



UFRJ

BANCO DE SÊMEN  
DO RIO DE JANEIRO



**Lincoln Bastos Farias Junior**

Definição de um protocolo de criopreservação seminal para o Banco de  
Sêmen do Rio de Janeiro

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ  
Mestrado Profissional de Formação para Pesquisa Biomédica

Rio de Janeiro

2023



UFRJ



**Lincoln Bastos Farias Junior**

Definição de um protocolo de criopreservação seminal para o Banco de  
Sêmen do Rio de Janeiro

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
APRESENTADA AO MESTRADO  
PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO  
PARA A PESQUISA BIOMÉDICA DO  
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS  
CHAGAS FILHO DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
COMO REQUISITO À OBTENÇÃO  
DO TÍTULO DE MESTRE EM  
FORMAÇÃO DE PESQUISA  
BIOMÉDICA

Orientador: Dr. Marcel Frajblat

Co-orientadora: Dra. Paula Fontoura Coelho de Souza

Rio de Janeiro

2023

## Ficha Catalográfica

Farias Junior, Lincoln Bastos.

Definição de um protocolo de criopreservação seminal para o Banco de Sêmen do Rio de Janeiro. / Lincoln Bastos Farias Junior. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2023.

83 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Marcel Frajblat.

Orientadora: Paula Fontoura Coelho de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica, 2023.

Referências: f. 63-69.

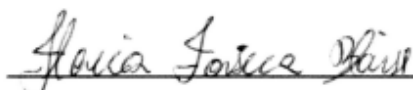
1. . 2. . 3. . 4. . 5. . – Tese. I. Frajblat, Marcel. II. Souza, Paula Fontoura Coelho de. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica. IV. Título.

**LINCOLN BASTOS FARIAS JUNIOR**

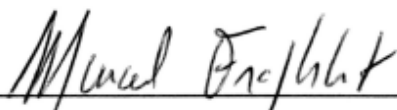
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

Rio de Janeiro, 22 de setembro de 2023.



\_\_\_\_\_  
DRA. FLAVIA FONSECA BLOISE (DOUTORA – UFRJ)  
(COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA)



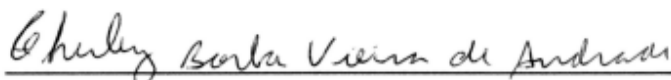
\_\_\_\_\_  
DR. MARCEL FRAJBLAT (DOUTOR – UFRJ) – ORIENTADOR

**VÍDEOCONFERÊNCIA**

\_\_\_\_\_  
DRA. PAULA FONTOURA COELHO DE SOUZA (DOUTORA – UERJ) – COORIENTADORA

**VÍDEOCONFERÊNCIA**

\_\_\_\_\_  
DR. ALFRED PAUL SENN (DOUTOR)



\_\_\_\_\_  
DRA. CHERLEY BORBA VIEIRA DE ANDRADE (DOUTORA – UFRJ)

**VÍDEOCONFERÊNCIA**

\_\_\_\_\_  
DR. LUIZ AUGUSTO GIORDANO (DOUTOR – UNIRIO)

**VÍDEOCONFERÊNCIA**

\_\_\_\_\_  
DRA. MARIANA BOECHAT DE ABREU (DOUTORA – UFRJ) - REVISORA

## **AGRADECIMENTOS**

À meu pai, Lincoln, que se ainda estivesse entre nós, com certeza estaria muito orgulhoso de mais uma conquista. Sem você eu não estaria aqui. Espero que de onde esteja, consiga ver a minha caminhada.

À minha mãe, Vera, e minha irmã, Ticiane, que são meu alicerce. Obrigado por tudo. Vocês são parte fundamental de mim

À meus amigos que estão sempre ao meu lado.

À Felipe, por me ouvir, me acolher e sempre tentar me ajudar em todos os passos.

À meu orientador, Marcel, agradeço por toda ajuda nesta jornada.

À Paula e Mariana, diretoras do Banco de Sêmen do Rio de Janeiro, obrigado por todos os ensinamentos e por permitir a realização dos experimentos deste trabalho em seu laboratório.

## RESUMO

FARIAS JUNIOR, LINCOLN BASTOS. Definição de um protocolo de criopreservação seminal para o Banco de Sêmen do Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado Profissional em Formação para Pesquisa Biomédica). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

**Introdução:** O congelamento seminal permite a preservação da fertilidade de pacientes que passam por tratamentos e/ou cirurgias que afetem o potencial reprodutivo. Entretanto, sem o uso de um agente crioprotetor, o processo pode levar ao choque térmico ou à formação de cristais de gelo e limitar a viabilidade dos espermatozoides. Nos meios de congelamento comerciais, são utilizados crioprotetores permeáveis e impermeáveis. A gema de ovo é um crioprotetor impermeável muito utilizado, porém, por ser de origem animal, pode ter maior suscetibilidade à contaminação e difícil padronização entre os lotes. Estudos indicam que componentes na gema de ovo podem interferir com proteínas do líquido seminal. A albumina sérica humana e a frutose oferecem uma proteção maior ou igual à da gema de ovo contra danos causados pelo resfriamento. Sendo assim, estudos comparativos são importantes para a obtenção de melhores resultados nesta técnica. **Objetivo:** O objetivo do presente trabalho é comparar os crioprotetores *Spermfreeze™*, *Spermfreeze SSP™* e *Ingá Spermfreezing™* e definir o Protocolo Operacional Padrão (POP) para o criopreservação seminal no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro (BSRJ) **Materiais e métodos:** Participaram do estudo 13 pacientes do Banco de Sêmen do Rio de Janeiro. Antes da análise, os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que informa a utilização de seus dados em estudos científicos. Foram excluídos no estudo os pacientes que apresentaram azoospermia ou oligospermia acentuada. O congelamento foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante de cada meio e as amostras ficaram congeladas pelo período de um mês. Após um mês, passaram pelo processo de descongelamento para nova análise das taxas de motilidade, vitalidade e morfologia espermáticas. **Resultados:** Após a análise antes e após o congelamento da amostra, a média de recuperação da motilidade espermática foi de  $59,21 \pm 5,027$  utilizando o *Spermfreeze™*,  $61,15 \pm 4,562$  utilizando o

IngáSpermfreezing™, e  $61,86 \pm 6,134$  utilizando o Spermfreeze SSP™; a média de recuperação da morfologia espermática foi de  $91,59 \pm 3,299$  utilizando o Spermfreeze™,  $86,01 \pm 5,536$  utilizando o IngáSpermfreezing™, e  $91,20 \pm 4,452$  utilizando o Spermfreeze SSP™; a média de recuperação da vitalidade espermática foi de  $60,06 \pm 4,940$  utilizando o Spermfreeze™,  $58,88 \pm 6,512$  utilizando o IngáSpermfreezing™, e  $56,16 \pm 7,275$  utilizando o Spermfreeze SSP™. Não foi encontrada diferença significativa entre os entre os crioprotetores nos parâmetros motilidade, sobrevida e morfologia espermática. **Conclusão:** Com o objetivo de diminuir o uso de componentes de origem animal no laboratório do BSRJ e pensando no custo-benefício de cada meio de criopreservação, o meio Spermfreeze™ da Fertipro® foi eleito como crioprotetor de escolha para a criopreservação seminal no BSRJ.

Palavras-chave: espermatozoides, criopreservação, fertilidade

## ABSTRACT

FARIAS JUNIOR, LINCOLN BASTOS. Definition of a protocol of seminal cryopreservation for Rio de Janeiro's Sperm Bank.. Dissertação (Mestrado Profissional em Formação para Pesquisa Biomédica). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

**Introduction:** Sperm freezing has been allowing fertility preservation of patients that go through cytotoxic treatments and/or surgeries that affect the reproductive potential. Without a protector agent, the freezing can lead to thermal shock or the formation of ice crystals, which damages the spermatozoa. In the commercial crioprotetor, there are the permeable crioprotetor and the non permeable crioprotetor. The egg yolk is largely used as a non permeable crioprotetor media. However, as this substance has an animal origin, it can be more susceptible to contamination and it can be harder to standardize the batches. Studies show that components in the egg yolk can interfere with the seminal proteins. The human serum albumin and the fructose offer a greater or similar protection against the damage caused by freezing. Therefore, comparative studies are important to improve the freezing techniques. **Objective:** The aim of this study is to compare the crioprotetors *Spermfreeze*<sup>™</sup>, *Ingá Spermfreezing*<sup>™</sup> and *Spermfreeze SSP*<sup>™</sup> and define a standard operating procedure (SOP) for sperm cryopreservation at Rio de Janeiro's Sperm Bank. **Methodology:** Samples of 13 patients of Rio de Janeiro Sperm Bank were used. The patients signed a Free and Informed Consent Form, which informs the possibility of using their data in scientific studies. Patients with azoospermia, severe oligospermia were excluded from the study. Before the freezing, the parameters motility, morphology and vitality of the samples were analyzed. The freezing was carried out according to the protocol of each kit and the samples were frozen for a period of one month. After one month, they went through the thawing process to analyze the rates of motility, vitality and sperm morphology. **Results:** After the analysis before and after freezing the sample of the volunteers, the mean of recovery of sperm motility was 59,21,1±5,027 using *Spermfreeze*<sup>™</sup>, 61,15±4,562 using *Ingá Spermfreezing* and 61,86±6,134 using *Spermfreeze SSP*<sup>™</sup>; the mean of recovery of sperm morphology was 91,59±3,299 using *Spermfreeze*, 86,01±5,536 using *Ingá Spermfreezing* and 91.20±4,452 using



*Spermfreeze SSP*<sup>™</sup>, the mean of recovery of sperm vitality was  $60,06 \pm 4.940$  using *Spermfreeze*,  $58.88 \pm 6,512$  using *Ingá Spermfreezing* and  $56,16 \pm 7.275$  using *Spermfreeze SSP*<sup>™</sup>. No significant difference was found between cryoprotectants in the parameters of motility, survival, and sperm morphology. **Conclusion:** Aiming the reduction of the use of components of animal origin in the laboratory at Rio de Janeiro's Sperm Bank and considering the cost-effectiveness of each cryopreservation medium, Fertipro® *Spermfreeze*<sup>™</sup> medium was used as the cryoprotector solution of choice for seminal cryopreservation at Rio de Janeiro's Sperm Bank.

Key-words: spermatozoa, cryopreservation, fertility

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Aal: Espermatogônia *a-aligned*

ABP: do inglês *androgen binding protein*

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Ap: Espermatogônia *a-paired*

BSRJ: Banco de Sêmen do Rio de Janeiro

CNS: Conselho Nacional de Saúde

FSH: do inglês *follicle stimulating hormone*

GDNF: do inglês, *Glial Cell Line-derived Factor*

GnRH: do inglês *Gonadotropin hormone-releasing hormone*

HIV: do inglês *human immunodeficiency virus*

IBGE: Instituto Brasileiro de geografia e estatística

LH: do inglês *Luteinizing hormone*

OMS: Organização Mundial da Saúde

POP: Protocolo operacional padrão

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFRJ: Universidade Federal Do Rio de Janeiro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema mostrando as fases da espermatogênese.....	18
Figura 2 – Espermiogênese - A) Mudanças morfológicas que ocorrem na espermatíde no processo de espermiogênese até a formação do espermatozoide. B) Esquema de um espermatozoide após o processo de espermiogênese.....	19
Figura 3 - Esquema com os principais motivos que levam ao congelamento de sêmen.....	24
Figura 4 - Esquema de exemplos do crioprotetores permeáveis e impermeáveis..	26
Figura 5 - Espermatozoides observados em aumento de 20X, na câmara de contagem.....	34
Figura 6 - Espermatozoides observados em microscópio óptico no aumento de 40X após o teste de vitalidade. Espermatozoides mortos corados de rosa e espermatozoides vivos não corados (indicado pela seta). .....	35
Figura 7 - Espermatozoides observados em microscópio óptico no aumento de 100X. Corados com o kit Spermac™ .....	36
Figura 8 – Materias utilizados no congelamento seminal. A) Palhetas de congelamento seminal. B) Raquis plásticas utilizadas para acondicionamento de palhetas de congelamento seminal.....	37
Figura 9 - Gráfico 1 de respostas para a primeira pergunta do questionário: “Qual meio é usado em sua clínica para a criopreservação seminal?” .....	41
Figura 10 - Gráfico 2 de respostas para a segunda pergunta: “Qual o motivo da escolha desse meio de criopreservação seminal?” .....	43
Figura 11 - Gráfico 3 de respostas para a terceira pergunta do questionário: “Em que região se localiza seu laboratório?” .....	44
Figura 12 - Esquema do Protocolo Operacional padrão escolhido (Spermfreeze™)	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Motivos da escolha de cada crioprotetor pelos profissionais da área de Reprodução Humana Assistida.....	43
Tabela 2 - Percentuais de motilidade de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor Spermfreeze™ .....	45
Tabela 3 - Percentuais de motilidade de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor Ingá Spermfreezing™ .....	46
Tabela 4 - Percentuais de motilidade de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor Spermfreeze SSP™ .....	46
Tabela 5 - Média e erro padrão das taxas de recuperação de motilidade com os crioprotetores utilizados .....	47
Tabela 6 - Percentuais de vitalidade de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor Spermfreeze™ .....	48
Tabela 7 - Percentuais de vitalidade de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor IngáSpermfreezing™ .....	48
Tabela 8 - Percentuais de vitalidade de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor Spermfreeze SSP™ .....	49
Tabela 9 - Média e erro padrão das taxas de vitalidade com os crioprotetores utilizados.....	49
Tabela 10 - Percentuais de morfologia de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor Spermfreeze™ .....	50
Tabela 11 - Percentuais de morfologia de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor IngáSpermfreezing™ .....	51

Tabela 12 - Percentuais de morfologia de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor Spermfreeze SSP™ .....	51
Tabela 13 - Média e erro padrão das taxas recuperação de morfologia com os crioprotetores utilizados .....	52
Tabela 14. Comparação do custo-benefício apresentado por cada crioprotetor .....	52

