

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

**APRIMORAMENTO DO CONGELAMENTO DE SÊMEN HUMANO: EFEITO DA
CONCENTRAÇÃO SEMINAL NO RESULTADO DO PROTOCOLO**

CAIO LUIS VIEIRA WERNECK

RIO DE JANEIRO

2019

CAIO LUIS VIEIRA WERNECK

**APRIMORAMENTO DO CONGELAMENTO DE SÊMEN HUMANO: EFEITO DA
CONCENTRAÇÃO SEMINAL NO RESULTADO DO PROTOCOLO**

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. Dr. Marcel Frajblat

Rio de Janeiro

2019

Ficha Catalográfica

Werneck, Caio Luis Vieira.

Aprimoramento do congelamento de sêmen humano: efeito da concentração seminal no resultado do protocolo . / Caio Luis Vieira Werneck. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2019.
53 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Marcel Frajblat.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica, 2019.

Referências: f. 44-53.

1. Criopreservação. 2. Sêmen. 3. Contagem de Espermatozoides. 4. Reprodução. 5. Técnicas de Reprodução Assistida. - Formação para a pesquisa Biomédica - tese. I. Marcel Frajblat. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós Graduação em Pesquisa Biomédica. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais, Tulza e Ely, pelo amor incondicional, pelo incentivo e pelos bons exemplos dados ao longo da vida.

Ao meu irmão, Ely, que nunca fez da distância um problema para estar ao meu lado.

À minha esposa, Caroline, meu porto seguro nos piores momentos e parceira nos melhores.

À minha filha, Àgatha, minha maior razão para seguir adiante.

Aos amigos e familiares pelo apoio.

À UFRJ por abrir suas portas.

Ao meu orientador, Marcel, por toda ajuda, incentivo e ensinamentos.

À minha amiga, Caroline, pela companhia diária nessa jornada.

À equipe do Vida Centro de Fertilidade, companheiros e amigos de trabalho.

Concedei-me, Senhor, a serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para modificar aquelas que posso e sabedoria para conhecer a diferença entre elas. Vivendo um dia de cada vez; desfrutando um momento de cada vez; aceitando que as dificuldades constituem o caminho à paz; aceitando, como Ele aceitou, este mundo tal como é, e não como Ele queria que fosse; confiando que Ele acertará tudo contanto que eu me entregue à Sua vontade; para que eu seja razoavelmente feliz nesta vida e supremamente feliz com Ele eternamente na próxima.

Oração da Serenidade.

RESUMO

Werneck, Caio Luis Vieira. **Aprimoramento do congelamento de sêmen humano: efeito da concentração seminal no resultado do protocolo 2019**. 53 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A criopreservação de sêmen é uma técnica muito utilizada na reprodução assistida em casos de: homens com poucos espermatozoides, prévia a utilização de quimioterápicos, vasectomias ou cirurgias no aparelho reprodutor masculino ou ainda, com o intuito de doação seminal. Na rotina clínica, o protocolo de congelamento seminal independe da concentração de espermatozoides da amostra. O objetivo deste estudo foi investigar se amostras seminais de um mesmo paciente, em concentrações específicas de 30, 15, 5 e 1 milhão de espermatozoides por ml, comparadas com uma amostra controle, em que não houve alteração da concentração original, tiveram a mesma taxa de recuperação da motilidade espermática e taxa de sobrevivência espermática com o uso do mesmo protocolo de criopreservação. Foram criopreservadas 20 amostras de voluntários que compareceram à Clínica Vida para a realização de exame seminal. Os resultados obtidos não mostraram alteração na taxa de recuperação da motilidade espermática tampouco na taxa de sobrevivência espermática, devido a variação da concentração espermática, após o descongelamento. Houve correlação forte, positiva e significativa entre a taxa de recuperação da motilidade espermática e a taxa de sobrevivência espermática ($r=0,9564^*$, $p<0,05$). A correlação entre indicadores de qualidade seminal (concentração e motilidade progressiva) e a taxa de recuperação da motilidade espermática foi fraca e não significativa. A concentração seminal não interferiu na taxa de recuperação da motilidade espermática. Não houve evidência para modificar protocolos de criopreservação de acordo com a concentração espermática inicial da amostra seminal.

Palavras-chave: Criopreservação; sêmen; concentração espermática.

ABSTRACT

Werneck, Caio Luis Vieira. **Improvement of human semen freezing: effect of seminal concentration on protocol outcome** 2019. 53 f. Dissertation (Professional Master in Biomedical Research) - Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Semen cryopreservation is a technique widely used in assisted reproduction in cases of: men with few sperm, prior to the use of chemotherapeutic drugs, vasectomies or surgeries in the male reproductive system or even for seminal donation. In the clinical routine, the seminal freezing protocol is independent of the sperm concentration of the sample. The aim of this study was to investigate whether seminal samples from the same patient, at specific concentrations of 30, 15, 5 and 1 million sperm per ml, compared with a control sample, where there was no change in the original concentration, had the same rate of sperm motility recovery and sperm survival rate using the same cryopreservation protocol. Twenty samples of volunteers who attended the Vida Fertility Center for seminal examination were cryopreserved. The results showed no change in sperm motility recovery rate or sperm survival rate due to sperm concentration variation after thawing. There was a strong, positive and significant correlation between sperm motility recovery rate and sperm survival rate ($r = 0.9564$ *, $p < 0.05$). The correlation between seminal quality indicators (concentration and progressive motility) and sperm motility recovery rate was weak and not significant. Seminal concentration did not affect sperm motility recovery rate. There was no evidence to modify cryopreservation protocols according to the initial sperm concentration of the seminal sample.

Keyword: Cryopreservation; semen; sperm concentration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Taxa de recuperação da motilidade de cada um dos vinte voluntários em cada uma das concentrações estudadas (controle, 30, 15, 5 e 1 milhão de espermatozoides por ml).....	32
Figura 2: Taxa de sobrevivência espermática de cada um dos vinte voluntários em cada uma das concentrações estudadas (controle, 30, 15, 5 e 1 milhão de espermatozoides por ml).....	33
Figura 3: Correlação entre taxa de recuperação da motilidade espermática e taxa de sobrevivência espermática ($r=0.9564^*$, $p<0,05$).....	33
Figura 4: Percentuais de recuperação da motilidade média pelas diferentes concentrações espermáticas estudadas ($p=0.5774$).....	34
Figura 5: Percentuais de recuperação da motilidade média dos diferentes voluntários estudados.....	344
Figura 6: Correlação do percentual de recuperação da motilidade do grupo controle com a concentração espermática inicial da amostra ($r=-0.019$, ns).	35
Figura 7: Correlação do percentual de recuperação da motilidade do grupo controle com a motilidade progressiva inicial da amostra ($r=0.2154$, ns).....	355
Figura 8: Correlação do percentual de recuperação da motilidade média por voluntário com a concentração espermática inicial ($r=-0.063$, ns).....	366
Figura 9: Correlação do percentual de recuperação da motilidade média por voluntário com a motilidade progressiva inicial ($r=0.3341$, ns).....	37
Figura 10: Tabela resumo das correlações analisadas no presente estudo.	377

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

RNA – Ácido Ribonucleico

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina

LH – Hormônio Luteinizante

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

ABP – Proteína Ligadora de Andrógenos

WHO (do inglês, OMS) – Organização Mundial da Saúde

ASRH – Sociedade Americana de Reprodução Assistida

tRHA – Técnicas de Reprodução Humana Assistida

pH – Potencial Hidrogeniônico

IU – Inseminação Intra Uterina

FIV – Fertilização *in vitro*

ICSI – (do inglês) Injeção intracitoplasmática de espermatozoide

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada

LISTA DE SÍMBOLOS

TM – *Trademark*

°C – Graus centigrados

< – Menor que

ml – Mililitro

μL – Microlitro

® - Marca Registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. O aparelho reprodutor masculino	11
1.1.1. Líquido seminal	12
1.1.2. Espermatogênese	12
1.1.3. Espermio gênese	14
1.1.4. O espermatozoide	15
1.2. Reprodução assistida	15
1.2.1. Classificação espermática	16
1.2.2. Capacitação espermática	17
1.2.3. Processamento seminal na reprodução assistida	18
1.3. Criobiologia	19
1.3.1. Criopreservação do sêmen	20
1.3.2. Reprodução assistida e a criopreservação	22
1.4. Apresentação do Problema	24
1.5. Justificativa	25
1.6. Objetivos	26
2. MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1. Critérios de inclusão e exclusão:	27
2.2. Preparo das amostras:	28
2.3. Teste de vitalidade	28
2.4. Criopreservação das amostras	29
2.5. Descongelamento das amostras	29
2.6. Parâmetros avaliados	30
2.7. Análise estatística	30
2.8. Biossegurança	31
3. RESULTADOS	32
4. DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÃO	43
6. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. O aparelho reprodutor masculino

O sistema reprodutor masculino está anatomicamente organizado a partir dos testículos, do pênis e das glândulas acessórias que compreendem as vesículas seminais, a próstata e as glândulas bulbouretrais.

O testículo encontra-se anatomicamente no saco escrotal e é composto por cerca de 900 túbulos seminíferos convolutos, onde são formados os espermatozoides (gametas masculinos) (GUYTON, 2017). Após sua formação, os espermatozoides são conduzidos ao epidídimo onde ficam armazenados até o momento da ejaculação.

Durante o intercurso sexual os espermatozoides são deslocados, a partir do epidídimo, pelos canais deferentes, que se alargam imediatamente antes do canal adentrar no corpo da glândula prostática, na região denominada ampola prostática.

É na região da ampola prostática onde as duas vesículas seminais, que ladeiam a próstata, desembocam seu conteúdo rico em citocinas, prostaglandinas e frutose, contribuindo com o maior conteúdo molecular do sêmen (GONZALES, 2001). Os espermatozoides, juntamente com o conteúdo das vesículas seminais atravessam o agora denominado ducto ejaculatório através de toda a extensão do corpo da glândula prostática.

A próstata secreta seu conteúdo, rico em enzimas proteolíticas, citrato e lipídeos (MANN, 1974), no ducto ejaculatório, através dos ductos prostáticos. O ducto ejaculatório atinge a uretra prostática e, por fim, se encaminha a uretra.

A uretra é o último elo dos testículos com o exterior. A uretra contém muco proveniente das inúmeras e pequenas glândulas uretrais, localizadas em toda a sua extensão, e, em maior quantidade, das glândulas bulbouretrais (glândulas de Cowper), localizadas próximas da origem da uretra (GUYTON, 2017). As glândulas bubouretrais secretam galactose, ácido siálico e muco que lubrificam tanto percurso quanto o líquido seminal, tornando o transporte dos espermatozoides mais eficiente (MANN, 1974). Após percorrer toda extensão do pênis, a uretra se abre ao meio exterior.

1.1.1. Líquido seminal

O líquido seminal é o composto final da associação dos espermatozoides provenientes dos testículos e dos líquidos produzidos pelas glândulas acessórias (vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais).

De uma perspectiva funcional, o líquido seminal não só carrega e provê a nutrição dos espermatozoides como também modula a sua função e interação com o trato genital feminino, principalmente no que tange os componentes do sistema imunológico feminino (DRABOVICH et al., 2014).

Seu papel continua importante ao, regulando a liquefação e coagulação do sêmen, modular a motilidade e ativação dos espermatozoides. Sua função mais amplamente estabelecida reside em neutralizar do pH do trato genital feminino viabilizando a sobrevivência espermática (MANN, 1974).

Em sua composição entram diferentes macromoléculas (lipídeos, proteínas e carboidratos), íons inorgânicos e biopolímeros como DNA, RNA, microRNA e peptídeos. (DRABOVICH et al., 2014).

A frutose, carboidrato presente em abundância no líquido seminal, juntamente com os lipídeos formam as principais fontes de nutrição para os espermatozoides (LENZI et al., 1996). O zinco, íon inorgânico encontrado em abundância, está intimamente relacionado ao processo de coagulação e liquefação seminal (YOSHIDA et al., 2008). Os íons de cobre e selênio atuam como componentes cruciais de enzimas antioxidantes que são imprescindíveis para que a espermatogênese ocorra de forma correta (CAMEJO et al., 2011).

