. 1–12 (2012b).

MATSON, P.L., YOVICH, J.L. **The treatment of infertility associated with endometriosis by in vitro fertilization.** *Fertility and Sterility*; v. 46:p. 432–4 (1986).

MATTOS, A.L.G; BOS-MIKICH, A.; GIGANTE, L.P.; GONÇALVES, D.O.; BENCHAYA, S.S.; FERRARI, A. **Comparison between the characteristics of human semen preserved at +4oC and –196oC for 24 hours.** *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.25 n.10 Rio de Janeiro (2003).

MENKVELD, R., WONG, W.Y., LOMBARD, C.J., WETZELS, A.M., THOMAS, C.M., MERKUS, H.M., STEEGERS-THEUNISSEN, R.P. **Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: na effort towards standardization of in-vivo thresholds.** *HumanReproduction*; p. 1165-1171 (2001).

OEHNINGER, S.; DURU, N.K.; SRISOMBUT, C.; MORSHEDI, M.: **Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 169; p. 3–10 (2000)

OEHNINGER, S., FRANKEN, D.R., OMBELET, W. **Sperm functional tests.** *Fertility and Sterility®*, v. 102, n. 6 (2014).

OMBELET, W., COOKE, I., DYER, S., SEROUR, G., DEVROEY, P. **Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries.** *Human Reproduction Update*; v.14; p. 605–621 (2008a).

OMBELET, W., DEVROEY, P., GIANAROLI, L., TEVELDE, E. & eds. **Developing Countries and Infertility.** *Spec Issue Human Reprod*; 1 –117 (2008b).

PALERMO, G.D.; NERI, Q.V.; TAKEUCHI, T.; ROSENWACKS, Z. **ICSI: where we have been and where we are going.** *Seminars in Reproductive Medicine*; v. 27; p. 191 –201 (2009).

PATRIZIO, P. **Cryopreservation of epididymal sperm.** *Molecular Cell Endocrinology*. V. 169 (1-2); p. 11-4 (2000).

PEREZ-CEREZALES, S., RAMOS-IBEAS, P., ACUNA, O.S., AVILES, M., COY, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A. **The oviduct: from sperm selection to the epigenetic landscape of the embryo.** *Biology of Reproduction*, v. 98, n.3, p. 262–276 (2018).

PETYIM, S.; NEUNGTON, C.; THANABOONYAWAT, I.; LAOKIRKKIAT, P.; and CHOAVARATANA, R. **Sperm preparation before freezing improves sperm motility and reduces apoptosis in post-freezing-thawing sperm compared with post-thawing sperm preparation.** *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 31, no. 12, p.1673–1680 (2014).

PUNJABI, U.; VAN MULDER, H.; GOOVAERTS, I.; PEETERS, K.; CLASEN, K.; JANSSENS, P.; ZEMTSOVA, O.; DE NEUBOURG, D. **Sperm DNA fragmentation in the total and vital fractions before and after density gradient centrifugation: Significance in male fertility diagnosis.** *Clinical Biochemistry* (2018)

POLGE, C., SMITH, A. U., PARKES, A. S. **Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.** *Nature*, v.164, n.666, (1949).

ROUEN, A., BALET, R., DORNA, M., HYON, C., POLLET-VILLARD, X., CHANTOT-BASTARAUD, S., JOYE, N., PORTNOI, M., CASSUTO, N.G., SIFFROI, J.P. **Discontinuous gradient centrifugation (DGC) decreases the proportion of chromosomally unbalanced spermatozoa in chromosomal rearrangement carriers.** *Human Reproduction*, v. 28, n. 7, p. 2003–2009 (2013).

RUSSEL, L.D., ETTLIN, R.A., HIKIM, A.P.S., CLEGG, E.D. **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis.** *International Journal of Andrology*, v. 16; n.83 (1993).

SATI, L., CAYLI, S., DELPIANO, E., SAKKAS, D., HUSZAR, G. **The Pattern of Tyrosine Phosphorylation in Human Sperm in Response to Binding to Zona Pellucida or Hyaluronic Acid.** *Reproductive Sciences*, v. 21; n. 5; p. 573-581 (2014).