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 HISTÓRICO DA CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL.....	15
1.2 FERTILIDADE MASCULINA.....	16
<b>1.2.1 Espermatogênese</b> .....	16
<b>1.2.2 Prevalência da Infertilidade</b> .....	20
1.3 POR QUE CRIOPRESERVAR? .....	21
1.4. BANCO DE SÊMEN DO RIO DE JANEIRO.....	24
1.5 CRIOPROTEÇÃO .....	25
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	29
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	30
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL .....	30
3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	30
<b>4 MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	31
4.1 QUESTIONÁRIO PARA PROFISSIONAIS DA ÁREA DA REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA.....	31
4.2 SELEÇÃO DE PACIENTES.....	32
<b>4.2.1 Critério de inclusão</b> .....	33
<b>4.2.2 Critério de exclusão</b> .....	33
<b>4.2.3 Questionário para os pacientes</b> .....	33
4.3 COLETA SEMINAL .....	33
4.4 ANÁLISE SEMINAL PRÉ-CONGELAMENTO.....	34
<b>4.4.1 Análise da motilidade</b> .....	34
<b>4.4.2 Análise da vitalidade</b> .....	35
<b>4.4.3 Análise da morfologia</b> .....	35
4.5 CONGELAMENTO SEMINAL.....	36
<b>4.5.1 Congelamento com Spermfreeze™ - Fertipro®</b> .....	37
<b>4.5.2 Congelamento com Spermfreeze SSP™ - Fertipro®</b> .....	38
<b>4.5.3 Congelamento com Ingá Spermfreezing™ - Ingamed®</b> .....	38
4.6 DESCONGELAMENTO SEMINAL .....	39
4.7 ANÁLISE SEMINAL PÓS-DESCONGELAMENTO .....	39
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4.9 ANÁLISES DE CUSTO-BENEFÍCIO .....	40

<b>5. RESULTADOS</b> .....	41
5.1 QUESTIONÁRIO PARA PROFISSIONAIS DA REPRODUÇÃO ASSISTIDA .....	41
5.2 ANÁLISE SEMINAL .....	44
<b>5.2.1 Taxa de recuperação</b> .....	44
<b>5.2.2 Motilidade</b> .....	45
<b>5.2.3 Vitalidade</b> .....	47
<b>5.2.4 Morfologia</b> .....	50
5.3 ANÁLISES DE CUSTO-BENEFÍCIO .....	52
5.4 DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO OPERACIONAL PADRÃO .....	53
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	60
<b>8 PRODUTO FINAL</b> .....	61
<b>9 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	62
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	63
<b>APÊNDICE I</b> – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	70
<b>APÊNDICE II</b> – Protocolo Operacional Padrão para o congelamento seminal no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro .....	73
<b>APÊNDICE III</b> – Ficha de elaboração de Protocolo Operacional Padrão .....	74
<b>ANEXO I</b> – Aprovação do comitê de ética em pesquisa .....	82
<b>ANEXO II</b> – Questionário para coleta do Banco de Sêmen do Rio de Janeiro.....	83

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTÓRICO DA CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL

A tentativa de preservar tecidos biológicos é muito antiga. Existem registros de 1322 que relatam o uso do leite de camelo para preservação de sêmen equino até o momento de seu uso em uma inseminação artificial (ALI; ALHARBI; ALI, 2017; ARRUDA DE OLIVEIRA et al., 2015).

Em 1776, ocorreu a primeira tentativa documentada de congelamento de amostra biológica seminal, realizada pelo pesquisador Spallanzani. Foram realizados experimentos utilizando espermatozoides de humanos, cães, cavalos, touros, sapos e salamandras. O congelamento foi realizado em neve e após o descongelamento foi observada, ao microscópio, a retomada do movimento dos espermatozoides (ROYERE et al., 1996; SPALLANZANI, 1776; SZTEIN; TAKEO; NAKAGATA, 2018).

O espermatozoide é uma célula pequena, porém, com grande área de superfície, o que o torna menos susceptível ao dano causado pela diminuição da temperatura. Ainda assim, sem um agente protetor, o congelamento pode levar ao choque térmico ou à formação de cristais de gelo e inviabilizar células (HEZAVEHEI et al., 2018). Em 1949, o glicerol foi descrito como a primeira substância com a capacidade de proteger os espermatozoides contra esses danos causados pelo congelamento, nesse estudo, foram utilizados espermatozoides de galo. (POLGE; SMITH; PARKES, 1949).

Em 1953, foi realizado o primeiro congelamento bem sucedido de sêmen humano com posterior uso em inseminação artificial e obtenção de gravidez em três mulheres (BUNGE; SHERMAN, 1953). Até este momento, os espermatozoides eram criopreservados em gelo seco, na temperatura de -75 °C. Porém, em 1963, o nitrogênio líquido a -196 °C passou a ser utilizado já que proporcionava uma melhor qualidade seminal pós-descongelamento (SHERMAN, 1963).



## 1.2 FERTILIDADE MASCULINA

### 1.2.1 Espermatogênese

O gameta masculino é uma célula haploide altamente diferenciada que tem a capacidade de reconhecer e fertilizar o gameta feminino (TOSHIMORI, 2003). Essa célula é formada nos túbulos seminíferos dos testículos. Esses órgãos ficam localizados no saco escrotal, região na qual a temperatura é de 2 a 3 °C menor que a do corpo, sendo ideal para a espermatogênese (THIJSSSEN et al., 2014).

Antes da puberdade, os túbulos seminíferos não apresentam luz e são compostos por células de sustentação e células germinativas primordiais, as espermatogônias-tronco (MOORE, 2016). Na puberdade, essas células de sustentação se diferenciam nas células de Sertoli, que são células somáticas importantes para espermatogênese. Elas fornecem suporte nutricional e físico para células germinativas, além de secretar substâncias necessárias para a espermatogênese (ALVES et al., 2013). Outro tipo celular muito importante para esse processo são as células de Leydig, que estão presentes no espaço intertubular e são responsáveis pela secreção de testosterona, hormônio essencial para produção de espermatozoides (ILIADOU et al., 2015).

A espermatogênese depende de uma complexa regulação endócrina, parácrina e autócrina. O eixo hipotálamo-hipófise-gônada, está muito envolvido nesse processo. O hipotálamo é uma região do sistema nervoso central que tem como uma de suas funções, junto com a hipófise, glândula endócrina, regular a atividade de diversas glândulas do corpo humano. O hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH, do inglês *Gonadotropin hormone-releasing hormone*) que estimula a hipófise a produzir e secretar tanto o hormônio luteinizante (LH, do inglês *luteinizing hormone*) quanto o hormônio folículo estimulantes (FSH, do inglês *follicle stimulating hormone*), também denominados gonadotrofinas. Ambos os hormônios são essenciais para a espermatogênese (AIRES, 2008).

As gonadotrofinas vão atuar diretamente nas células do testículo. O LH age nas células de Leydig, estimulando a produção de testosterona e o FSH vai agir nas

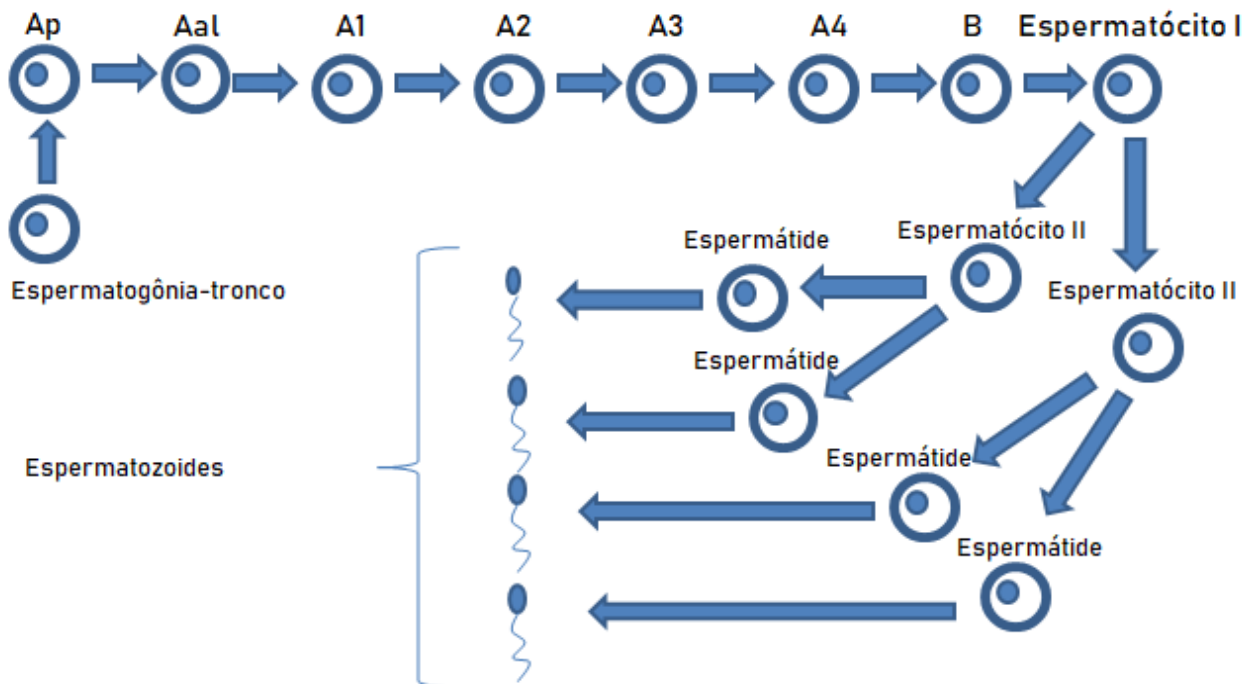
células de Sertoli, estimulando a produção da inibina, da proteína ligadora de andrógenos (ABP, do inglês *androgen binding protein*) e de diversos fatores de crescimento (GUNES et al., 2016). Tanto a testosterona como a inibina funcionam como um *feedback* negativo para o hipotálamo e a hipófise, inibindo a síntese e liberação de GnRH e das gonadotrofinas, o que permite a regulação da liberação hormonal (ROTH; PAGE; BREMNER, 2016). A testosterona é liberada na corrente sanguínea e age em diversos órgãos do corpo do homem, porém, parte desse andrógeno também deve permanecer nos testículos. O ABP produzido pelas células de Sertoli se liga à testosterona e faz com que esse andrógeno não seja liberado em sua totalidade, agindo também nas gônadas masculinas (GRISWOLD, 2018).

A testosterona não age diretamente nas células germinativas, ela se liga aos receptores de andrógenos presentes nas células de Leydig, do músculo liso das arteríolas e das células do endotélio vascular, realizando uma sinalização parácrina. A testosterona é o principal estímulo para maturação das células de Sertoli (REY et al., 2009). Esse andrógeno também age nas próprias células de Leydig, realizando uma sinalização autócrina, atuando na maturação dessas células e estimulando a expressão de proteínas envolvidas na síntese desse hormônio (O'HARA et al., 2015). Além disso, também é essencial para pelo menos quatro fases da espermatogênese: manutenção da barreira hematotesticular (estimulando a expressão de proteínas de junção de oclusão), meiose (a falta de testosterona faz com que poucas espermátides sejam formadas), adesão das espermátides às células de Sertoli (durante as espermiogênese, as espermátides estão aderidas às células de Sertoli e, sem a testosterona, há um aumento da liberação de células imaturas, sem que seja completo esse processo), liberação dos espermatozoides na luz dos túbulos seminíferos (sem a testosterona muitos espermatozoides não são liberados para o lúmen tubular e são fagocitados pelas células de Sertoli) (SMITH; WALKER, 2014).

A espermatogênese começa quando as espermatogônias-tronco, presentes no testículo desde o nascimento, passam por sucessivas divisões mitóticas formando primeiramente espermatogônias *A-paired* (Ap) e depois as espermatogônias *A-aligned* (Aal), decorrente de fatores de crescimento secretados pelas células de Sertoli, sob o estímulo de FSH, um exemplo é o Fator neurotrófico derivado da Glia (GDNF, do inglês, *Glial Cell Line-derived Factor*). Essas células

sofrem diferenciação por sucessivas divisões mitóticas formando as espermatogônias do tipo A1, A2, A3, A4 e B (CANNARELLA et al., 2020). As espermatogônias B serão as que se diferenciarão em espermatócitos primários (JUNQUEIRA, 2013; MOORE, 2016). Os espermatócitos primários passam pela meiose I, e dão origem aos espermatócitos secundários. Essa primeira divisão meiótica é reducional, ou seja, o número de cromossomos da célula filha possui metade do número de cromossomos da célula mãe. São formadas células haploides. Essas células realizam a meiose II e formam as espermatídes. Essa segunda divisão meiótica é equacional, ou seja, não há alteração no número de cromossomos. As espermatídes passam por um processo chamado espermiogênese para, então, formar os espermatozoides (MOORE, 2016). A figura 1 mostra um esquema do processo completo da espermatogênese.

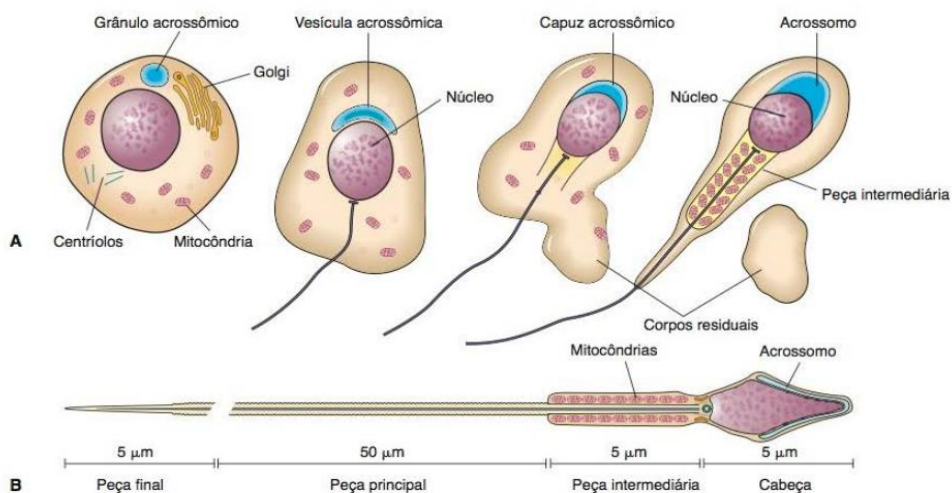
Figura 1 - Esquema mostrando as fases da espermatogênese. As espermatogônias-tronco se diferenciam por sucessivas divisões mitóticas em espermatogônias AP, que continuam essas divisões formando espermatogônias Aa1, A1, A2, A3, A4 e B. A espermatogônias B passam por uma diferenciação celular o que dá origem aos espermatócitos I que passam pela meiose I que culmina na formação dos espermatócitos II. Esses passam pela meiose II, que forma as espermatídes. As espermatídes passam pelo processo de espermiogênese para formação dos espermatozoides.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na espermiogênese diversas modificações levam a espermatíde, originalmente redonda, a se tornar espermatozoides compostos por cabeça, peça intermediária e cauda. As etapas da espermiogênese são: do complexo de Golgi, do acrossoma e de maturação. Na primeira etapa, há um acúmulo de grânulos pró-acrossômicos que se fusionam, o que resulta na formação de um grânulo acrossômico único. O grânulo acrossômico é armazenado na vesícula acrossômica. Outro evento que ocorre nesta fase é a migração dos centríolos para posição oposta à essa vesícula, o que forma o axonema. Essa estrutura é o eixo central do flagelo. Na próxima etapa, o grânulo e a vesícula se posicionam na metade anterior do núcleo, formando o capuz acrossômico, que vai originar o acrossoma e, o flagelo é formado a partir dos centríolos. Concomitantemente, mitocôndrias se deslocam para porção proximal do flagelo, o que dará origem à peça intermediária. O núcleo se torna mais condensado e alongado durante esse período. Na etapa de maturação, grande parte do citoplasma da espermatíde é desprezado. Os corpos residuais são fagocitados pelas células de Sertoli. Com o fim da espermiogênese, os espermatozoides formados são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos e levados ao epidídimo, onde passarão pelo processo de maturação (JUNQUEIRA, 2013). A figura 2 mostra as alterações morfológicas que ocorrem na espermiogênese.