1.1.2. Espermatogênese

Os testículos, órgãos responsáveis pela espermatogênese, são também responsáveis pela síntese de hormônios sexuais, assumindo assim a função de glândulas. Seus hormônios asseguram a fertilidade, o desenvolvimento e a manutenção das características sexuais masculinas.

O controle hormonal sobre os testículos começa no eixo hipotálamo-hipofisário. O hipotálamo secreta, de forma pulsátil, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Este, por sua vez, estimula a hipófise a liberar o hormônio

luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH). Ambos hormônios são conhecidos por gonadotrofinas, uma vez que atuam diretamente sobre as gônadas masculinas, controlando a espermatogênese e a produção hormonal (GRIFFIN, 2003).

É na puberdade que começa a atuação do FSH sobre as células de Sertoli, estimulando-as a aumentar a produção da proteína ligadora de andrógenos (ABP). A testosterona (androgênio) circulante se liga a ABP (do inglês, proteína ligadora de andrógenos), assegurando sua alta concentração local. Esse aumento na concentração local de testosterona é fator imprescindível para que a espermatogênese ocorra (HEINLEIN, 2002).

O LH, juntamente com o FSH, atua na maturação das células de Leydig, induzindo-as a produzirem a testosterona que irá participar da formação dos caracteres masculinos secundários e da espermatogênese (PLANT, 2001).

Os caracteres masculinos secundários são a alteração na distribuição de pelos pelo corpo aumentando sua proporção na região do púbis, na parte superior da linha alba, na região da face e tórax; mudanças na voz devido a hipertrofia da mucosa laríngea e ao alargamento da laringe; aumento da espessura e rigidez da pele juntamente ao aumento na atividade das glândulas sebáceas, ocasionando acnes; aumento do anabolismo proteico culminando com o aumento da massa muscular; e aumento da taxa de metabolismo basal (LUIS et al., 2005.).

A espermatogênese pode ser definida como a complexa sequência de processos celulares que ocorrem nos túbulos seminíferos e resultam na formação do espermatozoide, o gameta masculino maduro (NETO et al., 2016.).

As células germinativas, presentes na gônada masculina desde o nascimento, são chamadas de células germinativas primordiais. Durante toda a infância elas se dividem lentamente por mitose e dão origem às espermatogônias (ARAÚJO et al, 2007). Ao atingir a puberdade, o indivíduo conta com aproximadamente 6 milhões de espermatogônias (AIRES, 2012)

Conforme Turek sintetizou em seu livro (TUREK, 2016), os processos da espermatogênese envolvem a proliferação das espermatogônias; a posterior diferenciação das espermatogônias em espermatócitos (cada espermatogônia dará origem a 16 espermatócitos); os espermatócitos são as células que passam pelo processo da meiose (processo reducional genético) produzindo, cada um, quatro espermátides redondas. As espermátides redondas amadurecem e passam pelo

processo de espermiogênese (diferenciação e especialização morfológico-celular). Através da espermiogênese é que as espermátides redondas se transformarem em espermatozoides maduros, que são liberados dentro do lúmen dos túbulos testiculares.

Estes espermatozoides maduros é que são aptos a cumprir sua função biológica, tornando-se os responsáveis por carrear toda informação genética paternal ao feto, possibilitando a perpetuação da espécie humana.

Estudos recentes demonstraram que todo o processo da gametogênese masculino dura em torno de 42 a 76 dias (MISELL et al., 2006) e que a capacidade de produção espermática diária em um homem sadio é em torno de 150 a 275 milhões de espermatozoides por dia (HELLER, 1964; AMANN, 2008).

1.1.3. Espermiogênese

Espermiogênese é o processo no qual uma espermátide redonda se transforma em um espermatozoide maduro. Diversas modificações citoplasmáticas e nucleares devem ocorrer para que o processo tenha êxito. Toda a formação da estrutura básica da membrana do espermatozoide ocorre durante a espermatogênese, período em que essas células ainda possuem no citoplasma as organelas essenciais à síntese celular, tais como o retículo endoplasmático (liso e rugoso) e o aparelho de Golgi (BARTH, 1989)

O acrossoma se organiza a partir do aparelho de Golgi (CLERMONT, 1995; OKO, 2009). O núcleo torna-se super-condensado com o auxílio de protaminas (substituem 85% das histonas) as quais possuem caráter básico, ricas em arginina e cisteína (KOSOWER, 1992). Torna-se mais condensado aumenta a proteção ao DNA e silencia, em sua maioria, a transcrição gênica (TANPHAICHITR et al., 1978; CONWELL, 2003; BIERMANN, 2007; KLEENE, 2003; SUN, 1997). A cauda do espermatozoide surge a partir dos centríolos, que gradualmente vão alongando a forma da espermátide. O número de mitocôndrias aumenta e ocorre sua aglomeração ao redor da base da cauda recém-formada, iniciando a formação da peça intermediária (SUTOVSKY, 2006; EDDY, 2003; AMARAL et al., 2013). O excesso de citoplasma contendo organelas residuais é removido, formando os corpos residuais que são fagocitados pelas células de Sertoli (BREUCKER, 1985).

1.1.4. O espermatozoide

O espermatozoide, gameta masculino, é dividido, didaticamente, em três partes: cabeça, peça intermediária e cauda. É na cabeça que se encontram o acrossoma (grande vesícula repleta de enzimas digestivas, em especial a hialuronidase) e o núcleo do espermatozoide (material genético haploide, responsável pela herança genética paterna).

Já na peça intermediária é onde se encontram as mitocôndrias, responsáveis por gerar toda energia necessária ao batimento flagelar e deslocamento celular.

A cauda, composta pelo alongamento dos centríolos, é a estrutura que realiza e possibilita, de fato, a propulsão para a natação do espermatozoide.

A importância da morfologia espermática e o sucesso dos tratamentos de fertilização *in vitro* já foram, há muito tempo, relacionados de forma concordante (KRUGER et al., 1986, 1987). A boa morfologia espermática permite a boa natação e o deslocamento contínuo do espermatozoide, afim de que ele se desloque em direção ao óvulo e possa fertilizá-lo.

1.2. Reprodução assistida

A *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) define a infertilidade como patologia do sistema reprodutor masculino ou feminino, que impede a concepção ou manutenção da gravidez com parto a termo. Define como infértil o casal que, após um período de doze meses com relações sexuais frequentes e sem a utilização de nenhum método contraceptivo, não atinge a gravidez, seja clínica ou apenas hormonal (ASRM, 2013).

A busca por tratamentos da infertilidade tem aumentado nos últimos anos. Como principais causadores deste aumento estão os hábitos da vida moderna como: uso indiscriminado de métodos contraceptivos; aumento da liberdade sexual ocasionando maior incidência de doenças sexualmente transmissíveis; aumento no número de casais que postergam a gestação em detrimento a sonhos de melhores posições, tanto sociais quanto profissionais (NASCIMENTO, 2009; DROSDZOL, 2009).

Nesse contexto, as técnicas de reprodução humana assistida (tRHA) se difundem dia após dia e são, continuamente, aprimoradas com o intuito de auxiliar casais acometidos pela infertilidade a realizarem o sonho de gerar um bebê.

1.2.1. Classificação espermática

A motilidade espermática é parâmetro fundamental dentro das funções do espermatozoide uma vez que sem ela não há condições da fecundação ocorrer de forma espontânea e natural. A Organização Mundial da Saúde (do inglês, *World Health Organization* - WHO), classifica a motilidade espermática em três categorias: motilidade progressiva, motilidade *in situ* e imotilidade (WHO, 2010).

Como motilidade progressiva são assim classificados os espermatozoides que se deslocam, de forma contínua em movimento retilíneo e rápido. São esses os espermatozoides com maior potencial de fertilização.

Como motilidade *in situ* são assim classificados os espermatozoides que apresentam movimentos que acusam sua viabilidade, porém se deslocam em pequenos círculos ou apenas se movem sem que haja deslocamento celular.

Como imotilidade são assim classificados os espermatozoides que não se movimentam, deixando o avaliador em dúvida se há viabilidade celular e apenas não há batimento flagelar ou se não há mais viabilidade celular (apoptose).

Segundo Grimes (2007) as alterações nos parâmetros seminais podem ser denominadas como:

- Normozoospermia: ausência de alterações, amostra normal para os parâmetros avaliados;
- Oligozoospermia: redução da concentração de espermatozoides presentes na amostra (<15 milhões de espermatozoides por ml);
- Astenozoospermia: redução da motilidade progressiva dos espermatozoides presentes na amostra (<32% de espermatozoides com motilidade progressiva);
- Teratozoospermia: alteração da morfologia espermática (<4% de espermatozoides com morfologia normal);
- Oligoastenoteratozoospermia: distúrbio nas três variáveis seminais;

- Azoospermia: ausência de espermatozoides no líquido seminal;
- Aspermia: ausência de ejaculado.

1.2.2. Capacitação espermática

O processo de capacitação espermática é natural e inclui transformações funcionais, estruturais e morfológicas do espermatozoide. Todas essas transformações acontecem com o intuito de que o espermatozoide se torne apto a fertilizar um ovócito com sucesso (AUSTIN, 1952).

Conceitualmente, acreditava-se que tais transformações ocorressem apenas quando, durante intercurso sexual, os espermatozoides fossem lançados ao trato genital feminino. E, mais ainda, acreditava-se que tais transformações ocorriam de forma progressiva, uma vez que *in vivo*, os espermatozoides demoram certo tempo para alcançarem a região da ampola, na tuba uterina, e iniciarem sua interação com os ovócitos.

Chang observou em 1951 que era possível se obter capacitação *in vitro* dos espermatozoides na presença de fluidos biológicos ou simples meios de cultura (CHANG, 1951). Em 1983 Bedford fez novo estudo para observar se essa capacitação precoce (*in vitro*) era potencialmente deletéria à fertilização (BEDFORD, 1983), no qual não foram encontrados indícios de prejuízo ao potencial de fertilização do espermatozoide precocemente capacitado.

Para se capacitar, o espermatozoide necessita que haja efluxo de colesterol da sua membrana plasmática (YANAGIMACHI, 1994). Isso se deve ao fato do colesterol agir como elemento regulador da fluidez das membranas ao posicionar-se entre as cadeias dos fosfolípidios, interferindo em sua interação, tornando a membrana menos fluida, aumentando sua densidade e temperatura de fusão (VOS, 2001).

O efluxo do colesterol da membrana dos espermatozoides se dá, principalmente, pela sua ligação à albumina presente no trato genital feminino (DAVIS, 1979; VISCONTI et al., 1998; OSHEROFF et al., 1999; WU et al., 2001).

Após o efluxo de colesterol ocorre o transporte ativo de íons de cálcio (Ca^{2+}), de bicarbonato (HCO_3^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), para o meio intracelular (GADELLA, 2001).

O aumento de Ca^{2+} é associado com a elevação do pH intracelular e promove mudanças conformacionais das proteínas de fusão da membrana plasmática com a membrana externa do acrossoma em pontos múltiplos. Essas mudanças culminam na fusão das membranas e liberação do conteúdo acrossomal (BARTH, 2002), processo conhecido por reação acrossômica. A reação acrossômica habilita o espermatozoide a penetrar através da zona pelúcida e a fundir-se com a membrana plasmática do ovócito (BARROS et al., 1967).

A modulação do íon cálcio é fundamental para os espermatozoides adquirirem capacidade de fertilização. Os espermatozoides possuem canais de cálcio que facilitam a rapidez com que esse influxo ocorre (FRASER, 1994). Fraser (1982) fez um estudo tratando os espermatozoides com ionóforo de cálcio e observou o rápido influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular e tal fato foi pós-cedido da imediata exocitose da região acrossômica (reação acrossômica).

Por outro lado, com o sucesso da primeira injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (PALERMO et al., 1992) ficou estabelecido que a reação acrossômica não é pré-requisito para que o núcleo do espermatozoide possa se ativar e participar no processo meiótico (LIU, 1998).

1.2.3. Processamento seminal na reprodução assistida

Em todos os casos onde houver necessidades de intervenção com as tRHA, sejam estas de baixa ou alta complexidade, deve-se realizar o processamento dos espermatozoides no laboratório. O processamento seminal visa tanto a seleção dos melhores gametas quanto a remoção de toxinas e contaminantes.