SAKKAS, D.; MANICARDI, G.C.; TOMLINSON, M.; MANDRIOLI, M.; BIZZARO, D.; BIANCHI, P.G. et al. **The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies.** *Human Reproduction*, n. 15; p. 1112–6 (2000).

SAKKAS, D. **Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection.** *Fertility and Sterility*® v. 99, No. 4 (2013).

SCHIMID, E.T.; GRANT, P.G.; MARCHETTI, F.; WELDON, R.H.; ESKENAZI, B. and WYROBEK, A.J. **Elemental composition of human semen is associated with motility and genomic sperm defects among older men.** *Human Reproduction*, v.28, No.1 p. 274–282 (2013).

SHABTAIE, S.A.; GERKOWICA, S.A.; KOHN, T.P.; RAMASAMY, R. **Role of Abnormal Sperm Morphology in Predicting Pregnancy Outcomes.** *Current Urology Reports*, v. 17; n. 67 (2016).

SHEKARRIZ, M., DEWIRE, D.M., THOMAS, A.J. & AGARWAL, A. **A method of human sêmen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species.** *European Urology* v. 28, p. 31 – 35 (1995).

SHERMAN, J. K. **Freezing and freeze-drying of human spermatozoa.** *Fertility and Sterility*. v. 5; n. 357 (1954).

SHERMAN, J. K. **Preservation of bull and human spermatozoa by freezing in liquid nitrogen vapour.** *Nature* v. 194; n. 1291 (1962).

SHERMAN, J. K. **Banks for frozen stored human spermatozoa.** Proc. 11 Int. Cong. Genetics 1:273 (1963).

STANICA, P.; TANDARA, M.; SONICKIB, Z.; SIMUNICA, V.; RADAKOVICA, B.; SUCHANEK, E. **Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human sêmen.** *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 91, p. 65–70 (2000).

SILVERTHORN, D.U. **Fisiologia Humana: Uma abordagem Integrada**. 5ª edição. *ArtMed* editora (2010).

TAKESHIMA, T., YUMURA, Y., KURODA, S., KAWAHARA, T., UEMURA, H., IWASAKI, A. **Effect of density gradient centrifugation on reactive oxygen species in human semen**. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. v. 63, n. 3, p. 192-198 (2017).

TAVILANI, H.; GOODARZI, M.T.; VAISI-RAYGANI, A.; SALIMI, S.; HASSANZADEH, T. **Activity of Antioxidant Enzymes in Seminal Plasma and their Relationship with Lipid Peroxidation of Spermatozoa**. *Clinical Urology*. Vol. 34 (4): p. 485-491 (2008).

THEROND, P.; AUGER, J.; LEGRAND, A.; JOUANNET, P. **Alpha-tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes**. *Molecular Human Reproduction* 2, p. 739–744 (1996).

THIJSEN, A., MEIER, A., PANIS, K., OMBELET, W. **Fertility Awareness-Based Methods' and subfertility: a systematic review**. *Facts, Views and Visions in Obgyn*, v. 6, n. 3, p. 113-123 (2014).

WUNDRICH, K., PAASCH, U., LEICHT, M., et al. **Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation—an immunoblot study**. *Cell Tissue Bank*, v. 7; p. 81–90 (2006).

WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th ed. (2010).

YAMANAKA, M., TOMITA, K., HASHIMOTO, S., MATSUMOTO, H., SATOH, M., KATO, H., HOSOI, Y., INOUE, M., NAKAOKA, Y., MORIMOTO, Y. **Combination of density gradient centrifugation and swim-up methods effectively decreases morphologically abnormal sperms**. *Journal of Reproduction and Development*. v. 20, n. 62 (6); p. 599-606 (2016).

YOSHIDA, M., & YOSHIDA, K. **Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by Ca²⁺**. *Molecular Human Reproduction*, v. 17, p. 457–465 (2011).

ZHAO, F., YANG, Q., SHI, S., LUO, X., SUN, Y. **Semen preparation methods and sperm telomere length: density gradient centrifugation versus the swim up procedure**. *Scientific Reports*. v. 6, n: 39051 (2016).