Figura 2 – Espermiogênese - A) Mudanças morfológicas que ocorrem na espermatíde no processo de espermiogênese até a formação do espermatozoide, como a formação do acrossoma pelo complexo de golgi, a migração das mitocôndrias para região da peça intermediária e a reorganização dos microtúbulos para formação da cauda. B) Esquema de um espermatozoide após o processo de espermiogênese.



Fonte: (JUNQUEIRA, 2013).

### 1.2.2 Prevalência da Infertilidade

A infertilidade é uma doença conjugal, ou seja, pode ser causada por fator masculino, feminino ou ambos, e é definida pela não obtenção de gravidez clínica após doze meses de relações sexuais frequentes sem uso de nenhum método contraceptivo (LINDSAY; VITRIKAS, 2015; ZEGERS-HOCHSCHILD et al., 2009).

Essa condição é considerada um problema de saúde mundial atualmente. Ela afeta de 10 a 20% dos casais em idade reprodutiva (EISENBERG et al., 2023). De acordo com a projeção do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (<https://www.ibge.gov.br/apps//populacao/projecao/>) temos uma população atual no Brasil de 213 milhões de pessoas. Destes, temos 43 milhões de homens e mulheres em idade reprodutiva (20-45 anos). Considerando a taxa média de 15% indicada acima, podemos estimar uma população de 6.45 milhões de indivíduos com algum problema de infertilidade.

O fator masculino é o responsável pelo diagnóstico de infertilidade em 20 a 30% dos casos. Porém, ele está presente, em combinação com o fator feminino, em 50% dos casos (MATUMO et al., 2020; VANDER BORGHT; WYNS, 2018). Considerando a estimativa acima do número potencial de casais com problemas de fertilidade, podemos estimar que problemas masculinos estão presentes em 1.3 milhões destes casais. Estas estimativas podem ilustrar a importância das técnicas de reprodução assistida e a necessidade de ferramentas mais eficientes de investigação e preservação da fertilidade masculina.

Existem condições que podem afetar a espermatogênese, prejudicar os órgãos do sistema reprodutor masculino ou causar alterações hormonais e, por consequência, prejudicar a fertilidade masculina. Algumas dessas condições serão discutidas em seguida (DE ROO et al., 2016; FERRARI et al., 2016; HEZAVEHEI et al., 2018).

### 1.3 POR QUE CRIOPRESERVAR?

O congelamento seminal é uma forma de preservação da fertilidade masculina que pode ser utilizada em diversas situações. Alguns motivos para realizar esse procedimento são (figura 3):

- pacientes em tratamento oncológico (quimioterapia e radioterapia),
- cirurgias que vão afetar diretamente a produção de espermatozoides ou do sêmen (orquiectomia e/ou prostatectomia),
- cirurgia de vasectomia,
- tratamentos de transição de gênero,
- pacientes soropositivos que desejam realizar técnicas de reprodução assistida,
- doação de gametas.

Esse armazenamento permite o uso futuro dessas amostras em procedimentos de reprodução assistida (HEZAVEHEI et al., 2018).

Tratamentos como quimioterapia e radioterapia podem afetar a produção de espermatozoides e/ou o potencial reprodutivo. Esses tratamentos para câncer podem afetar negativamente a gametogênese. As drogas utilizadas têm o objetivo de destruir as células cancerígenas, as quais proliferam com muita rapidez. As células envolvidas na espermatogênese também passam por essa rápida proliferação, portanto, teoriza-se que, por esse motivo, elas também sejam atacadas por esses fármacos. O dano causado vai depender da dose, do tempo de administração, do medicamento utilizado no tratamento e de características de cada indivíduo (ANDERSON et al., 2015; BARAK, 2019; POIROT et al., 2013; VAKALOPOULOS et al., 2015). Além disso, o câncer em si pode levar a um declínio do potencial reprodutivo, sendo o câncer de testículo o tipo de malignidade mais comumente associado à baixa qualidade seminal. Todavia, outros tipos de câncer como câncer de próstata, melanoma e linfoma não Hodgkin foram relacionados com o prejuízo da produção espermática mesmo antes do início de qualquer tratamento (DEARING, C. et al., 2014; DEARING, C. G.; JAYASENA; LINDSAY, 2017; DOHLE, 2010). Um estudo de 2016 comparou a qualidade seminal de voluntários a

doação de sêmen e de homens que obtiveram gestação clínica com a qualidade seminal de pacientes oncológicos com diferentes tipos de câncer. Dentre eles: Câncer de testículo, linfoma Hodking e não Hodking, leucemia, sarcoma e tumor cerebral. Destas malignidades, os pacientes com câncer de testículo e Linfoma foram os que apresentaram piores parâmetros seminais. Porém, todos os grupos apresentaram um declínio de qualidade seminal quando comparado com o grupo de homens saudáveis. Esse estudo mostra a importância da preservação da fertilidade em pacientes oncológicos e a necessidade de trabalhos para entender melhor como o câncer pode afetar a fertilidade (AUGER; SERMONDADE; EUSTACHE, 2016).

Algumas cirurgias no aparelho reprodutivo masculino podem levar à redução da qualidade seminal ou até mesmo à infertilidade. Cirurgias como a prostatectomia (retirada da próstata) e orquiectomia (retirada do testículo) são exemplos, já que a próstata é uma glândula importante para a formação do sêmen e os testículos são os órgãos que produzem os espermatozoides (JUNQUEIRA, 2013).

Dentre os procedimentos cirúrgicos, também podemos destacar a vasectomia que é uma forma de contracepção masculina. Ela é atualmente muito comum e tem como objetivo impedir que os espermatozoides estejam presentes no ejaculado. Nessa cirurgia, o vaso deferente é seccionado, o que impossibilita a chegada dos espermatozoides à uretra e, por consequência, impede sua liberação no líquido seminal (FAINBERG; KASHANIAN, 2018).

Outro grupo que pode se beneficiar da criopreservação seminal são pessoas que vão passar por tratamentos de transição de gênero. Nesse caso, indivíduos que nasceram com o sexo biológico masculino e não se identificam com o mesmo, podem realizar procedimentos de redesignação de gênero. Tanto as intervenções cirúrgicas quanto as hormonais podem afetar o potencial reprodutivo parcial ou completamente (DE ROO et al., 2016; T'SJOEN; VAN CAENEGEM; WIERCKX, 2013).

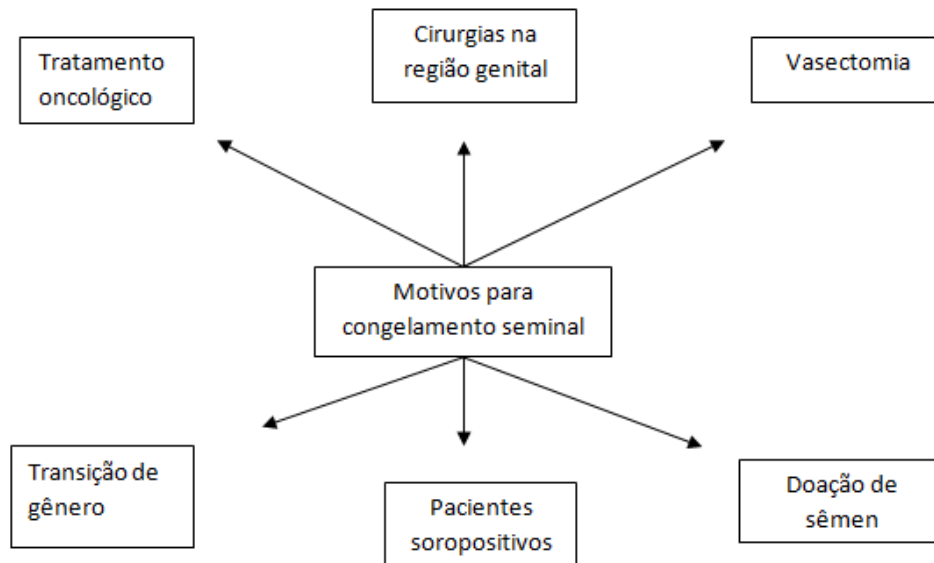
Em todos os casos citados acima, o congelamento seminal representa a possibilidade de preservação da fertilidade. Esta técnica permite que o indivíduo possa utilizar essas células futuramente em técnicas de reprodução assistida para obter uma gestação (RAJAN; MATSUMURA, 2018).

O congelamento seminal não é utilizado apenas para quem necessita armazenar seus gametas por longos períodos de tempo. Um exemplo disso são pacientes portadores do Vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*) que desejem realizar técnicas de reprodução assistida. O HIV está presente no plasma seminal, portanto, nesses casos, o sêmen é processado com técnicas de capacitação espermática para que os espermatozoides sejam separados do plasma seminal e, assim, seja possível reduzir a chance da presença do vírus nesse material. Porém, parte dessa amostra processada deve passar por testes para confirmação da ausência de vírus, para que, então, possa ser utilizada. Como esses resultados podem não ser imediatos, o restante da amostra deve ser congelada para ser utilizado quando se obtiver o resultado (BUJAN et al., 2007; PRISANT et al., 2010; SANTULLI et al., 2011).

Outro procedimento que envolve o congelamento seminal é a doação de sêmen. Homens saudáveis com uma boa qualidade seminal podem doar seus gametas em bancos de sêmen (HUANG et al., 2019). Cada país tem legislações específicas sobre a doação de sêmen. No Brasil, de acordo com a RDC Nº 23, de 27 de maio de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a doação só pode ser feita por homens com idade maior ou igual a 18 anos e deve ser anônima. Além disso, o doador precisa passar por uma série de exames de infecções sexualmente transmissíveis (IST's) antes das coletas e devem repetir esses exames devido à janela imunológica (ANVISA, 2011). Isso quer dizer que, no Brasil, uma amostra seminal doada fica, obrigatoriamente, criopreservada antes de poder ser utilizada.



Figura 3 - Esquema com os principais motivos que levam ao congelamento de sêmen.



Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 1.4. BANCO DE SÊMEN DO RIO DE JANEIRO

O Banco de Sêmen do Rio de Janeiro (BSRJ) foi criado em 2016 com o objetivo de melhorar o atendimento aos homens que procuram serviços relacionados à fertilidade masculina. Sua equipe é formada por biólogos e biomédicos especialistas na área de Reprodução Humana Assistida.

Diferentemente de uma clínica de reprodução assistida, em um banco de sêmen, os serviços são voltados exclusivamente para o fator masculino. Eles incluem exames para avaliação da qualidade seminal, preparo de amostras para inseminação intrauterina e o congelamento de sêmen. Atualmente, o banco possui amostras criopreservadas homólogas (em que o paciente congela para uso próprio) e amostras para doação. As amostras para doação são fornecidas para diversas clínicas pelo Brasil.

No BSRJ, o congelamento de sêmen era realizado com meios comerciais com a presença de gema de ovos de galinha. Porém, estudos indicam que o uso desse componente pode aumentar o risco de contaminação da amostra, por ser de

origem animal. Também pensando na diminuição do uso de substâncias de origem animal no laboratório, o uso de um novo meio de congelamento sem a presença da gema de ovo passou a ser sugerido. Este trabalho tem o intuito de testar cientificamente se o uso de um meio sem gema apresenta resultados semelhantes ou melhores que o meio tradicional com gema de ovo.

## 1.5 CRIOPROTEÇÃO

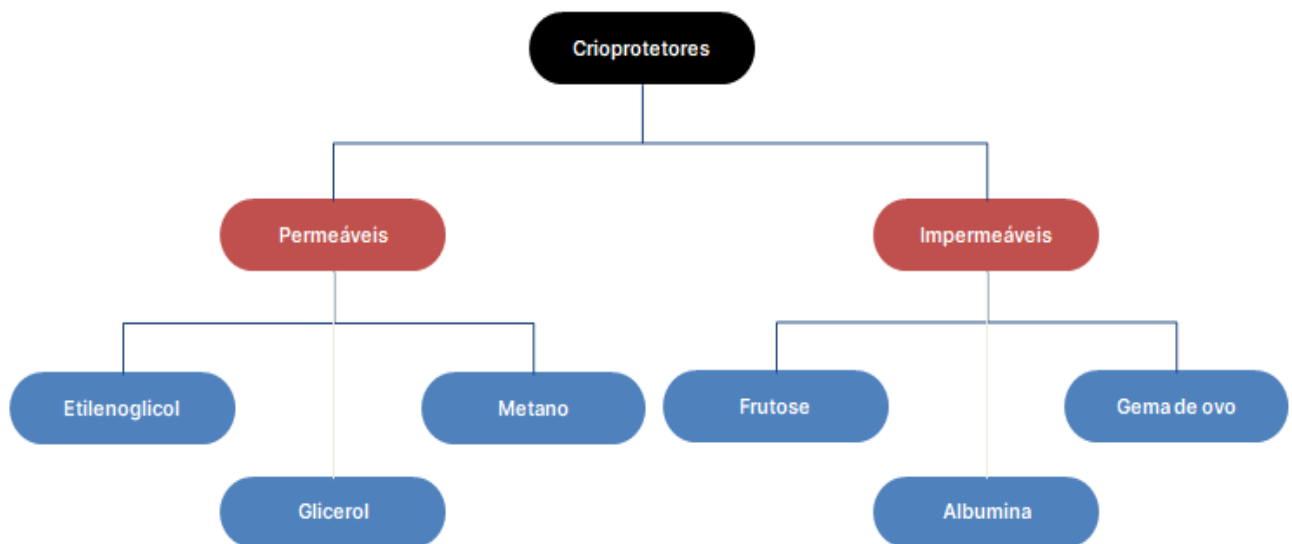
Atualmente, o congelamento seminal se mostra como a principal medida confiável para preservação da fertilidade masculina. O sêmen pode se manter criopreservado por décadas, sendo 28 anos o maior período de armazenamento que resultou em gravidez em seres humanos por técnicas de reprodução assistida até o momento (ABRAM MCBRIDE; LIPSHULTZ, 2018).