O processamento seminal pode ser feito através de técnicas amplamente difundidas como: gradiente de densidade, lavagem simples e *swim up*.

No gradiente descontínuo de densidade a amostra de sêmen é colocada sobre duas soluções prévias de percoll com diferentes concentrações (geralmente 45% e 90% de percoll). Ao centrifugar esse conjunto temos que, ao final da centrifugação, o plasma seminal formará a primeira fase do tubo. Logo abaixo, na região de interseção do sêmen com o percoll 45% posicionam-se as células brancas

possivelmente presentes na amostra. Abaixo, na região de interseção das soluções de percoll (45%-90%), os espermatozoides menos densos (possivelmente mortos ou com alterações morfológicas consideráveis) e debris celulares. Por fim, no final do tubo abaixo do percoll concentrado em 90%, ficam apenas os espermatozoides vivos, mais densos e mais maduros.

A lavagem simples pode ser realizada em dois momentos distintos: com o sêmen bruto, geralmente utilizada em casos com raros espermatozoides presentes na amostra e também após o gradiente de percoll, retirando essa substância tóxica do contato com os espermatozoides, lavando-os. A técnica consiste em adicionar meio de cultivo específico, diluindo os componentes seminais ou percoll da amostra e sua posterior centrifugação. Ao final da lavagem os espermatozoides ficam precipitados e concentrados no final do tubo, formando o *pellet*.

O *swim up* pode ser realizado em dois momentos distintos: com o sêmen bruto, logo após o ejaculado, ou como parte final de um preparo seminal, completando as técnicas de gradiente e lavagem simples. O protocolo consiste em adicionar meio de cultivo vagorosamente acima do precipitado de espermatozoides (independente da sua origem) e com isso aguardar a natação dos espermatozoides acontecer de forma espontânea, o que leva geralmente de 30 minutos até 1 hora. Após esse período é retirada apenas a parte superior do líquido, local para onde os espermatozoides mais rápidos e mais capazes nadarão.

1.3. Criobiologia

A criobiologia, ciência que estuda o comportamento da vida em baixas temperaturas, é uma ciência antiga e sem um ponto de começo bem estabelecido. A etimologia da palavra nos remete ao grego, onde “cryo” se liga a frio, “bios” a vida, e “logos” a ciência.

A preservação de materiais líquidos através do frio já era descrita por gregos e romanos que resfriavam suas bebidas com gelo trazido das montanhas, preservando-as. Mas foi só em 1842 que uma patente Britânica foi expedida para uma solução de gelo e salmoura, com o intuito de preservar o frescor dos alimentos por mais tempo (Encyclopædia Britannica).

Um dos primeiros registros históricos ocorreu em 1779, por Carl W. Scheele, um químico Sueco. Ele descreve ter preparado um novo, transparente e xaroposo líquido, resultante do aquecimento de óleo de oliva e litargírio (óxido de chumbo amarelo, PbO) (DAVID, 1996), líquido o qual ele nomeou de Glicerol (do Grego “glycos”, doce). Anos mais tarde esse líquido foi classificado como um álcool (propan-1,2,3-triol, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada – IUPAC) e sua função como o crioprotetor foi amplamente estudada e difundida.

Dentre os possíveis marcos para o início da criobiologia, J.K Sherman descreve o ano de 1949 como ponto inicial (SHERMAN, 1964), uma vez em que foi nesse ano em que houve a primeira utilização do Glicerol como agente crioprotetor, por Christophe Polge, Alan Parkes e Audrey Smith (POLGE, 1949).

Desde 1949 outros agentes crioprotetores foram descobertos e seu uso aprimorado de acordo com suas características físico químicas, seja para a indústria alimentícia ou farmacêutica.

Os primeiros sucessos da criopreservação de espermatozoides foram bem relatados na monografia de A.U. Smith's, em 1961 (SMITH, 1961).

1.3.1. Criopreservação do sêmen

A criobiologia se aplica no âmbito da reprodução humana como o conjunto de técnicas nas quais gametas, tecidos e embriões podem ser preservados pelo frio para seu uso posterior.

Compreender os princípios fisiológicos da criopreservação e suas restrições são de suma importância para se compreender seu sucesso e evitar seu insucesso.

Entende-se como sucesso da criopreservação a manutenção da integridade estrutural e da viabilidade metabólica celular após sua exposição às temperaturas criogênicas (abaixo de -150°C). Em temperaturas criogênicas as células e tecidos não possuem demanda metabólica (WALCERZ, 1996).

Ao expor material biológico viável a tão baixas temperaturas, há possibilidade de serem causados danos celulares. Esses danos celulares são conhecidos por crio injúria, e podem, nos espermatozoides, afetar sua qualidade estrutural e funcional, comprometendo seu potencial de fertilização (OETTLE et al., 1992).

Desde o início da utilização dos crioprotetores, diversos estudos já foram dedicados à compreensão dos mecanismos celulares responsáveis pela crio injúria, uma vez que esta é a principal causa de morte celular decorrente do processo de congelamento e descongelamento.

A crio injúria é explicada por diversas causas como o efeito solução, formação de cristais de gelo intracelular, volume celular mínimo e transição de fases da membrana (RALL, 1985; LOVELOCK, 1953; MAZUR, 1963; FARRANT, 1977; MERYMAN, 1977). Logo, os crioprotetores possuem a função de evitar a formação de grandes cristais de gelo intracelular, reduzir o estresse osmótico por meio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, interagir com íons e macromoléculas, reduzir o ponto de congelação da água, assim como servir de tampão para ajustes de possíveis alterações do potencial de hidrogênio - pH (MEDEIROS et al., 2002).

J. Kopeika demonstrou em 2015, em revisão bibliográfica, que danos à membrana celular e alterações no funcionamento e metabolismo, tanto celular quanto mitocondrial, são correlacionados ao processo da criopreservação. Porém, os dados ainda não são conclusivos no que tange os danos que a criopreservação pode acarretar à integridade do DNA humano (quebra em fita simples, fragmentação, metilação, expressão gênica, alterações no grau de condensação e danos ao DNA mitocondrial) (KOPEIKA, 2015).

O sucesso da exposição de materiais biológicos às temperaturas não fisiológicas só foi possível após uso de substâncias crioprotetoras (SMITH, 1961). Estas substâncias são essenciais ao congelamento uma vez que evitam o processo de nucleação da água que, na mudança de fase e cristalização (solidificação), culmina com o crescimento dos cristais de gelo (PURDY, 2006).

De forma a ficar didático, os crioprotetores foram divididos em dois grandes grupos, os permeáveis à membrana plasmática e os não permeáveis à membrana plasmática.

Crioprotetores permeáveis a membrana (ou intracelulares) ainda foram, em 1987, classificados por Ashwood-Smith em dois subgrupos: alcoólicos e amidas (ASHWOOD-SMITH, 1987). Entre os crioprotetores alcoólicos utilizados na criopreservação de espermatozoides pode-se citar o glicerol, o etilnoglicol e o DMSO (dimetilsulfóxido) (FICKEL, 2007). Entre as amidas, também utilizadas na

crioservação de espermatozoides, pode-se citar a acetamida, a lactamida (KASHIWAZAKI et al., 2006), a dimetilformamida (OLIVEIRA et al., 2006) e a dimetilacetamida (BIANCHI et al., 2008).

Os crioprotetores permeáveis à membrana atuam de forma dupla, tanto interna quanto externamente, desidratando a célula ao causar efluxo da água intracelular para equilibrar o meio extracelular, evitando a formação de cristal intracelular (processo conhecido por nucleação) (MAZUR, 1972). A entrada dos crioprotetores permeáveis se dá por meio da difusão passiva, sem gasto de energia para a célula, criando um meio hipertônico que induz o efluxo de água das células espermáticas (PURDY, 2006).

Os crioprotetores não permeáveis à membrana são representados por macromoléculas com peso molecular elevado, como açúcares complexos (rafinose, trealose, sucrose), lipoproteínas da gema do ovo, proteínas do leite e alguns aminoácidos (AMANN, 1987).

Atuam por meio do efeito osmótico, induzindo a saída de água do interior da célula e prevenindo a formação de cristais de gelo no meio intracelular (AMANN, 1987). Esses crioprotetores, quando adicionados à suspensão com espermatozoides, fazem com que a água intracelular se desloque para o meio extracelular, devido a sua maior pressão osmótica, resultando na diminuição do volume celular e evitando o processo de nucleação.

1.3.2. Reprodução assistida e a criopreservação

Espermatozoides já são rotineiramente armazenados em centros de investigação e tratamento da infertilidade. Nesses casos o nitrogênio líquido com temperatura de -196°C é fundamental para manutenção da qualidade e viabilidade da amostra.

Apesar de ser utilizado há anos, o congelamento seminal tem suas limitações. A técnica de criopreservação evoluiu muito desde o ano de 2005, época em que nasceu o primeiro bebê resultante da fertilização de um ovócito criopreservado por um espermatozoide criopreservado (TJER et al., 2005). Porém, como toda técnica ainda em evolução, o congelamento seminal não apresenta resultados tão expressivos no

que tange a taxa de sobrevivência após aquecimento. Em média com uma recuperação que varia de 15% a 60% de espermatozoides viáveis após o descongelamento, a técnica já pode ser considerada um sucesso caso se enquadre nesses valores (FABOZZI et al., 2016).

Em alguns casos essa baixa viabilidade recuperada no descongelamento já é vista como satisfatória, uma vez que, em determinados tratamentos, um número pequeno de espermatozoides é utilizado, por exemplo, nos casos onde a técnica laboratorial de escolha para o tratamento é a ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoide) em que apenas um espermatozoide é utilizado por ovócito aspirado.

Em outros casos, a quantidade recuperada de espermatozoides precisa ser maior, a exemplo dos pacientes que poderiam se submeter a técnicas mais simples e menos invasivas como a inseminação intrauterina (IIU), o sêmen após processamento é introduzido diretamente na cavidade uterina e os espermatozoides devem migrar para a tuba uterina onde o processo de fertilização ocorrerá de forma natural.

A criopreservação de espermatozoides é indicada por uma série de razões. Abaixo seguem elencados alguns dos motivos que levam o paciente a recorrer ou necessitar da criopreservação de espermatozoides.

- Para homens com concentração de espermatozoides abaixo de 15 milhões por mililitro do ejaculado (oligospérmicos) e principalmente quando a concentração está abaixo de 1 milhão por mililitro do ejaculado (oligospérmicos acentuados), por segurança.
- Para homens que serão submetidos a tratamentos oncológicos, principalmente os que serão submetidos a quimioterapia e/ou radioterapia. Sabe-se que após os tratamentos, uma considerável parcela destes homens não apresentará mais espermatozoides no ejaculado ou nos testículos.
- Para homens que serão submetidos a procedimentos cirúrgicos de busca de espermatozoides, como a punção de epidídimo ou biópsia testicular (casos com azoospermia obstrutiva), evitando assim nova cirurgia.
- Para homens que serão submetidos a vasectomia e que desejam preservar a fertilidade evitando novas cirurgias para reversão de vasectomia ou busca por espermatozoides.

- Para homens que serão submetidos a cirurgias de próstata e que poderão evoluir para ejaculação retrógrada ou anejaculação.
- Para homens que não podem estar presentes no momento de um tratamento, seja por viagem ou dificuldades de coleta.

Analisando rapidamente esses seis grupos de indicações podemos constatar que, para alguns pacientes, o congelamento seminal é a única forma concreta de no futuro eles poderem gerar filhos com seu próprio patrimônio genético.

1.4. Apresentação do Problema

Na rotina diária de um laboratório de andrologia em uma clínica de reprodução assistida, o congelamento de sêmen é, independente do caso, realizado por um protocolo padrão. Esse protocolo consiste na diluição da amostra seminal na proporção de 1:2 em meio de criopreservação e a utilização da mesma rampa de resfriamento, independente da concentração e qualidade seminal apresentada. Desta forma, um ejaculado com concentração de 60 milhões de espermatozoides/ml passará pelo mesmo protocolo que um ejaculado com 1 milhão de espermatozoides/ml.