Entretanto, o congelamento e descongelamento seminal ainda hoje podem resultar em danos aos espermatozoides, levando a uma diminuição de sua motilidade e vitalidade. Estima-se que apenas 50% dos espermatozoides móveis sobrevivam ao processo de congelamento e descongelamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION., 2021). Isto leva ao desenvolvimento de diferentes tipos de meio de congelamento com concentrações diferentes das substâncias utilizadas (RAAD et al., 2018). Sendo assim, é necessário que existam estudos comparando os diferentes meios de congelamento, para destacar qual é o mais vantajoso para a preservação da fertilidade.

Uma estratégia para minimizar os efeitos que as baixas temperaturas e o congelamento causam nas células é o uso de substâncias crioprotetoras. A primeira substância encontrada com a capacidade de oferecer essa proteção foi o glicerol (POLGE et al., 1949). Essa é um composto orgânico com função álcool e que ainda é largamente utilizado (LE et al., 2019). Posteriormente, diversos estudos identificaram outros agentes com características crioprotetoras similares, como por exemplo: propileno glicol, etileno glicol, entre outros (AGCA; CRITSER, 2002; NIJS; OMBELET, 2001; RAJAN; MATSUMURA, 2018).

O fator protetor destes componentes é fundamentado no princípio da osmose e difusão (ALMODIN; COSTA, 2014). Estes crioprotetores são divididos em dois tipos principais de acordo com a capacidade de penetração na célula, crioprotetores permeáveis e impermeáveis (Figura 4).

Figura 4 - Esquema de exemplos do crioprotetores permeáveis e impermeáveis. Os crioprotetores permeáveis penetram nas células e impedem a formação de cristais de gelo. Já os impermeáveis promovem a desidratação da célula por osmose, permitindo assim, a entrada do crioprotetor permeável na célula.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os crioprotetores permeáveis penetram nas células, substituindo as moléculas de água e impedindo a formação de cristais de gelo. Isso ocorre devido à diminuição do ponto de congelamento (SHARMA et al., 2015). Exemplos de crioprotetores permeáveis são: glicerol, dimetilsulfóxido, etileno glicol, metano e propileno glicol (AGCA; CRITSER, 2002). Já os crioprotetores impermeáveis promovem a desidratação da célula por osmose. O meio extracelular se torna mais concentrado, o que leva a desidratação do espermatozoide pela saída de água para o meio externo. Esse processo também permite a entrada do crioprotetor permeável na célula (SIEME; OLDENHOF; WOLKERS, 2016). Exemplos de crioprotetores

impermeáveis são: frutose, albumina, glicose e gema de ovo (NIJS; OMBELET, 2001).

A gema de ovo é amplamente utilizada em meios de criopreservação humano e animal. Porém, o fato de ser de origem animal faz com que seja necessária a pesquisa de substitutos para esse componente por ter maior suscetibilidade à contaminação e difícil padronização entre os lotes (ABDEL-AZIZ SWELUM et al., 2019; TIWARI et al., 2017). Estudos com congelamento de sêmen animal indicam que os diversos componentes na gema de ovo podem interferir com proteínas importantes presentes no líquido seminal. PINI et al. (2018) observou uma alteração no perfil proteico do sêmen de carneiros congelados com o uso de gêmea de ovo, inclusive foi observada a presença da proteína ApoA1, principal componente da lipoproteína de alta densidade, que pode ter impacto prejudicial na capacitação espermática. Essa proteína pode causar desestabilização da membrana do espermatozoide e perda da integridade do acrossoma. RAMIREZ-VASQUEZ, R. R. A. et al. (2019), também utilizando sêmen de carneiros, identificou uma diminuição da interação de proteínas do plasma seminal com a membrana de espermatozoides quando utilizados meios com gema de ovo. Outro estudo de RAMIREZ-VASQUEZ, R. et al. (2019) mostrou que a presença da gema de ovo pode diminuir a capacidade das proteínas seminais de proteger os espermatozoides contra danos causados pelo congelamento, nesse estudo também foram utilizados espermatozoides de carneiro. Ainda não se sabe como essa interferência pode afetar a taxa de fertilização dos espermatozoides, porém, esse é um dado importante para estimular a realização de estudos utilizando outros tipos de crioprotetores não permeáveis (RAMIREZ-VASQUEZ, R. R. A. et al., 2019).

A albumina sérica humana e a frutose oferecem uma proteção maior ou igual à da gema de ovo contra danos causados pelo resfriamento e têm potencial para substituir a gema de ovo, diminuindo o uso de substâncias de origem animal no laboratório de andrologia (MAHADEVAN; TROUNSON, 1983)

Existe, ainda, um bom espaço para melhorias nos meios e nas tecnologias de congelamento de sêmen. Podemos listar as áreas nas quais é possível melhorar o processo de congelamento de sêmen humano:

- Aumento na motilidade e vitalidade dos espermatozoides que sobrevivem ao processo.
- Desenvolvimento de novos meios de criopreservação sem a utilização de componentes animais.
- Desenvolvimento de novos meios de envase das amostras congeladas.

## **2 JUSTIFICATIVA**

O Banco de Sêmen do Rio de Janeiro é um laboratório voltado para a investigação e preservação da fertilidade masculina. Atualmente, diferentes meios de congelamento estão disponíveis no mercado com diferentes composições. Uma das principais diferenças é a presença ou ausência de um componente animal no meio, a gema de ovo de galinha.

O Banco de Sêmen do Rio de Janeiro precisa definir o meio que será utilizado em sua rotina. A proposta do presente trabalho é testar qual meio tem o melhor desempenho no congelamento e descongelamento seminal e definir o protocolo padrão para o laboratório.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar os crioprotetores *Spermfreeze*<sup>TM</sup>, *Spermfreeze SSP*<sup>TM</sup>, *Ingá Spermfreezing*<sup>TM</sup>, e com isso, estabelecer o Protocolo Operacional Padrão (POP) para congelamento de sêmen no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro.

#### 3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Verificar o meio de crioproteção utilizado pelos profissionais de Reprodução Humana Assistida no Brasil, bem como o motivo da escolha.

Comparar a qualidade seminal pós-descongelamento, através da avaliação dos parâmetros de motilidade, vitalidade e morfologia espermáticas, utilizando-se três diferentes crioprotetores (*Spermfreeze*<sup>TM</sup>, *Spermfreeze SSP*<sup>TM</sup>, *Ingá Spermfreezing*<sup>TM</sup>).

Comparar o custo benefício dos três crioprotetores (*Spermfreeze*<sup>TM</sup>, *Spermfreeze SSP*<sup>TM</sup>, *Ingá Spermfreezing*<sup>TM</sup>).

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 QUESTIONÁRIO PARA PROFISSIONAIS DA ÁREA DA REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA

Foi elaborado um questionário para profissionais da área da reprodução humana assistida utilizando a plataforma *Google Forms*. No questionário foi perguntado qual o meio de congelamento seminal que é utilizado, o motivo da escolha e a região onde se encontra a clínica.

Este questionário foi enviado para profissionais que realizam congelamento seminal, em clínicas de reprodução assistida, no Brasil. Para análise dos resultados foi utilizado o programa *Excel*. Os dados foram apresentados em percentual para meio utilizado, para o motivo de seu uso e para região da clínica.

No questionário foram feitas as seguintes perguntas, com suas respectivas opções de resposta:

*A. Qual meio é usado em sua clínica para a criopreservação seminal?  
Marque uma ou mais opções se necessário (em caso de “outros” anotar o meio utilizado no espaço disponível)*

- Spremfreeze - Fertipro*
- Spermfreeze SSP – Fertipro*
- Ingá Spermfreezing - Ingamed*
- TYB - Irvine*
- Sperm Freezing – Global*
- SpermFreeze Solution - Vitrolife*
- Outros: \_\_\_\_\_*



*B. Qual o motivo da escolha desse meio de criopreservação seminal? Marque uma ou mais opções se necessário (em caso de “outros” anotar o motivo no espaço disponível)*

- Preço*
- Praticidade*
- Qualidade*
- Composição*
- Facilidade da entrega*
- Temperatura de armazenamento*
- Outros: \_\_\_\_\_*

*C. Em que região se localiza seu laboratório?*

- Norte*
- Nordeste*
- Sul*
- Sudeste*
- Centro-Oeste*

## 4.2 SELEÇÃO DE PACIENTES

Para comparação dos meios de criopreservação foram selecionados voluntários provenientes do laboratório do Banco de Sêmen do Rio de Janeiro, que estavam em investigação de qualidade seminal de novembro de 2020 a maio de 2021. Antes da análise seminal, os pacientes que aceitaram participar da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE I) que informa a possibilidade de utilização de seus dados em estudos científicos. O projeto está em consonância com a Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 e Resolução nº 441 de 12 maio de 2011 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sob o número 4.223.580 (ANEXO I).

#### **4.2.1 Critério de inclusão**

Foram incluídos no estudo pacientes de 18 a 50 anos, provenientes do Laboratório do Banco de Sêmen do Rio de Janeiro, que se submeteram ao espermograma, e que concordaram em participar do trabalho.

#### **4.2.2 Critério de exclusão**

Foram excluídos do estudo pacientes que possuíssem menos de 3 ml de volume seminal, diagnóstico de azoospermia ou oligospermia acentuadas (menos de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL) (BAK et al., 2010; SONG et al., 2010)

#### **4.2.3 Questionário para os pacientes**

Todos os pacientes que participaram do estudo responderam a um questionário padrão do Banco de Sêmen do Rio de Janeiro. Esse questionário é respondido rotineiramente por todos os pacientes que realizam algum dos exames oferecidos pelo BSRJ (ANEXO II).

### **4.3 COLETA SEMINAL**

A coleta seminal foi feita por meio da masturbação, respeitando o período de abstinência de 2 a 5 dias. As amostras foram coletadas em frascos estéreis e permaneceram a 37°C por 30 minutos até liquefação (WORLD HEALTH ORGANIZATION., 2021).

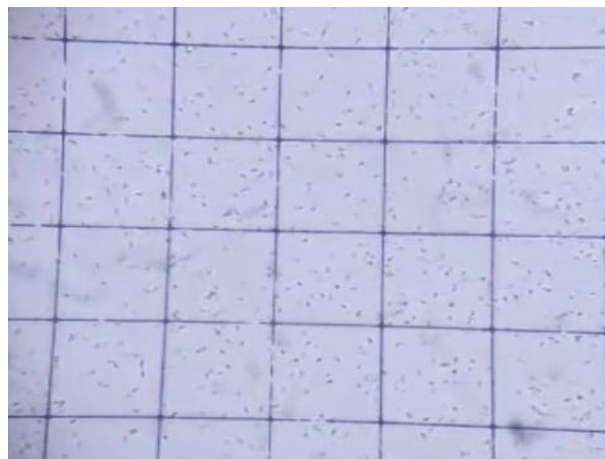
#### 4.4 ANÁLISE SEMINAL PRÉ-CONGELAMENTO

Após a liquefação da amostra e antes do congelamento foi realizada análise dos parâmetros motilidade, vitalidade e morfologia espermáticas de acordo com o Manual da Organização Mundial da Saúde (OMS) de análise e processamento seminal (WORLD HEALTH ORGANIZATION., 2010). O sêmen é composto pelos espermatozoides e o plasma seminal. Neste trabalho não houve separação e remoção do plasma seminal. Todas as análises e protocolos de congelamento foram realizados com o sêmen bruto.

##### 4.4.1 Análise da motilidade

A motilidade foi avaliada por meio da contagem e classificação dos espermatozoides na câmara de Makler®. Foram adicionados 10 µL de sêmen na câmara de Makler e a avaliação foi realizada em microscópio óptico no aumento de 20X (Figura 5) Os espermatozoides foram classificados em percentual de móveis progressivos (A+B), móveis não progressivos (C) e imóveis (D).

Figura 5 - Espermatozoides observados em aumento de 20X, na câmara de contagem.

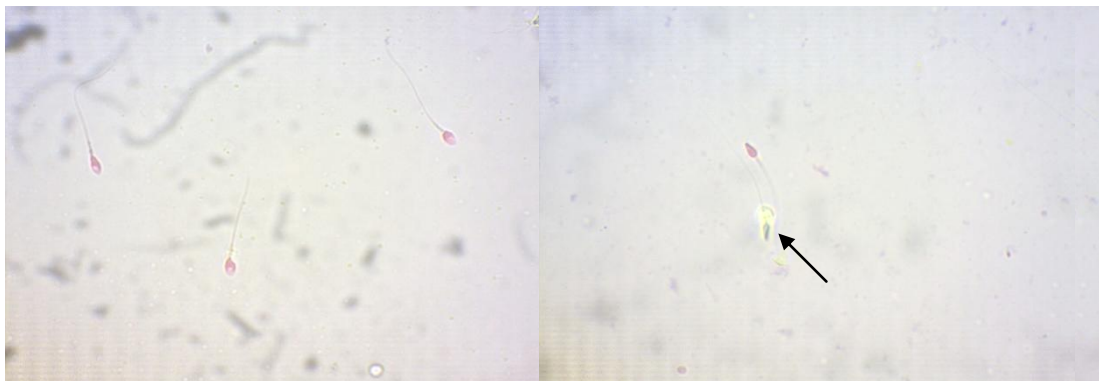


Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.4.2 Análise da vitalidade

A análise da vitalidade foi realizada com o kit VitalScreen™ da empresa Fertipro®. Foi adicionado a um tubo de 1,5 mL, 50 µL de sêmen. Foi adicionado ao sêmen, duas gotas do corante 1 (Eosina Y) e três gotas do corante 2 (Nigrosina). Em seguida, essa mistura de sêmen com os corantes foi colocada em uma lâmina coberta por uma lamínula. Os espermatozoides foram avaliados com aumento de 40X. Foram contados 100 espermatozoides e eles foram classificados em percentual de mortos (espermatozoides corados de rosa) e vivos (espermatozoides não corados) (Figura 6).

Figura 6 - Espermatozoides observados em microscópio óptico no aumento de 40X após o teste de vitalidade. Espermatozoides mortos corados de rosa e espermatozoides vivos não corados (indicado pela seta).



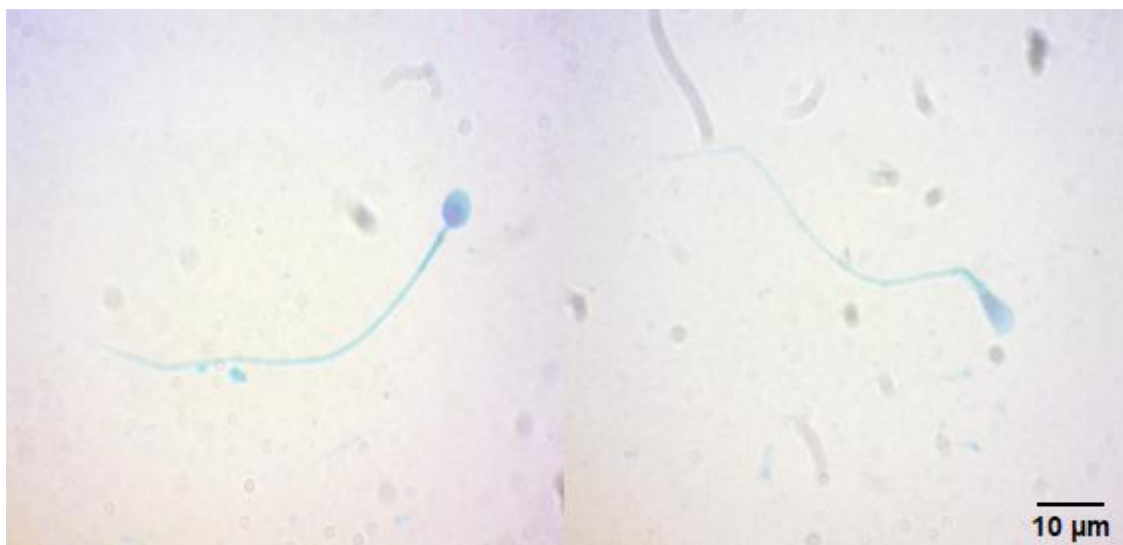
Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.4.3 Análise da morfologia

A análise da morfologia foi realizada com o kit Spermac™ da empresa Fertipro®. Foi feito um esfregaço com 10 µL de sêmen bruto em uma lâmina. A fixação do esfregaço foi realizada através da imersão da lâmina em solução de formaldeído por 5 minutos. Após a fixação, a lâmina permaneceu à temperatura ambiente até secar novamente, por completo. A lâmina foi lavada com 7 imersões em água destilada. Foi feita a imersão da lâmina no corante A do kit (composto de

água ultrapura, álcool etílico, rosa bengala e vermelho neutro), por 1 minuto, seguida de duas lavagens, através de 7 imersões em água destilada. Foi feita a imersão da lâmina no corante B do kit (composto de água ultrapura, ácido fosfomolibdico, álcool etílico, pironina Y e Laranja G), por 1 minuto, seguida de lavagem, através de 7 imersões em água destilada. Por último, foi feita a imersão da lâmina no corante C do kit (composto de água ultrapura, Verde Janus B e Fast Green FCF), por 1 minuto, seguida de lavagem, com 7 imersões em água destilada. Após secagem completa da lâmina, os espermatozoides foram observados em microscópio óptico no aumento de 100X em imersão, sendo contados 100 espermatozoides. Eles foram classificados de acordo com o critério estrito de Kruger (MENKVELD et al., 1990; WORLD HEALTH ORGANIZATION., 2021) em percentual de espermatozoides morfológicamente normais, alteração na cabeça, alteração na peça intermediária, alteração na cauda e alterações em múltiplas partes (Figura 7).

Figura 7 - Espermatozoides observados em microscópio óptico no aumento de 100X. Corados com o kit Spermac™.



Fonte: Elaborada pelo autor.

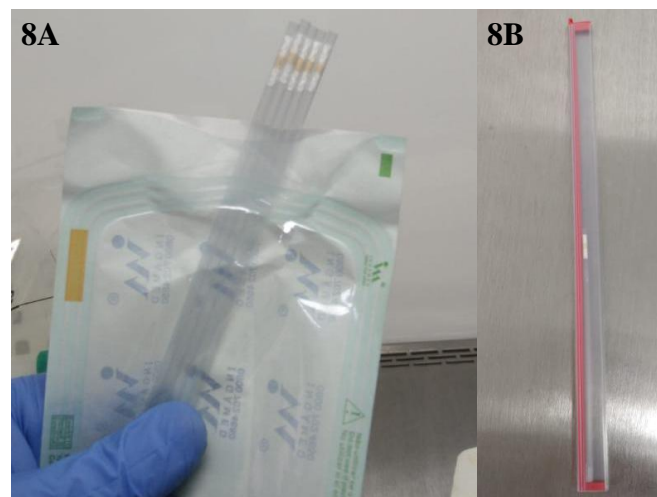
#### 4.5 CONGELAMENTO SEMINAL

Após a análise pré-congelamento, foi reservado um volume seminal total de 3 mL de cada amostra. Foi utilizado 1 mL de sêmen para o congelamento em cada um dos três protocolos testados seguindo as orientações da bula de cada meio:

- 1) *Spermfreeze™ - Fertipro.*
- 2) *Ingá Spermfreezing™ - Ingamed.*
- 3) *Spermfreeze SSP™ - Fertipro.*

Em todas as técnicas, o sêmen com crioprotetor foi envasado em palhetas de congelamento seminal (marca da palheta: Ingamed, capacidade de volume da palheta: 0,5 mL) e as pontas das palhetas foram seladas com uma seladora. As palhetas foram acomodadas em raquis plásticas (Figura 8A e 8B), e passaram pelas etapas de temperatura ambiente, vapor de nitrogênio líquido e, posteriormente, mergulhadas em nitrogênio líquido.

Figura 8 – Materias utilizados no congelamento seminal. A) Palhetas de congelamento seminal. B) Raquis plásticas utilizadas para acondicionamento de palhetas de congelamento seminal.



Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.5.1 Congelamento com *Spermfreeze™ - Fertipro®*

Nessa técnica, foi adicionado 0,7 mL de crioprotetor a 1 mL de sêmen previamente separado. O crioprotetor foi adicionado de forma gotejante e lenta. Após isso, o sêmen com crioprotetor foi imediatamente envasado em 3 palhetas (cerca de 0,5 ml de sêmen com meio, por palheta) . As palhetas foram acomodadas na raqui plástica e ficaram por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, a raqui, contendo as palhetas, foram colocadas em uma caixa de isopor a 2

centímetros de distância do nitrogênio líquido para que a amostra ficasse apenas em contato com o vapor de nitrogênio por mais 15 minutos. Passado esse tempo, a raqui foi mergulhada em um tanque de nitrogênio líquido, completando, assim, o congelamento.

#### **4.5.2 Congelamento com *Spermfreeze SSP™ - Fertipro®***

Nessa técnica, foi adicionado 0,3 mL de crioprotetor a 1 mL de sêmen previamente separado. O crioprotetor foi adicionado de forma gotejante e lenta. Após isso, o sêmen com crioprotetor foi imediatamente envasado em 3 palhetas (cerca de 0,5 ml de sêmen com meio, por palheta) . As palhetas foram acomodadas na raqui plástica e ficaram por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, a raqui, contendo as palhetas, foram colocadas em uma caixa de isopor a 2 centímetros de distância do nitrogênio líquido para que a amostra ficasse apenas em contato com o vapor de nitrogênio por mais 15 minutos. Passado esse tempo, a raqui foi mergulhada em um tanque de nitrogênio líquido, completando, assim, o congelamento.

#### **4.5.3 Congelamento com *Ingá Spermfreezing™ - Ingamed®***

Nessa técnica, foi adicionado 1,0 mL de crioprotetor a 1 mL de sêmen previamente separado. O crioprotetor foi adicionado de forma gotejante e lenta. Após isso, o sêmen com crioprotetor foi imediatamente envasado em 3 palhetas (cerca de 0,5 ml de sêmen com meio, por palheta) . As palhetas foram acomodadas na raqui plástica e ficaram por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, a raqui, contendo as palhetas, foram colocadas em uma caixa de isopor a 2 centímetros de distância do nitrogênio líquido para que a amostra ficasse apenas em contato com o vapor de nitrogênio por mais 10 minutos. Passado esse tempo, a raqui foi mergulhada em um tanque de nitrogênio líquido, completando, assim, o congelamento.

#### 4.6 DESCONGELAMENTO SEMINAL

As amostras permaneceram congeladas por um mês. Para o descongelamento seminal, as palhetas congeladas foram deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, uma das extremidades da palheta foi cortada para permitir que seu conteúdo fosse colocado em um tubo de 15 mL.

#### 4.7 ANÁLISE SEMINAL PÓS-DESCONGELAMENTO

Imediatamente após o descongelamento, foi realizada a análise dos parâmetros de motilidade, vitalidade e morfologia espermáticas da mesma forma que nas amostras pré-congelamento e já descritas anteriormente. Após a realização das análises, todas as amostras seminais foram devidamente descartadas.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa estatístico GraphPad Prism 6.0 foi utilizado para análise dos resultados. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. A normalidade da amostra foi testada através do teste D'Agostino-Pearson. Para análise estatística dos resultados de motilidade, vitalidade e morfologia espermática antes do congelamento e após o descongelamento em todos os protocolos foi utilizado o ANOVA, com o pós teste Tukey. A significância estatística foi considerada quando  $p$  foi menor ou igual a 0.05.



#### 4.9 ANÁLISES DE CUSTO-BENEFÍCIO

Além das avaliações laboratoriais, foi realizada uma análise de custo-benefício dos crioprotetores utilizados.

Foram levados em consideração o preço, a temperatura de armazenamento do meio, a logística de entrega, a validade do produto, e a ausência ou presença de componente animal.

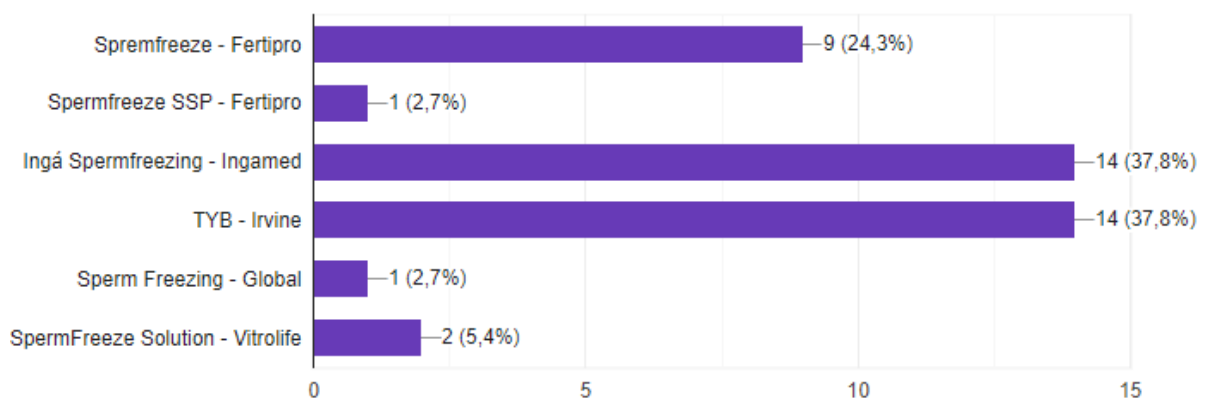
## 5. RESULTADOS

### 5.1 QUESTIONÁRIO PARA PROFISSIONAIS DA REPRODUÇÃO ASSISTIDA

O questionário enviado contou com 37 respostas de profissionais da reprodução humana assistida no Brasil.

No gráfico 1 estão representadas as respostas para a primeira pergunta: “Qual meio é usado em sua clínica para a criopreservação seminal?”. Das 37 respostas, 11 profissionais declararam utilizar o IngáSpermfreezing™ da Ingámed, 13 declararam utilizar o TYB™ da Irvine, 7 declararam utilizar o Spermfreeze™ da Fertipro, 1 declarou utilizar IngáSpermfreezing™ e Spermfreeze™, 1 declarou utilizar IngáSpermfreezing™ e o SpermFreezing™ da Global, 2 declararam utilizar o Spermfreeze Solution™ da Vitrolife, 1 declarou utilizar o IngáSpermfreezing™ e o TYB™ e 1 declarou utilizar o TYB™ da Irvine e o Spermfreeze SSP™ da Fertipro.

Figura 9 - Gráfico 1 de respostas para a primeira pergunta do questionário: “Qual meio é usado em sua clínica para a criopreservação seminal?”.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Dos 11 profissionais que escolheram o Ingá Sperfreezing™ da Ingámed, 9 selecionaram o preço como um dos motivos da escolha, 7 selecionaram a praticidade, 7 selecionaram a facilidade de entrega, 7 selecionaram a qualidade e 1 selecionou a composição.

Dos 13 profissionais que escolheram o TYB™ da Irvine, 2 selecionaram o preço como um dos motivos da escolha, 6 selecionaram a praticidade, 7 selecionaram a qualidade, 3 selecionaram a facilidade de entrega, 2 selecionaram a temperatura de armazenamento, 1 selecionou a comodidade, 1 selecionou a composição.

Dos 7 profissionais que escolheram o Spermfreeze™ da Fetipro, 5 selecionaram o preço como um dos motivos da escolha, 3 selecionaram a qualidade, 3 selecionaram a praticidade, 2 selecionaram a temperatura de armazenamento, 1 selecionou composição e 1 selecionou facilidade de entrega.

Dos 2 profissionais que escolheram o Spermfreeze Solution™ da Vitrolife, ambos selecionaram a qualidade como um dos motivos da escolha, e 1 selecionou também a facilidade de entrega.

O profissional que selecionou SpermFreeze™ da Global Fertipro e IngáSpermfreezing™ selecionou preço e qualidade como motivo da escolha.

O profissional que selecionou IngáSpermfreezing™ da Ingámed e o SpermFreezing™ da Global selecionou preço, qualidade e praticidade como motivo da escolha.

O profissional que selecionou TBY™ da Irvine e IngáSpermfreezing™ da Ingámed selecionou praticidade e facilidade de entrega como motivo da escolha.

O profissional que selecionou Spermfreeze™ da Fertipro e TBY™ da Irvine selecionou composição como motiva da escolha.