Portanto, apesar da técnica de congelamento de sêmen ser difundida e utilizada em praticamente todas as clínicas de reprodução assistida, ainda há uma demanda para se encontrar técnicas que entreguem melhores taxas de sobrevivência espermática após o descongelamento. Essa melhora agregará maior qualidade e melhor prognóstico ao tratamento para infertilidade conjugal. O que, para determinados pacientes que não dispõem de outra possibilidade reprodutiva, torna-se essencial.

Os resultados deste estudo possibilitam verificar como a mesma amostra de sêmen, em variadas concentrações, se comporta ao se utilizar a mesma técnica de criopreservação. Isso torna possível novos caminhos para que novos protocolos que individualizem as técnicas de congelamento para cada paciente, almejando melhores resultados na prática clínica.

1.5. Justificativa

Amostras seminais com diferentes concentrações de espermatozoides são constantemente apresentadas ao laboratório de andrologia de clínicas de reprodução assistida. Quando solicitado, estas amostras são congeladas por um protocolo único independente da concentração observada. Desta forma, este projeto tentou responder se a concentração de espermatozoides do ejaculado poderia determinar o resultado da técnica de congelamento seminal a ser realizada. Esse projeto faz parte do conjunto de investigações que tem como objetivo entender todos os fatores que influenciam os resultados da criopreservação seminal humana.

A proposta do experimento foi de fracionar uma amostra diversas vezes minimizando (e possivelmente eliminando) a variabilidade dentre diferentes indivíduos. Com isso foi criada a possibilidade de comparar os resultados de um paciente com seus próprios parâmetros em condições de congelamento diversas. Mais do que isso, comparar resultados do mesmo ejaculado, evita a variabilidade já esperada entre diferentes ejaculações de um mesmo indivíduo (BAKER,1985; ALVAREZ et al., 2003).

1.6. Objetivos

- Avaliar os resultados de criopreservação de sêmen em amostras com diferentes concentrações de espermatozoides.
- Correlacionar a taxa de recuperação da motilidade espermática com a taxa de sobrevivência espermática.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi composto por 20 amostras de voluntários da rotina de andrologia da Clínica Vida Centro de Fertilidade. Para cada voluntário a coleta de sêmen foi feita em sala apropriada e em coletor estéril, conforme protocolos padrões da clínica. Aos voluntários foi explicado o experimento e ressaltado que, logo após sua realização, as amostras seriam devidamente descartadas.

Os mesmos assinaram termo de consentimento, autorizando a participação da amostra. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, pelo parecer número 15193319.3.0000.5257.

2.1. Critérios de inclusão e exclusão:

Os critérios de inclusão dos pacientes foram baseados na qualidade seminal. Apenas as amostras normospérmicas (sem alterações nos padrões seminais determinados pelo manual da OMS para exame e preparo seminal (WHO, 2010)) foram aceitas. Os critérios de inclusão foram:

- Volume seminal igual ou superior a 1,5 ml;
- Concentração de espermatozoides igual ou superior a 15 milhões por ml do ejaculado;
- Número total de espermatozoides ejaculados igual ou superior a 39 milhões;
- Porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva superior a 32%;
- Morfologia normal, segundo critérios de Kruger (KRUGER et al., 1986), igual ou superior a 4%;
- Ausência de leucocitose (presença de células brancas em concentração inferior a 1 milhão por ml do ejaculado).

As seguintes condições foram usadas como critérios de exclusão e impediram a entrada de pacientes no estudo:

- Período de abstinência ejaculatória superior a 5 dias;
- Perda de volume do ejaculado durante a coleta;

- Contaminação do ejaculado de qualquer natureza;
- Ingestão de álcool no período de abstinência ejaculatória;
- Quadro viral ou bacteriano com manifestação febril no período de abstinência ejaculatória.

2.2. Preparo das amostras:

Cada uma das 20 amostras coletadas foi homogeneizada e seus parâmetros de concentração e motilidade foram avaliados e registrados. As amostras foram diluídas (ou concentradas, na dependência da concentração espermática inicial) em meio de cultivo tamponado (Global with Hepes) gerando o total de mais quatro amostras com as concentrações determinadas abaixo:

- 1) Amostra com concentração original (grupo controle);
- 2) Amostra com 30 milhões de espermatozoides por ml;
- 3) Amostra com 15 milhões de espermatozoides por ml;
- 4) Amostra com 5 milhões de espermatozoides por ml;
- 5) Amostra com 1 milhão de espermatozoides por ml.

2.3. Teste de vitalidade

De cada uma das amostras geradas foi feito o teste de vitalidade espermática antes do congelamento. A vitalidade dos espermatozoides foi avaliada pela submissão das amostras ao corante eosina-nigrosina do kit Vitalscreen™ (FertiPro, Bélgica). Em cada lâmina de vitalidade foram contabilizados 200 espermatozoides para se obter o resultado proporcional de espermatozoides vivos.

No teste de vitalidade, realizado segundo o protocolo do fabricante, em caso de espermatozoide vivo não há coloração celular (o corante não consegue penetrar a membrana íntegra do espermatozoide vivo). Em caso de espermatozoide morto há coloração celular avermelhada (o corante consegue penetrar a membrana espermática degenerada do espermatozoide em processo de apoptose).

2.4. Criopreservação das amostras

A criopreservação foi feita por meio da adição do meio de congelamento TYB – TEST-yolk buffer – com gema de ovo inativada pelo calor, glicerol e gentamicina, da Irvine Scientific, EUA. A adição de TYB foi feita da forma lenta, de gota a gota, até a completa homogeneização do sêmen com o crioprotetor.

Posteriormente à adição de crioprotetor, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 ml e seladas por calor. Em seguida as amostras foram submetidas ao seguinte protocolo lento de resfriamento:

- Rampa lenta: depois da adição do crioprotetor, as amostras foram dispostas em palhetas de criopreservação de 0,5ml. Então foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente; 20 minutos a 4°C na geladeira; 20 minutos a -20°C no freezer; 20 minutos em vapor de nitrogênio líquido. Após este período de resfriamento seriado, a amostra foi imersa em nitrogênio líquido (-196°C).

As amostras permaneceram congeladas por 1 a 3 dias (na dependência da rotina de trabalho), quando, então, foi realizado o protocolo de descongelamento.

2.5. Descongelamento das amostras

Para o descongelamento as amostras foram retiradas do nitrogênio líquido e, imediatamente, colocadas em banho maria a 37°C, durante 30 segundos. As palhetas foram cortadas com material estéril e, então, dispostas em tubos estéreis. Em seguida foi adicionado 2ml de AllGradWash® (Global Life, EUA) e as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 200G. Após a centrifugação e formação do *pellet* o sobrenadante foi descartado para limpar os resquícios do meio de congelamento. O *pellet* foi ressuspendido em 0,25ml de Global Fertilization® (Global Life, EUA) e as amostras foram postas na câmara de Makler para avaliação da recuperação da motilidade espermática. Ao mesmo tempo, novas lâminas de vitalidade foram feitas (Vitalscreen™, FertiPro, Bélgica) para cada uma das amostras descongeladas. Toda avaliação e contagem espermática pós-descongelamento foi feita de forma cega.

2.6. Parâmetros avaliados

A recuperação da motilidade de cada amostra foi calculada com base na porcentagem de espermatozoides móveis na amostra a fresco, comparando-a com a porcentagem de espermatozoides móveis na amostra descongelada. Para ambas situações, foram considerados como móveis tanto os espermatozoides móveis progressivos quanto os móveis *in situ*.

A comparação foi feita através da razão entre o percentual de espermatozoides móveis na amostra descongelada para o percentual de espermatozoides móveis na amostra a fresco. Essa comparação proporcional foi denominada taxa de recuperação da motilidade espermática.

A vitalidade da de cada amostra também foi avaliada. Para isso a vitalidade da amostra inicial também foi comparada com a vitalidade após o descongelamento. Essa comparação foi feita através da razão entre o percentual de vitalidade da amostra descongelada para o percentual de vitalidade da amostra a fresco. Essa comparação proporcional foi denominada taxa de sobrevivência espermática.

2.7. Análise estatística

A taxa de recuperação da motilidade espermática foi analisada, primeiramente, comparando as diferentes taxas de recuperação da motilidade para as diferentes concentrações seminais que compuseram o estudo. Para tal, foi utilizado teste *One-way* ANOVA.

Posteriormente, a fim de se estabelecer correlação causal entre a melhora e/ou piora da recuperação da motilidade espermática com os parâmetros indicadores de qualidade seminal – concentração e motilidade progressiva –, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson.

A correlação entre a taxa de recuperação da motilidade e a taxa de sobrevivência espermática também foi avaliada através do coeficiente de correlação de Pearson.

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 *.

2.8. Biossegurança

Seguindo os preceitos da RDC N° 23, publicada pela ANVISA (agência nacional de vigilância sanitária) em 27 de maio de 2011 todo trabalho ocorreu dentro de uma cabine de segurança biológica classe II tipo A1. Isso porque o sêmen humano é considerado material biológico potencialmente infectante.

Isto foi necessário para proteção do andrologista que manipulou as amostras e proteger as amostras, tratando-a de forma estéril (por se tratar de um material frágil e imprescindível para a perpetuação da espécie humana). Isso implica em que, tendo sido uma vez coletado, o sêmen humano só foi exposto ao ambiente externo quando dentro da cabine de segurança biológica.

A manipulação das amostras foi feita seguindo os protocolos da clínica, evitando qualquer tipo de contaminação cruzada entre as amostras. Para tal fim, todo o trabalho foi realizado com material descartável e o lixo gerado foi encaminhado diretamente ao lixo de risco biológico, para devido tratamento, após o uso.

3. RESULTADOS

Com o objetivo de compreender e elucidar os fatores impactantes na sobrevivência e na recuperação da motilidade espermática ao processo de criopreservação e descongelamento, analisamos os dados obtidos de forma conjunta e isolada.

Na figura 1 observa-se a taxa de recuperação da motilidade espermática que cada uma das cinco amostras de cada um dos 20 voluntários apresentou em todas as concentrações avaliadas neste estudo.

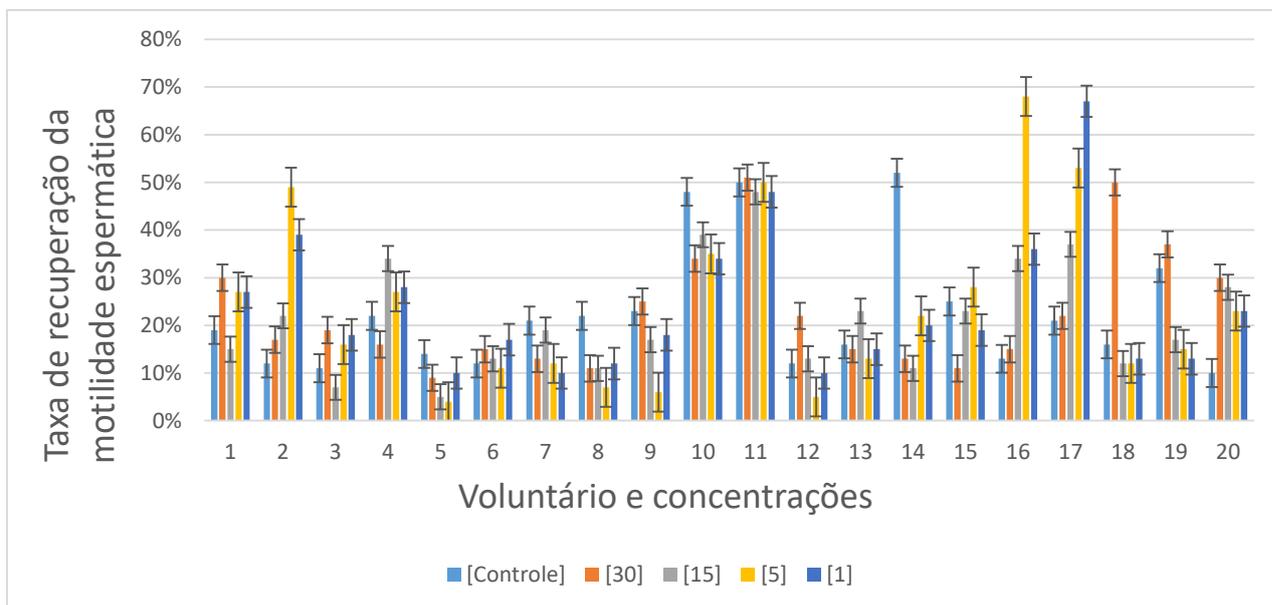


Figura 1: Taxa de recuperação da motilidade de cada um dos vinte voluntários em cada uma das concentrações estudadas (controle, 30, 15, 5 e 1 milhão de espermatozoides por ml).