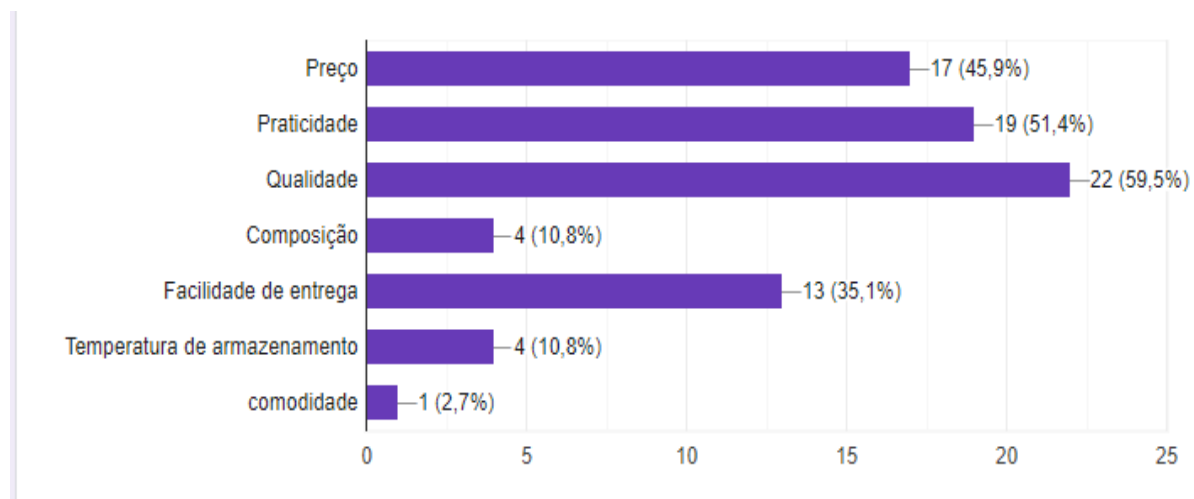
A tabela 1 resume os motivos da escolha dos profissionais e gráfico 2 representa as respostas para a segunda pergunta: “Qual o motivo da escolha desse meio de criopreservação seminal?”

Tabela 1 - Motivos da escolha de cada crioprotetor pelos profissionais da área de Reprodução Humana Assistida.

Crioprotetor /Motivo da escolha	Preço	Praticidade	Qualidade	Composição	Facilidade de entrega	Temperatura de armazenamento	Comodidade
Ingá Spermfreezing™ (11)	9	7	7	1	7	x	x
TYB™ (13)	2	6	7	1	3	2	1
Spermfreeze™ (7)	5	3	3	1	1	2	x
SpermFreeze Solution™ (3)	x	x	2	x	1	x	x
Spermfreeze™/Ingá Spermfreezing™ (1)	1	x	1	x	x	x	x
Ingá Spermfreezing™/Sperm Freezing™ (1)	1	1	1	x	x	x	x
Ingá Spermfreezing™/TYB™ (1)	x	1	x	x	1	x	x
Spermfreeze™/TYB™ (1)	x	x	x	1	x	x	x

Fonte: Elaborada pelo autor.

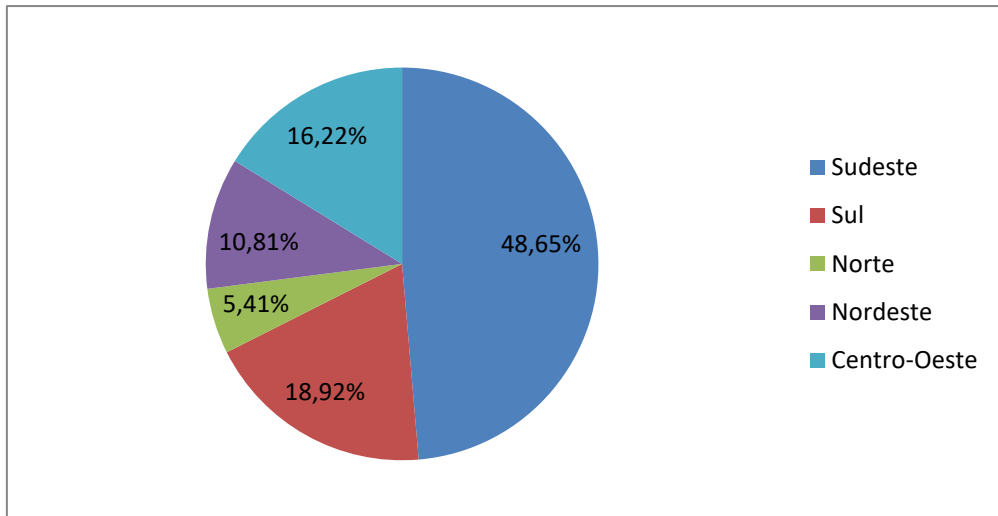
Figura 10 - Gráfico 2 de respostas para a segunda pergunta: “Qual o motivo da escolha desse meio de criopreservação seminal?”



Fonte: Elaborada pelo autor.

No gráfico 3 estão as respostas para a terceira pergunta: “Em que região se localiza seu laboratório?” Dos 37 profissionais, 18 trabalham na região Sudeste (48,6%), 7 na região Sul (18,9%), 2 na região Norte (5,4%), 4 na região Nordeste (10,8%) e 6 na região Centro-Oeste (16,2%).

Figura 11 - Gráfico 3 de respostas para a terceira pergunta do questionário: "Em que região se localiza seu laboratório?"



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5.2 ANÁLISE SEMINAL

Os resultados foram obtidos de amostras de 13 voluntários que realizaram espermograma no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro. Todas as 13 amostras foram congeladas utilizando os três meios crioprotetores estudados (Ingá Spermfreezing™, Spermfreeze™ e Spermfreeze SSP™).

### 5.2.1 Taxa de recuperação

A taxa de recuperação da motilidade, vitalidade e morfologia foi calculada obtendo a porcentagem de cada um desses parâmetros antes do congelamento e considerando como 100%. Após a análise após o descongelamento, foi calculado a porcentagem que foi recuperada em cada parâmetro.

### 5.2.2 Motilidade

O resultado da motilidade dos espermatozoides foi analisado com base na motilidade espermática antes e após congelamento seminal. O percentual de motilidade antes do congelamento foi comparado com o percentual de motilidade pós-descongelamento. A tabela 2, 3 e 4 mostram os resultados de motilidade antes do congelamento e após o descongelamento, com cada um dos meios crioprotetores. O percentual de motilidade recuperada, comparando as duas condições, foi calculado e também está presente nas tabelas. A tabela 2 representa os resultados obtidos com o crioprotetor Spermfreeze™, a tabela 3 representa os resultados obtidos com o crioprotetor Ingá Spermfreezing™ e a tabela 4 representa os resultados obtidos com o crioprotetor Spermfreeze SSP™.

Tabela 2 - Percentuais de motilidade de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor Spermfreeze™

Amostras	Motilidade (%)		
	Pré congelamento	Pós descongelamento - Spermfreeze	Recuperação - Spermfreeze
1	47,4	32,0	67,5
2	37,5	21,6	57,6
3	60,9	52,8	86,7
4	66,6	15,7	23,6
5	39,2	14,9	38,0
6	33,3	19,0	57,1
7	41,5	22,9	55,2
8	46,4	18,7	40,3
9	40,0	25,5	63,8
10	55,0	30,9	56,2
11	19,2	16,2	84,4
12	51,5	40,1	77,9
13	57,7	35,4	61,4

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 - Percentuais de motilidade de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor Ingá Spermfreezing™

Amostras	Motilidade (%)		
	Pré congelamento	Pós descongelamento – Ingá Spermfreezing	Recuperação - Ingá Spermfreezing
1	47,4	41,5	87,6
2	37,5	18,7	49,9
3	60,9	55,1	90,5
4	66,6	24,9	37,4
5	39,2	20,7	52,8
6	33,3	13,6	40,8
7	41,5	21,2	51,1
8	46,4	25,5	55,0
9	40,0	28,0	70,0
10	55,0	34,6	62,9
11	19,2	12,9	67,2
12	51,5	38,9	75,5
13	57,7	31,3	54,2

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 - Percentuais de motilidade de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor Spermfreeze SSP™

Amostras	Motilidade (%)		
	Pré congelamento	Pós descongelamento - Spermfreeze SSP	Recuperação - Spermfreeze SSP
1	47,4	24,1	50,8
2	37,5	13,4	35,7
3	60,9	55,2	90,6
4	66,6	21,2	31,8
5	39,2	23,3	59,4
6	33,3	21,8	65,5
7	41,5	29,1	70,1
8	46,4	20,9	45,0
9	40,0	16,4	41,0
10	55,0	33,7	61,3
11	19,2	21,0	109,4
12	51,5	40,0	77,7
13	57,7	38,0	65,9

Fonte: Elaborada pelo autor.

A tabela 5 mostra a média e erro padrão da taxa de recuperação da motilidade com o uso de cada crioprotetor.

Tabela 5 - Média e erro padrão das taxas de recuperação de motilidade com os crioprotetores utilizados

	Grupos/tratamentos		
	Spermfreeze™	Ingá Spermfreezing™	Spermfreeze SSP™
Taxa de recuperação da Motilidade	59,2± 5,027	61,2±4,562	61,9±6,134

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a análise estatística, não foi observada diferença significativa na comparação das taxas de recuperação da motilidade espermática com os crioprotetores utilizados (P= 0,76).

### 5.2.3 Vitalidade

O resultado da vitalidade dos espermatozoides foi analisado com base na vitalidade espermática antes e após congelamento seminal. A tabela 6, 7 e 8 mostram os resultados de vitalidade antes do congelamento e após o descongelamento. O percentual de vitalidade recuperada, comparando as duas condições, foi calculado e também está presente nas tabelas. A tabela 6 representa os resultados obtidos com o crioprotetor Spermfreeze™, a tabela 7 representa os resultados obtidos com o crioprotetor Ingá Spermfreezing™ e a tabela 8 representa os resultados obtidos com o crioprotetor Spermfreeze SSP™.



Tabela 6 - Percentuais de vitalidade de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor Spermfreeze™

Amostra	Vitalidade (%)		
	Pré congelamento	Pós descongelamento - Spermfreeze	Recuperação - Spermfreeze
1	85,0	50,0	58,8
2	76,0	30,0	39,5
3	84,0	58,0	69,0
4	39,0	28,0	71,8
5	61,0	35,0	57,4
6	35,0	22,0	62,9
7	63,0	30,0	47,6
8	61,0	36,0	59,0
9	70,0	20,0	28,6
10	81,0	36,0	44,4
11	72,0	45,0	62,5
12	72,0	65,0	90,3
13	82,0	73,0	89,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 7 - Percentuais de vitalidade de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor IngáSpermfreezing™

Amostra	Vitalidade (%)		
	Pré congelamento	Pós descongelamento - Ingamed	Recuperação - Ingamed
1	85,0	42,0	49,4
2	76,0	37,0	48,7
3	84,0	51,0	60,7
4	39,0	26,0	66,7
5	61,0	30,0	49,2
6	35,0	31,0	88,6
7	63,0	17,0	27,0
8	61,0	47,0	77,0
9	70,0	17,0	24,3
10	81,0	25,0	30,9
11	72,0	44,0	61,1
12	72,0	65,0	90,3
13	82,0	75,0	91,5

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 8 - Percentuais de vitalidade de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor Spermfreeze SSP™

Amostra	Vitalidade (%)		
	Pré congelamento	Pós descongelamento - Spermfreeze SSP	Recuperação - Spermfreeze SSP
1	85,0	22,0	25,9
2	76,0	26,0	34,2
3	84,0	76,0	90,5
4	39,0	20,0	51,3
5	61,0	30,0	49,2
6	35,0	33,0	94,3
7	63,0	21,0	33,3
8	61,0	32,0	52,5
9	70,0	11,0	15,7
10	81,0	39,0	48,1
11	72,0	44,0	61,1
12	72,0	62,0	86,1
13	82,0	72,0	87,8

Fonte: Elaborada pelo autor.

A tabela 9 mostra a média e erro padrão da recuperação da vitalidade com o uso de cada crioprotetor.

Tabela 9 - Média e erro padrão das taxas de vitalidade com os crioprotetores utilizados

	Grupos/tratamentos		
	Spermfreeze™	Ingá Spermfreezing™	Spermfreeze SSP™
Taxa de recuperação da Vitalidade	60,1 ± 4.940	58,9 ± 6,512	56,2 ± 7.275

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a análise estatística, não foi observada diferença significativa na comparação das taxas de recuperação da vitalidade espermática com os crioprotetores utilizados (P= 0,62).

### 5.2.4 Morfologia

O resultado da morfologia dos espermatozoides foi analisado com base na morfologia espermática antes e após congelamento seminal. A tabela 10, 11 e 12 mostram os resultados de morfologia antes do congelamento e após o descongelamento. A taxa de recuperação de morfologia espermática, comparando as duas condições, foi calculada e também está presente nas tabelas. A tabela 10 representa os resultados obtidos com o crioprotetor Spermfreeze™, a tabela 11 representa os resultados obtidos com o crioprotetor Ingá Spermfreezing™ e a tabela 12 representa os resultados obtidos com o crioprotetor Spermfreeze SSP™.

Tabela 10 - Percentuais de morfologia de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor Spermfreeze™

Amostra	Morfologia (%)		
	Pré congelamento	Pós descongelamento - Spermfreeze	Recuperação - Spermfreeze
1	2,0	2,0	100,0
2	1,0	1,0	100,0
3	7,0	6,0	85,7
4	1,0	1,0	100,0
5	4,0	3,0	75,0
6	1,0	1,0	100,0
7	6,0	4,0	66,7
8	1,0	1,0	100,0
9	1,0	1,0	100,0
10	1,0	1,0	100,0
11	2,0	2,0	100,0
12	5,0	4,0	80,0
13	6,0	5,0	83,3

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 11 - Percentuais de morfologia de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor IngáSpermfreezing™

Amostra	Morfologia (%)		
	Pré congelamento	Pós descongelamento – Ingá Spermfreezing	Recuperação - Ingá Spermfreezing
1	2,0	1,0	50,0
2	1,0	1,0	100,0
3	7,0	5,0	71,4
4	1,0	1,0	100,0
5	4,0	2,0	50,0
6	1,0	1,0	100,0
7	6,0	4,0	66,7
8	1,0	1,0	100,0
9	1,0	1,0	100,0
10	1,0	1,0	100,0
11	2,0	2,0	100,0
12	5,0	4,0	80,0
13	6,0	6,0	100,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 12 - Percentuais de morfologia de todas as amostras do estudo antes do congelamento, após descongelamento e recuperação com o uso do crioprotetor Spermfreeze SSP™

Amostra	Morfologia		
	Pré congelamento	Pós descongelamento - Spermfreeze SSP	Recuperação - Spermfreeze SSP
1	2,0	2,0	100,0
2	1,0	1,0	100,0
3	7,0	6,0	85,7
4	1,0	1,0	100,0
5	4,0	4,0	100,0
6	1,0	1,0	100,0
7	6,0	5,0	83,3
8	1,0	1,0	100,0
9	1,0	1,0	100,0
10	1,0	1,0	100,0
11	2,0	1,0	50,0
12	5,0	5,0	100,0
13	6,0	4,0	66,7

Fonte: Elaborada pelo autor.