Na Figura 2 é observada a taxa de sobrevivência que cada uma das cinco amostras de cada um dos 20 voluntários apresentou em todas as concentrações avaliadas neste estudo.

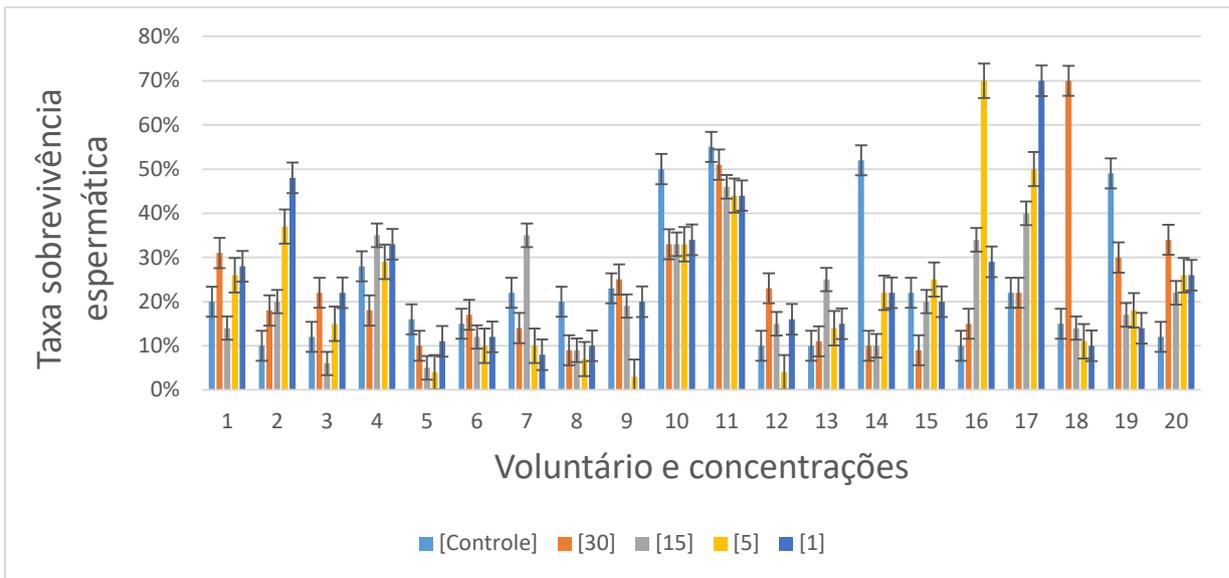


Figura 2: Taxa de sobrevivência espermática de cada um dos vinte voluntários em cada uma das concentrações estudadas (controle, 30, 15, 5 e 1 milhão de espermatozoides por ml).

Na correlação entre a recuperação da motilidade espermática e a sobrevivência espermática, o coeficiente correlação de Person mostrou-se positivo e significativo ($r=0.9564^*$, $p<0,05$), demonstrando que há correlação linear forte e significativa entre a taxa de recuperação da motilidade e a taxa de sobrevivência espermática (Figura 3).

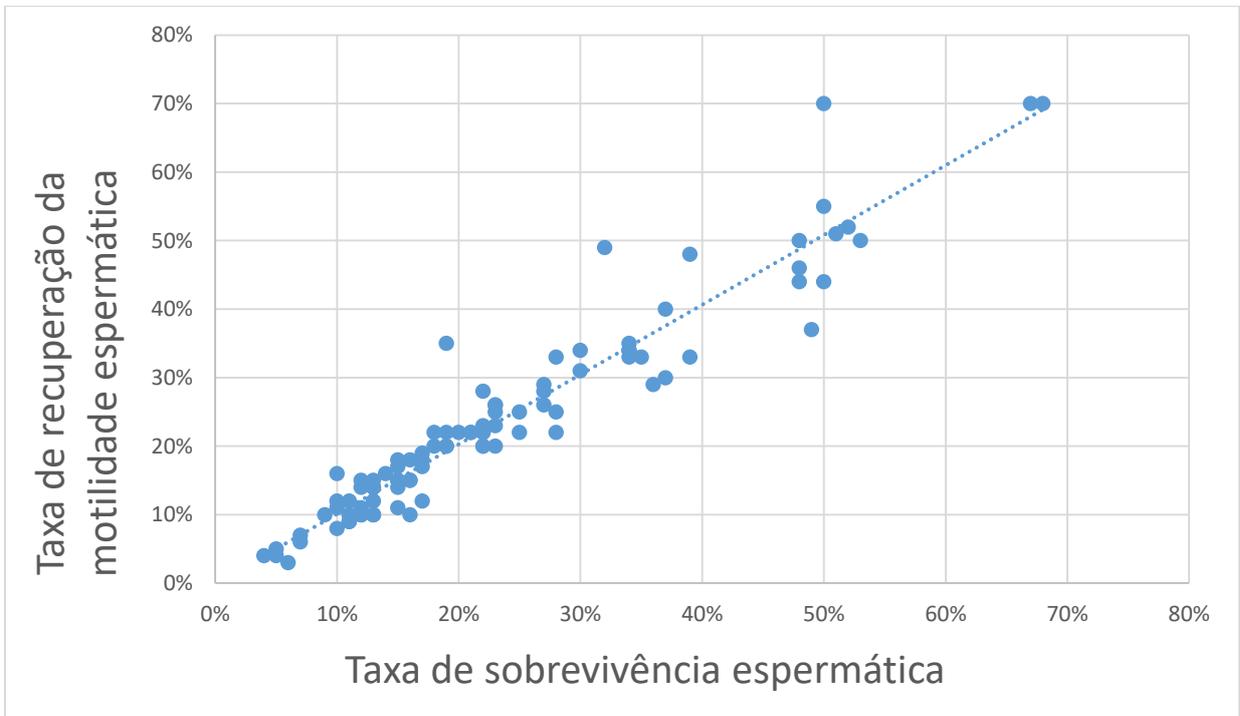


Figura 3: Correlação entre taxa de recuperação da motilidade espermática e taxa de sobrevivência espermática ($r=0.9564^*$, $p<0,05$).

A motivação principal do presente trabalho foi identificar se a concentração espermática, como fator isolado, evidenciaria ser impactante para o sucesso da criopreservação, a despeito de se usar o mesmo protocolo para amostras com concentrações variadas.

Não houve diferença na média de recuperação da motilidade pelas variadas concentrações do estudo ($p=0.5774$) (Figura 4):

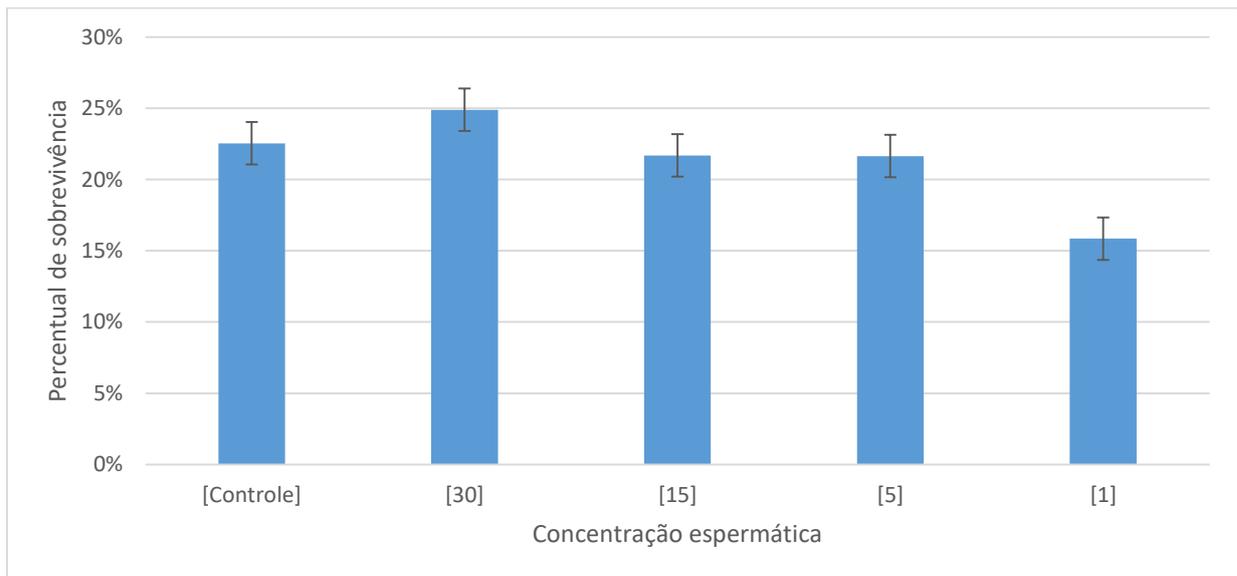


Figura 4: Percentuais de recuperação da motilidade média pelas diferentes concentrações espermáticas estudadas ($p=0.5774$).

A taxa de recuperação da motilidade média por voluntário foi de $21,3 \pm 5,7\%$.

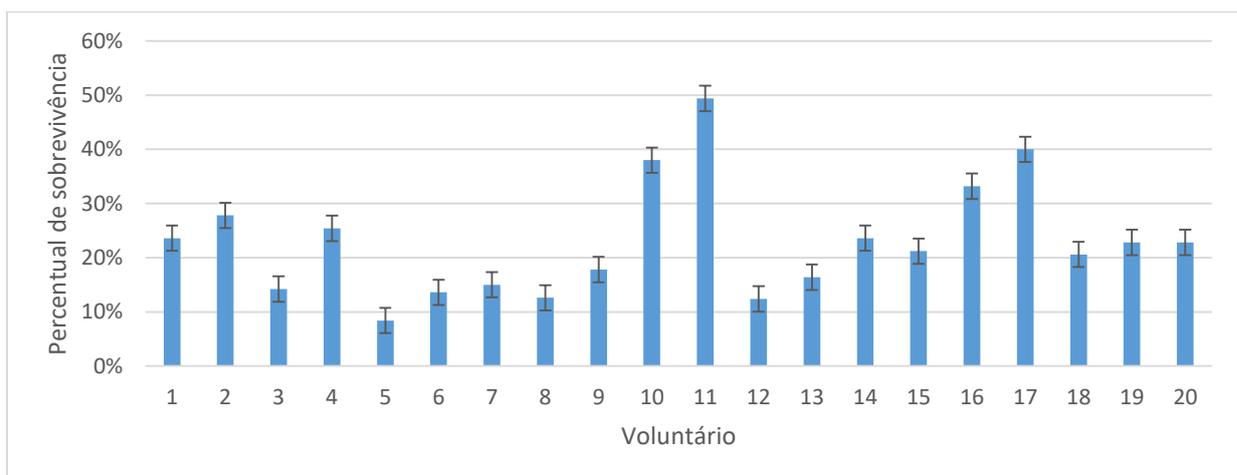


Figura 5: Percentuais de recuperação da motilidade média dos diferentes voluntários estudados.

Neste estudo foi avaliado também as possíveis correlações entre marcadores de qualidade seminal (motilidade progressiva e concentração espermática) e a recuperação da motilidade espermática.