A tabela 13 mostra a média e erro padrão da recuperação da morfologia com o uso de cada crioprotetor.

Tabela 13 - Média e erro padrão das taxas recuperação de morfologia com os crioprotetores utilizados

	Grupos/tratamentos		
	Spermfreeze™	Ingá Spermfreezing™	Spermfreeze SSP™
<b>Taxa de recuperação da Morfologia</b>	91,6±3,299	86,0±5,536	91.2±4,452

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a análise estatística, não foi observada diferença significativa na comparação da taxa de recuperação da morfologia espermática com os crioprotetores utilizados (P= 0,52).

### 5.3 ANÁLISES DE CUSTO-BENEFÍCIO

A tabela 14 mostra os resultados em relação ao custo benefício dos crioprotetores utilizados.

Tabela 14. Comparação do custo-benefício apresentado por cada crioprotetor

	Spermfreeze™	Ingá Spermfreezing™	Spermfreeze SSP™
<b>Valor por mL</b>	13 reais/mL	10,5 reais/mL	200 reais/mL
<b>Valor para congelar 1 mL de sêmen</b>	9,1 reais	10,5 reais	60 reais
<b>Temperatura de armazenamento</b>	2 e 8°C	-20°C	2 e 8°C
<b>Logística de entrega</b>	Pronta entrega	Até 7 dias corridos	Pronta entrega
<b>Validade</b>	18 meses	12 meses	18 meses
<b>Ausência e presença de componente animal</b>	Ausência	Presença	Ausência

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 5.4 DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO OPERACIONAL PADRÃO

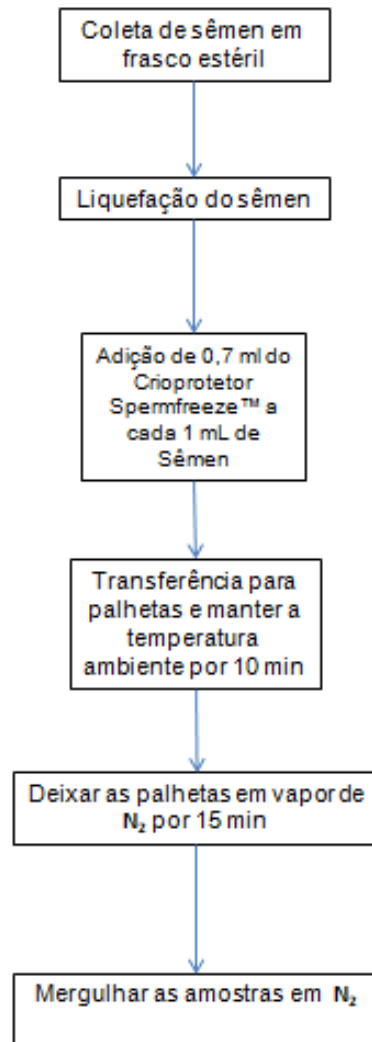
Baseado nestes resultados, foi definido como Protocolo Operacional Padrão para o Banco de Sêmen do Rio de Janeiro o crioprotetor Spermfreeze™ da marca Fertipro.

Nessa técnica, deve se adicionar 0,3 mL de crioprotetor a cada 1 mL de sêmen que será criopreservado. O crioprotetor deve ser adicionado de forma gotejante e lenta.

Após isso, o sêmen com crioprotetor deve ser imediatamente envasado em palhetas de criopreservação (que contém cerca de 0,5 ml de volume). As palhetas devem ser acomodadas em raqui plástica e ficar por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, a raqui, contendo as palhetas, devem ser colocadas em uma caixa de isopor a 2 centímetros de distância do nitrogênio líquido para que a amostra fique apenas em contato com o vapor de nitrogênio por mais 15 minutos.

Passado esse tempo, a raqui deve ser mergulhada em um tanque de nitrogênio líquido, completando, assim, o congelamento. A figura 9 mostra esse protocolo de forma esquematizada.

Figura 12 - Esquema do Protocolo Operacional padrão escolhido (Spermfreeze™)



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 6 DISCUSSÃO

Vários meios comerciais de congelamento de sêmen humano disponíveis no mercado já foram testados no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro (BSRJ). Porém, a direção do banco decidiu ser necessária a escolha de um protocolo principal. Nesta mesma linha, as diretoras do BSRJ optaram por seguir a tendência da ciência que visa cada vez mais reduzir o uso de componentes animais (LEWIS, 2019) e utilizar um meio que não tenha como ingrediente a gema do ovo de galinha. Até o presente estudo, o meio utilizado para congelamento seminal no BSRJ era o IngáSpermfreezing da Ingamed. Porém, com a chegada de novos meios no mercado sem o uso de gema de ovo (Spermfreeze e Spermfreeze SSP da Fertipro) houve o interesse de realizar a comparação de resultados com esses novos meio. Além disso, a distribuidora desses novos meios fica localizada na cidade do Rio de Janeiro, o que foi um dos motivos para escolha dos mesmos.

De acordo com a pesquisa realizado com os profissionais de reprodução assistida do Brasil, dos três crioprotetores mais utilizados, dois possuem gema de ovo em sua composição (Ingá SpermFreezing™ da Ingámed e TBY™ da Irvine) e um deles não possui (Spermfreeze™ da Fertipro). A gema de ovo se mostra como uma opção para proteger os espermatozoides contra os danos do congelamento desde 1940 (BENCHARIF; DORDAS-PERPINYA, 2020), antes mesmo da descrição do Glicerol como crioprotetor. Desde então nesses mais de 80 anos, esse componente tem se mostrado eficiente para criopreservação seminal (BENCHARIF; DORDAS-PERPINYA, 2020). Ser um produto utilizado há tanto tempo com resultados satisfatórios pode ser o principal motivo pelo qual esse componente ainda é utilizado atualmente. Isso é evidenciado na pesquisa realizada sobre o uso de crioprotetores no Brasil. Os dois crioprotetores mais utilizados possuem a gema de ovo como principal componente, porém, isso pode refletir um pensamento conservador em relação a técnica de congelamento seminal, pois é um componente utilizado há muito tempo.

Componentes de origem animal possuem um maior potencial de levar a contaminação (SICCHIERI et al., 2021). Além disso, a composição da gema de ovo vai depender da alimentação e saúde das galinhas utilizadas, o que torna muito



difícil a padronização entre os lotes (MUTALIK et al., 2014). Na tentativa de diminuir o uso do componente animal, estudos são realizados com o objetivo de encontrar substitutos. Um estudo realizado com espermatozoides de touro mostrou que o congelamento utilizando o complexo ciclodextrina-colesterol apresenta resultados similares aos encontrados com a gema de ovo (ANZAR; RAJAPAKSHA; BOSWALL, 2019). A lectina de soja também tem sido estudada com o objetivo de substituir a gema de ovo e apresenta resultados promissores. ANZAR et al. (2019) obteve resultados similares aos obtidos com gema de ovo usando esse componente no congelamento de espermatozoides de carneiro. A mesma conclusão foi obtida por outro estudo utilizando espermatozoides de cães (ANZAR et al., 2019). A albumina também se mostra um substituto com qualidade igual ou superior a gema de ovo (MAHADEVAN; TROUNSON, 1983), esse componente evita o choque osmótico, bem como a formação de cristais de gelo (SEIFI et al., 2020). Na pesquisa realizada com os profissionais da reprodução humana assistida no Brasil, foi observado que 12 dos profissionais utilizam meios sem a presença de gema de ovo em seus laboratórios, sendo um meio único ou intercalando com outro tipo de meio. Tendo em vista o rigoroso controle de qualidade presente em um laboratório em que são processados gametas humanos, esse resultado mostra a segurança do uso desses meios para o congelamento seminal.

Além do claro esforço no meio científico para diminuição do uso de componentes de origem animal, esse comportamento também pode ser observado na sociedade com o crescimento dos adeptos ao veganismo (MARRONE et al., 2021). Cada vez é mais comum o consumidor se preocupar com a presença de componentes ou uso de testes em animais em cosméticos, produtos de higiene, vestimenta e até medicamentos. A tendência global de redução do uso de animais em pesquisas e práticas industriais se estende à reprodução assistida, onde a ética e o bem-estar animal ganham destaque. Nesse contexto, emerge a importância do uso de crioprotetores de sêmen humano sem a presença de gema. Esses crioprotetores fornecem uma alternativa mais ética e confiável, alinhada com os valores contemporâneos de respeito aos animais. Além disso, optar por meios de congelamento de sêmen definidos, nos quais os componentes e concentrações são conhecidos, garante a consistência e qualidade dos resultados, permitindo avanços mais precisos e seguros na reprodução assistida. Essa mudança de paradigma não

apenas atende às demandas sociais por responsabilidade ética, mas também promove avanços científicos mais sólidos e confiáveis no campo da reprodução humana.

Porém, para garantir que essa substituição possa ser feita sem prejuízo aos pacientes do Banco de Sêmen do Rio de Janeiro, seria necessário verificar se os crioprotetores sem gema de ovo apresentariam resultados semelhantes ou superiores ao que possui esse componente animal. Já é conhecido que há uma perda de aproximadamente 50% da vitalidade dos espermatozoides após o descongelamento (WATSON, 2000; WORLD HEALTH ORGANIZATION., 2021). Sendo assim, o ideal é que se tente minimizar essa perda da melhor forma possível, o que inclui o uso de um crioprotetor com resultados confiáveis. Tendo em vista os crioprotetores disponíveis no mercado e a demanda do laboratório foi iniciado este projeto de comparação entre os três crioprotetores estudados. Dos crioprotetores estudados, um utiliza a gema de ovo como crioprotetor impermeável (Ingá Spermfreezing™) e os outros dois utilizam a albumina como crioprotetor impermeável (Spermfreezing™ e Spermfreezing SSP™)

A principal limitação desse estudo é o número amostral pequeno. Isso ocorre devido a diversos fatores. Um deles é a dificuldade de encontrar voluntários que aceitem participar de uma pesquisa que envolve congelamento de material genético, pois, muitos, mesmo após a explicação detalhada do trabalho, têm receio que seu material seja doado e não aceitam participar. Ainda deve se levar em conta que para muitos a coleta seminal é uma situação constrangedora, o que dificulta a abordagem para convite para participar no estudo. Além disso, muitas vezes os voluntários que aceitam participar não possuem uma qualidade seminal adequada para serem incluídos no estudo. Outro ponto é a adequação da rotina do laboratório a realização dos experimentos, já que o sêmen deve ser congelado em até uma hora após a coleta. Também deve se levar em consideração a disponibilidade de meios de congelamento no laboratório para realização dos experimentos.

Mesmo com essas dificuldades, através desse estudo pode-se observar que não foram encontradas diferenças significativas entre as taxas de recuperação da motilidade, vitalidade e morfologia espermática com o uso dos três diferentes

crioprotetores. Sendo assim, outras variáveis foram analisadas para a escolha do Protocolo Operacional Padrão (POP) de congelamento seminal do laboratório.

A principal variante entre os meios é a presença ou ausência de componente animal na composição do produto. Estudos indicam que a presença de gema de ovo pode interferir com proteínas presentes no sêmen (PINI et al., 2018; RAMIREZ-VASQUEZ, R. et al., 2019). Essas análises foram realizadas em espermatozoides de animais, entretanto já fornecem alguma evidência que a gema de ovo deveria, se possível, ser evitada na criopreservação seminal. Essas informações também abrem a discussão da necessidade da avaliação do perfil proteico do sêmen humano antes e após o congelamento com diferentes meios. O que permitiria um melhor entendimento de como o esse procedimento pode afetar os espermatozoides.

Um ponto que deve ser levado em consideração é a temperatura de armazenamento. Os crioprotetores que possuem gema de ovo necessitam ser armazenados em temperaturas inferiores a  $-20^{\circ}\text{C}$  (BENCHARIF; DORDAS-PERPINYA, 2020). Já os crioprotetores sem o uso de gema de ovo devem ser armazenados em temperaturas entre  $2$  e  $8^{\circ}\text{C}$  (MAHADEVAN; TROUNSON, 1983), que é a temperatura de armazenamento de todos os outros meios e reagentes utilizados no laboratório do Banco de Sêmen do Rio de Janeiro, que podem ser armazenados em geladeira. O uso de crioprotetores com gema de ovo demandam a presença e monitoramento de um freezer exclusivamente para seu armazenamento.

Também é importante destacar a logística de entrega dos meios apresentados. A empresa distribuidora do Spermfreeze™ e Spermfreeze SSP™ é localizada na cidade do Rio de Janeiro, permitindo entrega imediata, caso seja necessário. Esse fato é muito importante em caso de emergências de falta de produto em estoque devido a acidentes.

A validade do produto também deve ser analisada. O crioprotetor Ingá Spermfreezing™ possui validade de 12 meses após a data de fabricação, enquanto os meios Spermfreeze™ e Spermfreeze SSP™ possuem validade de 18 meses após a data de fabricação. Uma validade mais ampla permite a manutenção de um estoque maior sem desperdício, caso a mesma expire antes do uso.

Outro ponto importante para um laboratório é o custo envolvido no procedimento. Sendo assim, o preço de cada crioprotetor foi levado em consideração. Na última cotação realizada com as empresas distribuidoras dos meios foram obtidos os valores: Inga Spermfreezing™ (52,50 reais cada frasco), Spermfreezing™ (65 reais cada frasco) e Spermfreezing SSP™ (200 reais cada frasco). Além do preço, foi analisado o quanto de crioprotetor é necessário para congelar 1 mL de sêmen. Já que a concentração de crioprotetores é diferente em cada meio, a quantidade de crioprotetor utilizada também vai diferir. Para a criopreservação da mesma quantidade de sêmen (1 mL) é necessária a utilização de 1 mL do crioprotetor Inga Spermfreezing™, 0,7 mL do crioprotetor Spermfreeze™ e 0,3 mL do crioprotetor Spermfreeze SSP™. O valor para congelar 1 mL de sêmen com o crioprotetor Spermfreeze™ é de 9,1 reais, do crioprotetor Inga Spermfreezing™ é de 10,5 reais e do crioprotetor Spermfreeze SSP™ é de 60 reais.