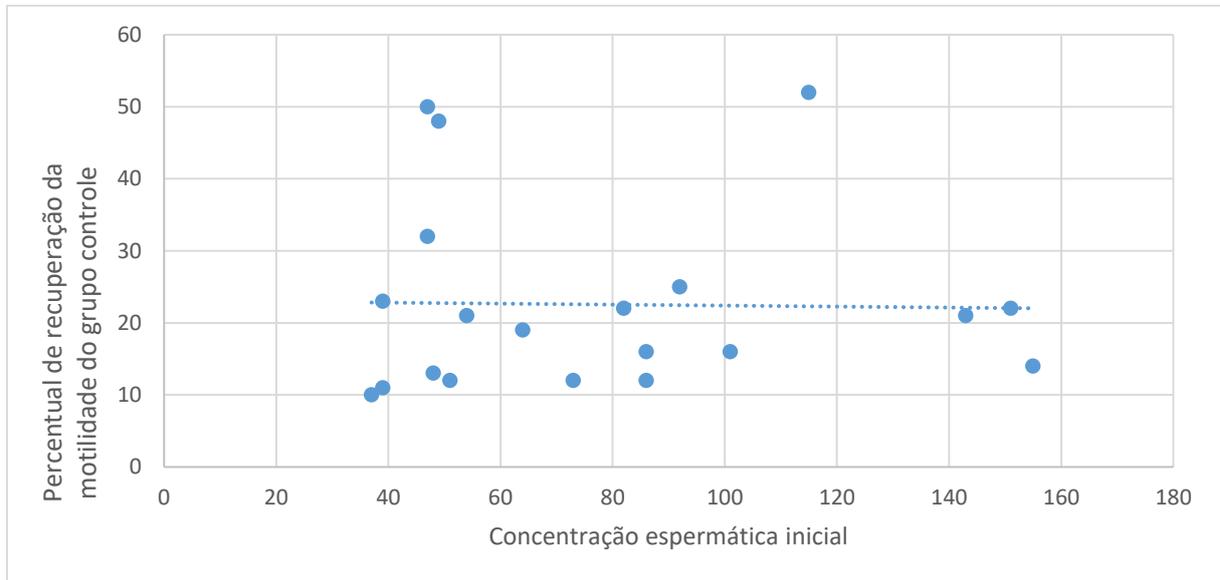


Figura 6: Correlação do percentual de recuperação da motilidade do grupo controle com a concentração espermática inicial da amostra ($r=-0.019$, ns).

A correlação entre o percentual de recuperação da motilidade espermática do grupo controle e a concentração espermática inicial da amostra foi fraca e não significativa ($r=-0.019$, ns) (Figura 6).

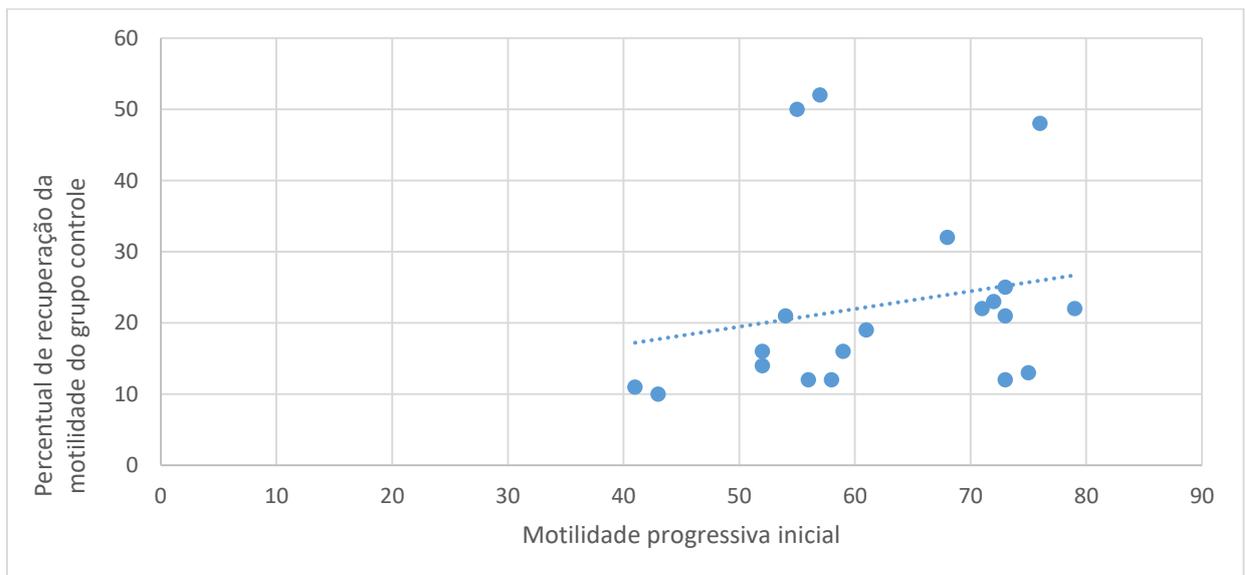


Figura 7: Correlação do percentual de recuperação da motilidade do grupo controle com a motilidade progressiva inicial da amostra ($r=0.2154$, ns).

A correlação entre o percentual de recuperação da motilidade espermática do grupo controle e a motilidade progressiva inicial da amostra foi fraca e não significativa ($r=0.2154$; ns) (Figura 7).

As análises utilizando o percentual de recuperação da motilidade espermática do grupo controle com os parâmetros de qualidade seminal (concentração e motilidade progressiva) não demonstraram correlação forte ou significativa (Figura 6 e 7).

Como as análises apenas com o grupo controle não foram significativas, o percentual de recuperação da motilidade média de cada voluntário foi analisado.

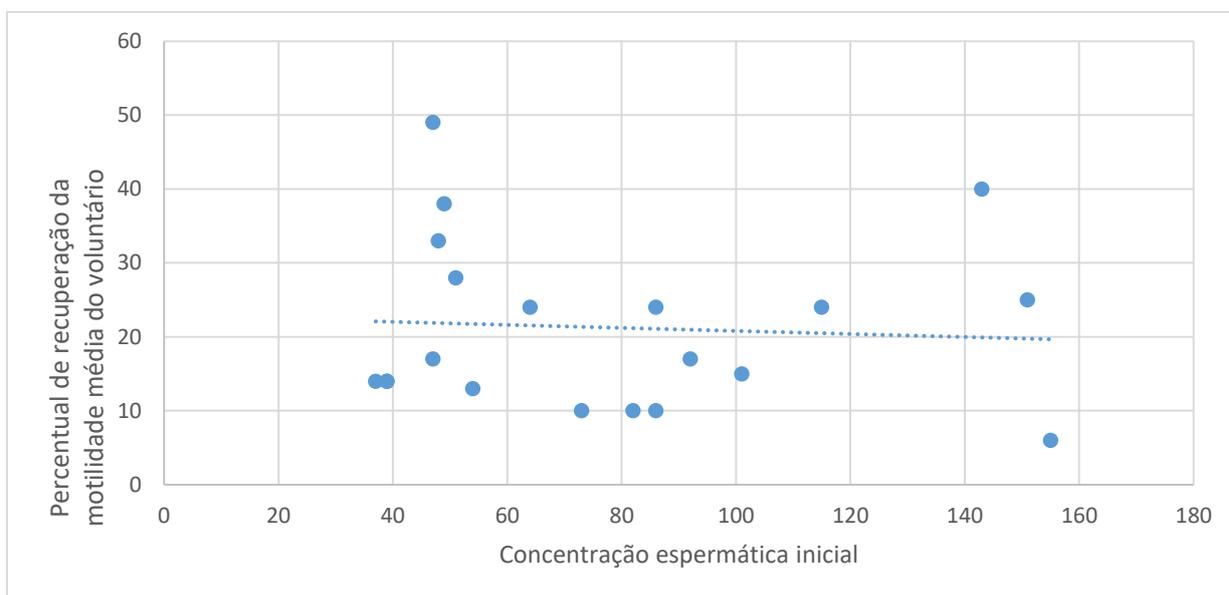


Figura 8: Correlação do percentual de recuperação da motilidade média por voluntário com a concentração espermática inicial ($r=-0.063$, ns).

A correlação entre a recuperação da motilidade espermática média de cada voluntário e a concentração espermática da amostra original mostrou-se fraca e não significativa ($r=-0.063$, ns) (Figura 8).

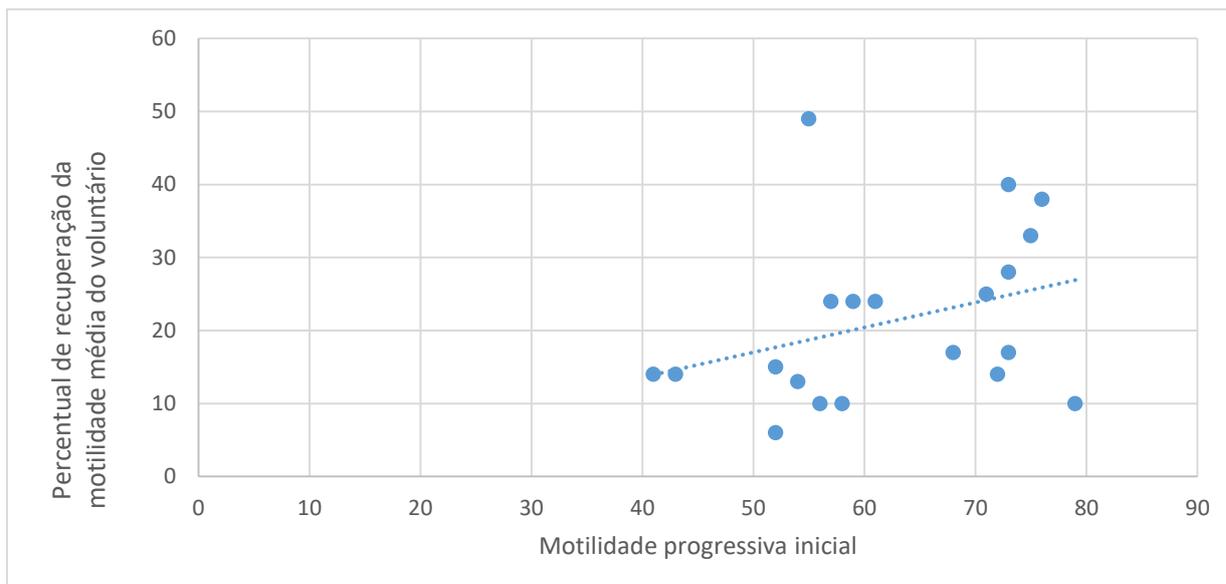


Figura 9: Correlação do percentual de recuperação da motilidade média por voluntário com a motilidade progressiva inicial ($r=0.3341$, ns).

A correlação entre a taxa de recuperação da motilidade espermática média e a motilidade progressiva da amostra inicial também foi fraca e não significativa ($r=0.3341$, ns) (Figura 9).

A figura 10 ilustra de forma mais sintética, a sequência de correlações realizadas neste estudo.

Correlações	Taxa de sobrevivência espermática	Concentração espermática inicial	Motilidade progressiva inicial
Taxa de recuperação da motilidade	$r=0.9564^*$, $p<0,05$	-	-
Taxa de recuperação da motilidade do grupo controle	-	$r=-0.019$, ns	$r=0.2154$, ns
Taxa de recuperação da motilidade média do voluntário	-	$r=-0.063$, ns	$r=0.3341$, ns

Figura 10: Tabela resumo das correlações analisadas no presente estudo.

4. DISCUSSÃO

Uma clínica de reprodução humana convive diariamente com o atendimento de casais com os mais variados fatores de infertilidade ou indicações e motivos para realizar tratamentos reprodutivos.

São observados casos simples, onde não há comprometimento da qualidade intrínseca dos gametas como casos complexos onde os fatores de infertilidade são deletérios aos gametas produzidos seja em sua morfologia, estrutura ou genética.

Dentre as várias possibilidades de tratamentos, saber elencar aquela que irá auxiliar com a melhor eficácia e maior eficiência os pacientes é um desafio diário que os profissionais lidam.

Técnicas auxiliares ao protocolo, como o caso do congelamento de gametas, vêm para suplementar o tratamento de reprodução humana assistida. Novas possibilidades e novas formas de lidar com a infertilidade surgiram a partir desta técnica. Um casal pode, por exemplo, iniciar um processo de fertilização e o marido, caso more em outro país, congelar o sêmen e não estar presente no dia da fertilização. Esse é um ponto simples do congelamento seminal.

Variando entre os extremos, um ponto muito importante do congelamento seminal, é a sua utilização em tratamentos oncológicos que potencialmente podem causar esterilidade ao paciente. Pacientes que passaram por intervenções cirúrgicas, como a biópsia testicular, para obtenção de espermatozoides também podem ser beneficiados pela técnica. São casos extremamente delicados onde toda a qualidade ofertada ao paciente pode fazer a diferença.

Com este objetivo, técnicas de congelamento seminal devem, assim como as demais, serem aprimoradas. É reconhecido que o processo de congelamento e descongelamento seminal diminui a viabilidade e a motilidade espermática (PUNYATANASAKCHAI et al., 2008). Atribui-se isso aos diversos impactos que o congelamento pode provocar como a lesão pelo frio, excessiva desidratação celular, modificações deletérias na estrutura do espermatozoide, alterações morfológicas, danos à membrana plasmática e/ou acrossomal, danos mitocondriais, indução de apoptose e fragmentação do DNA (MERINO et al., 2015; SHARMA et al., 2010). Este estudo teve sucesso em correlacionar positivamente a taxa de sobrevivência espermática e a taxa de recuperação da motilidade espermática. Na prática clínica essa correlação tem influência pois, após o primeiro sucesso da técnica de ICSI

(PALERMO et al., 1992) foi possível que espermatozoides imóveis também fossem utilizados nas técnicas de reprodução assistida. Isso porque a injeção intracitoplasmática de espermatozoide é feita de forma ativa, com o uso de micropipetas e independe da motilidade espermática.

Diversos estudos já demonstraram que espermatozoides frescos e imóveis provenientes do ejaculado (KAHRAMAN et al., 1996; NIJS et al., 1996; VANDERVORST et al., 1997; WANG et al., 1997; BARROS et al., 1998) ou de biópsias testiculares (NIJS et al., 1996; KAHRAMAN et al., 1997; SHULMAN et al., 1999) podem ser utilizados para a fertilização e produzem gestações com sucesso. Todavia, essas taxas de gestação são mais baixas que as médias e a qualidade dos embriões formados é inferior (STALF et al., 2005).

Porém, em casos de amostras criopreservadas, onde a amostra seminal inicial possua espermatozoides com motilidade e após seu descongelamento não apresente mais espermatozoides com motilidade, deve-se, se possível, buscar nova amostra espermática, uma vez que, após estabelecida essa correlação, a ausência de motilidade, em amostras descongeladas, é forte indício da ausência de viabilidade espermática.

Embora os resultados do congelamento seminal ainda não sejam completamente satisfatórios e a razão para as suas falhas ainda não tenha sido totalmente elucidada, existem situações onde há necessidade de se implementar essa técnica (MESEGUER et al., 2004).

A ideia de se ter um protocolo único para o congelamento de sêmen humano, sem que a individualização pela particularidade de cada amostra é prática de trabalho na rotina laboratorial. Porém, neste trabalho questionamos se esta rotina é a mais eficiente. O intuito foi corroborar com o que é feito na prática ou refutar esse procedimento e sugerir um novo protocolo, uma nova maneira de se criopreservar sêmen de acordo com a individualidade e características de cada amostra.

Nos últimos anos, uma ênfase especial tem sido aplicada a medicina personalizada. É uma proposta para que tratamentos médicos, práticas clínicas e terapias sejam adaptadas para cada indivíduo. Essa discussão tem sido realizada também para a medicina reprodutiva e aplicada na orientação para a indução ovariana (ROQUE et al., 2019). O conceito da individualização terapêutica deve ser aplicado em todas as áreas da medicina e também no laboratório de andrologia das clínicas de

medicina reprodutiva. São muitas as variações seminais entre os homens e suas respostas a tratamentos semelhantes (WRIGHT et al., 2014)

Ao final deste estudo observamos que, independente das variações seminais, o congelamento do sêmen teve sua eficiência inalterada em função da concentração. Desta forma, estes dados corroboraram com as práticas clínicas de um protocolo único de congelamento para todas as amostras seminais.

Dados importantes foram encontrados uma vez que as correlações de sobrevivência espermática com concentração e motilidade espermática não foram fortes o suficiente, o que vai de encontro ao estudo de ARIBARG et al., 1995 e de IMRAT et al., 2013. Já em outro estudo, foi observado que a recuperação da motilidade estava inversamente correlacionada com a motilidade progressiva inicial da amostra e estava diretamente correlacionada com a concentração inicial da amostra (ZHOU et al., 2014). Este estudo não evidenciou correlação forte entre a recuperação da motilidade com a sazonalidade, volume do ejaculado ou tipo sanguíneo.

A queda na qualidade seminal, encontrada no presente estudo após o descongelamento é também apresentada por IMRAT et al., 2013, que demonstrou que o processo de criopreservação traz prejuízos significativos aos parâmetros seminais de motilidade.

O presente estudo demonstrou que a qualidade seminal, seja avaliada pelo parâmetro da concentração espermática ou pelo parâmetro da motilidade espermática, não apresenta correlação forte para o prognóstico de sobrevivência pós congelamento. A implicação clínica é que ainda é necessário investigar quais fatores podem inferir se uma amostra seminal irá ou não ter boa recuperação da motilidade após descongelamento (JIANG et al., 2017).

Em outras espécies animais, a concentração pode influenciar o resultado do congelamento de sêmen (WOELDERS, 2017). Diferentes concentrações de propileno glicol e DMSO foram usados no congelamento de sêmen de equinos de acordo com concentração e a velocidade de resfriamento (OLDENHOF et al., 2017). O presente estudo sugere que esta mesma relação parece não ser encontrada com sêmen humano.

Uma das motivações deste estudo foi, também, o fato do congelamento seminal apresentar resultados satisfatórios, mas ainda longe do ideal. Apesar desta

técnica ser utilizada há anos, fatores individuais continuam influenciando os resultados (O'NEILL et al., 2019). O motivo do congelamento do sêmen foi uma possível causa de oscilações na recuperação da motilidade (NALLELLA et al., 2004). Estas foram de 32% até 54%, na dependência desta indicação.

No presente estudo o motivo do congelamento não fez parte do desenho experimental. O estudo foi realizado por voluntários presentes na clínica Vida e não necessariamente pacientes que realizaram o congelamento por alguma indicação médica para sua utilização no futuro.

O crioprotetor é um componente fundamental dos meios de congelamento de sêmen e o glicerol tem sido quase unicamente utilizado na rotina laboratorial. Recentemente, um estudo diversificou o crioprotetor utilizado (RAAD et al., 2018) e encontrou diferenças significativas para a recuperação da motilidade na dependência do crioprotetor. No presente estudo o glicerol foi usado como crioprotetor intracelular.

Um outro componente frequentemente encontrado no meio de congelamento de sêmen é a gema de ovo (GILMORE et al., 1997; PRINS & WEIDEL, 1986). Devido a presença deste produto animal, já existe no mercado um meio sem a presença deste componente e com resultados que indicam uma menor taxa de fragmentação da cromatina (BUNGUM et al., 2011). Porém, boa parte dos laboratórios continua a utilizar meios a base de gema de ovo.

Este estudo o meio utilizado foi a base de gema de ovo e esta relação entre a composição do meio (presença de gema e crioprotetor), concentração, motilidade e recuperação pós congelamento deve ser melhor investigada. Esta investigação deve ser direcionada ao desenvolvimento de um meio melhor, mas também a sua relação com a individualidade do paciente.

Este estudo investigou se a concentração de espermatozoides poderia influenciar o resultado do congelamento seminal. Não foram observadas diferenças entre as concentrações, mas a necessidade de continuar a busca por fatores que afetam o resultado do congelamento seminal deve ser continuada pois o meio ideal ainda não foi encontrado (JIANG et al., 2017).

Diversos fatores podem afetar os resultados, como o congelamento do sêmen em palhetas de 0,5 ou 0,25 ml ou em criotubos, três tipos de devices amplamente utilizados. Um estudo tentou identificar se há diferença nos resultados pós

congelamento entre estes dois *devices* e o resultado foi semelhante ao encontrado no presente estudo (LI et al., 2019).

Fatores nutricionais (SALAS-HUETOS et al., 2019) bem como ocupacionais (CREMONESE et al., 2017) estão relacionados a qualidade seminal e conseqüentemente ao resultado do congelamento destes espermatozoides. Estes trabalhos ilustram que juntamente com a necessidade de entender o processo de congelamento seminal, é necessário também entender os fatores que afetam a qualidade dos espermatozoides. A variação encontrada pode estar relacionada a exposição dessas células a uma série de fatores que estão associados ao dia a dia do homem em nossa sociedade e não somente a questões técnicas dos protocolos.

Portanto, este estudo contribui para aumentar o conhecimento a respeito das técnicas envolvidas no congelamento seminal humano. A concentração dos espermatozoides parece não estar associada ao resultado do congelamento.

5. CONCLUSÃO

A variação exclusiva da concentração espermática não influenciou na taxa de recuperação da motilidade espermática e também não influenciou na taxa de sobrevivência espermática após o processo de congelamento e descongelamento.

Há correlação linear entre a taxa de recuperação da motilidade espermática e a taxa de sobrevivência espermática.

Baseado nos resultados desse estudo, não há necessidade de alterações no protocolo de congelamento utilizado na Clínica Vida em função da concentração espermática inicial da amostra seminal.

6. REFERÊNCIAS

- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, 1052p.
- ALVAREZ, C. et al. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. **Human Reproduction**, v. 18, n. 10, p. 2082-2088. 2003.
- AMANN, R. P. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? **Journal of andrology**. v.29:469-87. 2008.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of equine veterinary science**, v. 7, n. 3, p. 145-173. 1987.
- AMARAL, A. et al. Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. **Molecular & cellular proteomics**. 12:330-42. 2013.
- ARAÚJO, C. H. M. et al. Gametogênese: estágio fundamental do desenvolvimento para reprodução humana. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 40, n. 4, p. 551-558. 2007.
- ARIBARG, A. et al. Prediction of post-thaw sperm motility and sperm cryosurvival rate using the pre-freeze sperm parameters. **Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmaihet thangphaet**, v. 78, n. 9, p. 474-480. 1995.
- ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v.41, p.395-406. 1987.
- AUSTIN, C. R. The capacitation of the mammalian sperm. **Nature**. 170: 326, 1952.
- BAKER, H. W. G.; KOVACS, G. T. Spontaneous improvement in semen quality: regression towards the mean. **International Journal of Andrology**, v. 8, n. 6, p. 421-426. 1985.
- BARROS, A. et al. Birth after electroejaculation coupled to intracytoplasmic sperm injection in a gun-shot spinal cord-injured man. **Archives of andrology**, v. 41, n. 1, p. 5-9. 1998.
- BARROS, C. et al. Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. **The Journal of cell biology**, v. 34, n. 3, p. C1. 1967.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. Defects of the sperm head. In: Barth, A. D., Oko, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa State University: Ames, 1989. Cap1, 130-192p. 1989.

BEDFORD, J. M. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 1, p. 108-120, 1983.

BIANCHI, I. et al. Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1978-1983. 2008.

BIERMANN, K.; STEGER, K. Epigenetics in male germ cells. **Journal of andrology** 28:466-80. 2007.

BREUCKER, H.; SCHAFFER, E.; HOLSTEIN, A. F. Morphogenesis and fate of the residual body in human spermiogenesis. **Cell and tissue research**. 240:303-9. 1985.

BUNGUM, M.; BUNGUM, L.; GIWERCMAN, A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. **Asian journal of andrology**, v. 13, n. 1, p. 69. 2011.

CAMEJO, M. I. et al. Selenium, copper and zinc in seminal plasma of men with varicocele, relationship with seminal parameters. **Biological Trace Element Research**. 143, 1247–1254. 2011.

CHANG, M. C.; PINCUS, G. Physiology of fertilization in mammals. *Physiological Reviews*. 31:1-26. 1951.

CHIAN, Ri-Cheng; QUINN, Patrick (Ed.). **Fertility cryopreservation**. Cambridge University Press. 2010.

CLERMONT, Y.; LEBLOND, C.P. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the periodic acid-Schiff technique. **The American journal of anatomy** 96:229-53.1995.

CONWELL, C. C.; VILFAN, I.D.; HUD, N. V. Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 100:9296-301. 2003.

CREMONESE, C. et al. Occupational exposure to pesticides, reproductive hormone levels and sperm quality in young Brazilian men. **Reproductive Toxicology**, v. 67, p. 174-185. 2017.

DAVID, M. A.; HENRY, G. S. The Chemistry Hall of Fame: A Winning Assay: Glycerol: A Jack Of All Trades. Academy, North York (Toronto), Ontario 1996.

DAVIS, B. K.; BYRNE, R.; HUNGUND, B. Studies on the mechanism of capacitation, II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.558, p.257-266. 1979.

DRABOVICH, A. P. et al. Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. **Nature Reviews Urology**, 11(5), 278–288. 2014.

DROSDZOL, A.; SKRZYPULEC, V. Evaluation of marital and sexual interactions of Polish infertile couples. **The journal of sexual medicine**, v. 6, n. 12, p. 3335-3346. 2009.

EDDY, E. M.; TOSHIMORI, K.; O'BRIEN, D. A. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Microscopy research and technique** 61:103-15. 2003)

FABOZZI, G. et al. Evaluation of the efficiency of two different freezing media and two different protocols to preserve human spermatozoa from cryoinjury. **International journal of reproductive medicine**, v. 2016. 2016.

FARRANT, J. Water transport and cell survival in cryobiological procedures. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**. 278(959):191-205. 1977.

FICKEL, Jörn; WAGENER, Asja; LUDWIG, Arne. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v. 53, n. 2, p. 81-89. 2007.

FRASER, L. R.; UMAR, G.; SAYED, S. Na⁺-requiring mechanisms modulate capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. **Reproduction**, v. 97, n. 2, p. 539-549, 1993.

FRASER, L. R. Na⁺ Requirements for Capacitation. In: **International review of cytology**. Academic Press, 1994. p. 1-46.

FRASER, L. R. p-Aminobenzamidine, an acrosin inhibitor, inhibits mouse sperm penetration of the zona pellucida but not the acrosome reaction. **Journal of Reproductive Fertility** 65:185-194. 1982.

Freezing. The Editors of Encyclopædia Britannica.
<https://www.britannica.com/topic/freezing-food-preservation>.

GABALDI, S.H.; WOLF, A. A Importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciências Agrárias Saúde. FEA**, v. 2, n. 2, p. 66-70. 2002.

GONZALES, G. F. Function of seminal vesicles and their role on male fertility. **Asian Journal of Andrology**. 3, 251–258. 2001.

GRIFFIN, J.E.; WILSON, I. D. Disorders of the testes and male reproductive tract. In: LARSEN, H. M. et al. **Williams Textbook of Endocrinology**. Philadelphia: Saunders, 2003. 10th ed. p. 709-769.

GRIMES, D. A.; LOPEZ, L. M. “Oligozoospermia,” “azoospermia,” and other semen-analysis terminology: the need for better science. **Fertility and Sterility**, v. 28, issue 6, p.1491-1494. 2007.

GUYTON, A. C.; Hall, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. 2935p.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. **Endocrine Reviews**., v.23, 175-200. 2002.

HELLER, C. H.; CLERMONT, Y. Kinetics of the Germinal Epithelium in Man. **Recent progress in hormone research**. v.20:545-75. 1964.

IMRAT, P. et al. Effect of pre-freeze semen quality, extender and cryoprotectant on the post-thaw quality of Asian elephant (*Elephas maximus indicus*) semen. **Cryobiology**, v. 66, n. 1, p. 52-59. 2013.

JIANG, X. et al. Multivariate model for predicting semen cryopreservation outcomes in a human sperm bank. **Asian journal of andrology**, v. 19, n. 4, p. 404. 2017.

KAHRAMAN, S. et al. Pregnancies achieved with testicular and ejaculated spermatozoa in combination with intracytoplasmic sperm injection in men with totally or initially immotile spermatozoa in the ejaculate. **Human reproduction**, v. 11, n. 6, p. 1343-1346. 1996.

KAHRAMAN, S. et al. A healthy birth after intracytoplasmic sperm injection by using immotile testicular spermatozoa in a case with totally immotile ejaculated spermatozoa before and after Percoll gradients. **Human reproduction**, v. 12, n. 2, p. 292-293. 1997.

KASHIWAZAKI, Naomi et al. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, p. 0605010023-0605010023. 2006.

KLEENE, K. C. Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. **Cytogenetic and genome research** 103:217- 24. 2003.

KOPEIKA, J.; THORNHILL, A.; KHALAF, Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. **Human Reproduction Update**. 21(2):209-27. 2015.

KOSOWER, N. S.; KATAYOSE, H.; YANAGIMACHI, R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v.13, n.4, p.342-348, 1992.

KRUGER, T. F. et al. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. **Urology**. 30: 248-51. 1987.

KRUGER, T.F. et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**. 46: 1118-23. 1986.

LENZI, A. et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update** 2, 246–256. 1996.

LI, S. et al. Differential motility parameters and identification of proteomic profiles of human sperm cryopreserved with cryostraw and cryovial. **Clinical Proteomics**, v. 16, n. 1, p. 24. 2019.

LIU, D. Y.; BAKER, H. W. Calcium ionophore-induced acrosome reaction correlates with fertilization rates in vitro in patients with teratozoospermic semen. **Human reproduction** (Oxford, England), v. 13, n. 4, p. 905-910. 1998.

LOVELOCK, J. E. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. **Biochimica et Biophysica Acta**. 11(1):28-36. 1953.

LUIS I, S., et al. Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. **Human Reproduction Update**. v11: 123-135. 2005.

MANN, T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. **Journal of Reproductive Fertility**. 37, 179–188. 1974.

MAZUR, P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. **The Journal of General Physiology** 47 (2) 347-369. 1963.

MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; CHU, E. H. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. **Experimental Cell Research** 71:345–355. 1972.

MEDEIROS, C. M. O. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, 57: 327–44. 2002.

MERINO, M. M. et al. Elimination of unfit cells maintains tissue health and prolongs lifespan. **Cell**, v. 160, n. 3, p. 461-476. 2015.

MERYMAN, H. T., WILLIAMS R. J., DOUGLAS, M. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection. **Cryobiology**. 14(3):287-302. 1977.

MESEGUER, M. et al. Role of cholesterol, calcium, and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage after a cycle of freezing and thawing. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 3, p. 588-594. 2004.

MISELL, L.M. et al. A stable isotope-mass spectrometric method for measuring human spermatogenesis kinetics in vivo. **The Journal of urology**. v.175:242-6; 2006.

NALLELLA, K. P. et al. Inter-sample variability in post-thaw human spermatozoa. **Cryobiology**, v. 49, n. 2, p. 195-199. 2004.

NASCIMENTO, Fátima Regina Mibach do et al. Adiamento do projeto parental: um estudo psicológico com casais que enfrentam a esterilidade. 2009.

NETO, F. T. L. et al. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v59, 10–26. 2016.

NIJS, M. et al. Andrology: Fertilizing ability of immotile spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 11, n. 10, p. 2180-2185. 1996.

OLDENHOF, H. et al. Stallion sperm cryopreservation using various permeating agents: interplay between concentration and cooling rate. **Biopreservation and biobanking**, v. 15, n. 5, p. 422-431. 2017.

O'NEILL, H. C. et al. Improved cryopreservation of spermatozoa using vitrification: comparison of cryoprotectants and a novel device for long-term storage. **Journal of assisted reproduction and genetics**, p. 1-8. 2019.

OETTLE, E.E. et al. Ultrastructural parameters of fertile cryopreserved human sperm. **Archives of Andrology**. v. 29(2):151-6. 1992.

OKO, R.; SUTOVSKY, P. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. **Journal of reproductive immunology**. 83:2-7. 2009.

OLIVEIRA, E. C. S. et al. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1116-1122. 2006.

OSHEROFF, J. E. et al. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, p. 1017-1026. 1999.

PALERMO, G. et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. **The Lancet**, v. 340, n. 8810, p. 17-18. 1992.

PEGG, D. E. The history and principles of cryopreservation. In: **Seminars in reproductive medicine**. Copyright© 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. p. 005-014. 2002.

PLANT, T.M.; MARSHALL, G.R The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. **Endocrine Reviews**, v.22(6). 764-786. 2001.

POLGE, C.; SMITH, A.; PARKES, A. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. **Nature** 164:666. 1949.

PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE et al. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 1, p. 63, 2013.

PUNYATANASAKCHAI, P. et al. Comparison of cryopreserved human sperm in vapor and liquid phases of liquid nitrogen: effect on motility parameters, morphology, and sperm function. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 5, p. 1978-82, Nov. 2008.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small ruminant research**, v. 63, n. 3, p. 215-225. 2006.

RAAD, G. et al. Cryopreservation media differentially affect sperm motility, morphology and DNA integrity. **Andrology**, v. 6, n. 6, p. 836-845. 2018.

RALL, W.F., FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. **Nature**. 313(6003):573-75. 1985.

ROQUE, M. et al. Pharmacogenetic algorithm for individualized controlled ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles. **Panminerva medica**, v. 61, n. 1, p. 76-81. 2019.

SALAS-HUETOS, A. et al. Diet and sperm quality: Nutrients, foods and dietary patterns. **Reproductive Biology**. 2019.

SHARMA, R. K., et al. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. **Urology** 76, 1380– 1386. 2010.

SHERMAN, J. K. Low Temperature Research On Spermatozoa And Eggs. **Cryobiology** 1 (2) 103-29. 1964.

SHULMAN, A. et al. In-vitro fertilization treatment for severe male factor: the fertilization potential of immotile spermatozoa obtained by testicular extraction. **Human Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 749-752. 1999.

SMITH, A. U. **Viability of frozen spermatozoa**. In: Biological effects of freezing and supercooling. 1961. Monographs of the physiological society. H. Barcroft, H Dawson, W 578 Paton Eds., Baltimore, pp. 8-44.

STALF, T. et al. Influence of motility and vitality in intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. **Andrologia**, v. 37, n. 4, p. 125-130. 2005.

SUN, J. G.; JURISICOVA, A.; CASPER, R. F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. **Biology of reproduction** 56:602-7. 1997.

SUTOVSKY, P. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In: JONGE, C. J. D.; BARRATT, C. L. R. **The sperm cell : production, maturation, fertilization, regeneration**. Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press p.1-30. 2006.

TANPHAICHITR, N. et al. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. **Experimental cell research** 117:347-56. 1978.

TJER, G.C.-C. et al. Birth of a healthy baby after transfer of blastocysts derived from cryopreserved human oocytes fertilized with frozen spermatozoa. **Fertility and sterility**, v. 83, n. 5, p. 1547. e1-1547. e3. 2005.

TUREK, P. Male reproductive physiology. In: Wein A. J., Kavoussi L. R., Partin A. W. **Campbell-Walsh urology** 11. ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2016. 516-37p.

VALLE, G. R.; SILVA FILHO, J. M. Membrana plasmática do espermatozóide. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária/UFMG**, Belo Horizonte, n. 36, p.45-53. 2001.

VANDERVORST, M. et al. Patients with absolutely immotile spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 12, n. 11, p. 2429-2433. 1997.

VISCONTI, P. E. et al. The molecular basis of sperm capacitation. **Journal of Andrology**, v.19, p.242-248. 1998.

WALCERZ, D. B.; KAROW, A. M. Cryopreservation of Cells for Tissue Engineering. **Tissue Engineering**, 2(2), 85–96. 1996.

WANG, C. W. et al. Pregnancy after intracytoplasmic injection of immotile sperm. A case report. **The Journal of reproductive medicine**, v. 42, n. 7, p. 448-450. 1997.

WHO laboratory manual for the examination and processing of human sêmen. 5th ed., 2010.

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **Veterinary quarterly**, v. 19, n. 3, p. 135-138. 1997.

WRIGHT, C.; MILNE, S.; LEESON, H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. **Reproductive biomedicine online**, v. 28, n. 6, p. 684-703. 2014.

WU, C. J. et al. Evidence for the autocrine induction of capacitation of mammalian spermatozoa. **J Biological Chemistry**, v. 276, p. 26962-26968. 2001.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: _____ **The Physiology of Reproduction**. New York, Raven Press, p. 189-317. 1994.

YOSHIDA, K. et al. Physiological roles of semenogelin I and zinc in sperm motility and semen coagulation on ejaculation in humans. **Molecular Human Reproduction** 14, 151–156. 2008.

ZHOU, L. et al. Influence factors on the cryosurvival rate of post-thaw spermatozoa from sperm donors. **Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology**, v. 20, n. 6, p. 523-526. 2014.