Por fim, após a análise desses valores e tendo em vista que não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros seminais analisados, fica claro que o crioprotetor Spermfreeze SSP™ não apresenta vantagem em relação aos outros dois, já que apresenta um custo muito mais alto e resultados similares. Já o custo dos crioprotetores Spermfreeze™ e Inga Spermfreezing™ é similar.

Em resumo, a tendência em direção ao uso de meios sem gema de ovo na criopreservação de sêmen humano está em ascensão, embasada por preocupações com segurança, ética e evidências de resultados comparáveis. Com meios sem gema de ovo prontamente disponíveis no mercado e a confirmação de sua eficácia, é provável que essa mudança continue a ser adotada de forma mais ampla no campo da reprodução assistida.

## 7 CONCLUSÃO

Foi observado que os três crioprotetores mais utilizados pelos profissionais de Reprodução Humana Assistida são Ingá SpermFreezing™ da Ingámed, TBY™ da Irvine (que possuem gema de ovo em sua composição) e Spermfreeze™ da Fertipro (que não possui gema de ovo em sua composição) e que os principais motivos de escolha são: praticidade, preço e qualidade.

Após a comparação dos parâmetros motilidade, morfologia e vitalidade espermática antes e após o congelamento com o uso dos três crioprotetores, não foi encontrada diferença significativa entre os resultados.

Levando em consideração outros pontos analisados em relação aos meios crioprotetores, como temperatura de armazenamento, logística de entrega, validade, o custo-benefício e a ausência ou presença de componente animal, o meio de crioproteção Spermfreeze™ da marca Fertipro foi o protocolo selecionado para criopreservação seminal no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro.

## **8 PRODUTO FINAL**

O produto final desta dissertação foi a definição do Protocolo Operacional Padrão para congelamento seminal no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro.

O protocolo escolhido foi o do crioprotetor SpermFreeze™ .

O protocolo elaborado se encontra no Apêndice II e a ficha de elaboração do protocolo operacional padrão se encontra no Apêndice III desta dissertação.

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

As principais perspectivas futuras desse trabalho são: aumentar o número amostral e analisar de forma mais profunda as alterações causadas aos espermatozoides pelo congelamento.

A reprodutibilidade dos resultados é uma das características fundamentais da ciência. Desta forma, pretendemos realizar novas comparações entre os meios, principalmente o Spermfreeze e o IngáSpermfreezing, que apresentam custos próximos, para observar se os resultados serão semelhantes ao do presente estudo.

Devido à rotina do laboratório, disponibilidade de meio de criopreservação e dificuldade de aceite dos pacientes a participar da pesquisa, o número amostral do estudo foi pequeno. Porém, a intenção é ampliar esse estudo para uma melhor avaliação estatística.

Além disso, a partir da análise da literatura, foi observada uma falta de estudos que analisam as alterações no perfil proteico do sêmen de humanos após o congelamento. Sendo assim, também é uma intenção realizar uma avaliação mais detalhada do que pode ser alterado pelo congelamento seminal.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZIZ SWELUM, A. et al. Efficiency of Commercial Egg Yolk-Free and Egg Yolk-Supplemented Tris-Based Extenders for Dromedary Camel Semen Cryopreservation. **Animals (Basel)**, v. 9, n. 11, Nov 19 2019.

ABRAM MCBRIDE, J.; LIPSHULTZ, L. I. Male Fertility Preservation. **Curr Urol Rep**, v. 19, n. 7, p. 49, May 17 2018.

AGCA, Y.; CRITSER, J. K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. **Semin Reprod Med**, v. 20, n. 1, p. 15-23, Feb 2002.

AIRES, M. D. M. **Fisiologia**. 4. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ALI, J.; ALHARBI, N. H.; ALI, N. Chapter 1 Historical Background on Gamete and Embryo Cryopreservation. **Methods Mol Biol**, v. 1568, p. 3-20, 2017.

ALMODIN, C. G.; COSTA, R. R. **Criopreservação em Reprodução**. Maringá: DentalPress, 2014.

ALVES, M. G. et al. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 5, p. 777-93, Mar 2013.

ANDERSON, R. A. et al. Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 3, n. 7, p. 556-67, Jul 2015.

ANVISA. **Resolução RDC 23, de 27 de maio de 2011**: Diário Oficial da União 2011.

ANZAR, M.; RAJAPAKSHA, K.; BOSWALL, L. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. **PLoS One**, v. 14, n. 10, p. e0223977, 2019.

ARRUDA DE OLIVEIRA, R. et al. Cooling of equine semen at 16°C for 36h with the addition of cysteine in different concentrations. **Pferdeheilkunde Equine Medicine**, v. 31, n. 1, p. 27-32, 2015.

AUGER, J.; SERMONDADE, N.; EUSTACHE, F. Semen quality of 4480 young cancer and systemic disease patients: baseline data and clinical considerations. **Basic Clin Androl**, v. 26, p. 3, 2016.



BAK, C. W. et al. Natural course of idiopathic oligozoospermia: comparison of mild, moderate and severe forms. **Int J Urol**, v. 17, n. 11, p. 937-43, Nov 2010.

BARAK, S. Fertility preservation in male patients with cancer. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 55, p. 59-66, Feb 2019.

BENCHARIF, D.; DORDAS-PERPINYA, M. Canine semen cryoconservation: Emerging data over the last 20 years. **Reprod Domest Anim**, v. 55 Suppl 2, p. 61-65, Jul 2020.

BUJAN, L. et al. Good efficiency of intrauterine insemination programme for serodiscordant couples with HIV-1 infected male partner: a retrospective comparative study. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 135, n. 1, p. 76-82, Nov 2007.

BUNGE, R. G.; SHERMAN, J. K. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. **Nature**, v. 172, n. 4382, p. 767-8, Oct 24 1953.

CANNARELLA, R. et al. Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 5, Mar 3 2020.

DE ROO, C. et al. Fertility options in transgender people. **Int Rev Psychiatry**, v. 28, n. 1, p. 112-9, 2016.

DEARING, C. et al. Trends and usage in a London National Health Service Sperm Bank for cancer patients. **Hum Fertil (Camb)**, v. 17, n. 4, p. 289-96, Dec 2014.

DEARING, C. G.; JAYASENA, C. N.; LINDSAY, K. S. Human sperm cryopreservation in cancer patients: Links with deprivation and mortality. **Cryobiology**, v. 79, p. 9-13, Dec 2017.

DOHLE, G. R. Male infertility in cancer patients: Review of the literature. **Int J Urol**, v. 17, n. 4, p. 327-31, Apr 2010.

EISENBERG, M. L. et al. Male infertility. **Nat Rev Dis Primers**, v. 9, n. 1, p. 49, Sep 14 2023.

FAINBERG, J.; KASHANIAN, J. A. Vasectomy. **JAMA**, v. 319, n. 23, p. 2450, Jun 19 2018.

FERRARI, S. et al. Sperm cryopreservation and reproductive outcome in male cancer patients: a systematic review. **Reprod Biomed Online**, v. 33, n. 1, p. 29-38, Jul 2016.

GRISWOLD, M. D. 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. **Biol Reprod**, v. 99, n. 1, p. 87-100, Jul 1 2018.

GUNES, S. et al. Effects of aging on the male reproductive system. **J Assist Reprod Genet**, v. 33, n. 4, p. 441-54, Apr 2016.

HEZAVEHEI, M. et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reprod Biomed Online**, v. 37, n. 3, p. 327-339, Sep 2018.

HUANG, C. et al. Long-term cryostorage of semen in a human sperm bank does not affect clinical outcomes. **Fertil Steril**, v. 112, n. 4, p. 663-669 e1, Oct 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação.  
<https://www.ibge.gov.br/apps//populacao/projecao/>, 2021. Acesso em: 28/11/2021.

ILIADOU, P. K. et al. The Sertoli cell: Novel clinical potentiality. **Hormones (Athens)**, v. 14, n. 4, p. 504-14, Oct-Dec 2015.

JUNQUEIRA, L. C. C., J. **Histologia Básica**. 12. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 556

LE, M. T. et al. Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing: Effects on motility, viability, morphology and cellular defects. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 234, p. 14-20, Mar 2019.

LEWIS, D. I. Animal experimentation: implementation and application of the 3Rs. **Emerg Top Life Sci**, v. 3, n. 6, p. 675-679, Nov 27 2019.

LINDSAY, T. J.; VITRIKAS, K. R. Evaluation and treatment of infertility. **Am Fam Physician**, v. 91, n. 5, p. 308-14, Mar 1 2015.

MAHADEVAN, M.; TROUNSON, A. O. Effect of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa. **Andrologia**, v. 15, n. 4, p. 355-66, Jul-Aug 1983.

MARRONE, G. et al. Vegan Diet Health Benefits in Metabolic Syndrome. **Nutrients**, v. 13, n. 3, Mar 2 2021.

MATUMO, P. et al. [Abnormal semen analyses in men undergoing premarital screening and in infertile couples in Butembo-Democratic Republic of Congo]. **Pan Afr Med J**, v. 37, p. 155, 2020.

MENKVELD, R. et al. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. **Hum Reprod**, v. 5, n. 5, p. 586-92, Jul 1990.

MOORE, K. L. **Embriologia clínica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

MUTALIK, S. et al. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. **Syst Biol Reprod Med**, v. 60, n. 3, p. 183-8, Jun 2014.

NIJS, M.; OMBELET, W. Cryopreservation of human sperm. **Hum Fertil (Camb)**, v. 4, n. 3, p. 158-63, 2001.

O'HARA, L. et al. Autocrine androgen action is essential for Leydig cell maturation and function, and protects against late-onset Leydig cell apoptosis in both mice and men. **FASEB J**, v. 29, n. 3, p. 894-910, Mar 2015.

PINI, T. et al. Cryopreservation and egg yolk medium alter the proteome of ram spermatozoa. **J Proteomics**, v. 181, p. 73-82, Jun 15 2018.

POIROT, C. et al. [Fertility and cancer]. **Presse Med**, v. 42, n. 11, p. 1513-20, Nov 2013.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, n. 4172, p. 666, Oct 15 1949.

PRISANT, N. et al. HIV-1 or hepatitis C chronic infection in serodiscordant infertile couples has no impact on infertility treatment outcome. **Fertil Steril**, v. 93, n. 3, p. 1020-3, Feb 2010.

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

RAJAN, R.; MATSUMURA, K. Development and Application of Cryoprotectants. **Adv Exp Med Biol**, v. 1081, p. 339-354, 2018.

RAMIREZ-VASQUEZ, R. et al. Extenders modify the seminal plasma ability to minimize freeze-thaw damage on ram sperm. **Reprod Domest Anim**, v. 54, n. 12, p. 1621-1629, Dec 2019.

RAMIREZ-VASQUEZ, R. R. A. et al. Cryopreservation and egg yolk extender components modify the interaction between seminal plasma proteins and the sperm surface. **Theriogenology**, v. 140, p. 153-163, Dec 2019.

REY, R. A. et al. Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. **Microsc Res Tech**, v. 72, n. 11, p. 787-95, Nov 2009.

ROTH, M. Y.; PAGE, S. T.; BREMNER, W. J. Male hormonal contraception: looking back and moving forward. **Andrology**, v. 4, n. 1, p. 4-12, Jan 2016.

ROYERE, D. et al. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. **Hum Reprod Update**, v. 2, n. 6, p. 553-9, Nov-Dec 1996.

SANTULLI, P. et al. HIV-positive patients undertaking ART have longer infertility histories than age-matched control subjects. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 2, p. 507-512, 2011.

SEIFI, S. et al. Inclusion of ovine enriched serum with vitamin E and polyunsaturated fatty acids in the freezing medium: a new strategy to improve human frozen-thawed sperm parameters. **Andrologia**, v. 52, n. 4, p. e13541, May 2020.

SHARMA, R. et al. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. **Syst Biol Reprod Med**, v. 61, n. 1, p. 1-12, Jan 2015.

SHERMAN, J. K. Improved Methods of Preservation of Human Spermatozoa by Freezing and Freeze-Drying. **Fertility and Sterility**, v. 14, n. 1, p. 49-64, 1963.

SICCHIERI, F. et al. Phosphatidylcholine and L-acetyl-carnitine-based freezing medium can replace egg yolk and preserves human sperm function. **Transl Androl Urol**, v. 10, n. 1, p. 397-407, Jan 2021.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Anim Reprod Sci**, v. 169, p. 2-5, Jun 2016.

SMITH, L. B.; WALKER, W. H. The regulation of spermatogenesis by androgens. **Semin Cell Dev Biol**, v. 30, p. 2-13, Jun 2014.

SONG, S. H. et al. Natural course of severe oligozoospermia in infertile male: influence on future fertility potential. **J Androl**, v. 31, n. 6, p. 536-9, Nov-Dec 2010.

SPALLANZANI, L. Osservazioni e speienze interno ai vermicelli spermatici dell' uomo e degli animali. In: Opusculi di Fisica Animale e Vegetabile. **Opusculo II**, 1776.

SZTEIN, J. M.; TAKEO, T.; NAKAGATA, N. History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 82, p. 57-63, Jun 2018.

T'SJOEN, G.; VAN CAENEGEM, E.; WIERCKX, K. Transgenderism and reproduction. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 20, n. 6, p. 575-9, Dec 2013.

THIJSSSEN, A. et al. Influence of temperature and sperm preparation on the quality of spermatozoa. **Reprod Biomed Online**, v. 28, n. 4, p. 436-42, Apr 2014.

TIWARI, A. et al. A new media without animal component for sperm cryopreservation: motility and various attributes affecting paternal contribution of sperm. **J Assist Reprod Genet**, v. 34, n. 5, p. 647-657, May 2017.

TOSHIMORI, K. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. **Microsc Res Tech**, v. 61, n. 1, p. 1-6, May 1 2003.

VAKALOPOULOS, I. et al. Impact of cancer and cancer treatment on male fertility. **Hormones (Athens)**, v. 14, n. 4, p. 579-89, Oct-Dec 2015.

VANDER BORGHT, M.; WYNS, C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. **Clinical Biochemistry**, v. 62, p. 2-10, 2018.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim Reprod Sci**, v. 60-61, p. 481-92, Jul 2 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 5th. Geneva: World Health Organization, 2010. xiv, 271 p.

\_\_\_\_\_. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 6th. Geneva: World Health Organization, 2021. xiv, 271 p.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F. et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. **Hum Reprod**, v. 24, n. 11, p. 2683-7, Nov 2009.

## APÊNDICE I – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Definição de um protocolo de criopreservação seminal para o Banco de Sêmen do Rio de Janeiro”

Pesquisadores: Paula Fontoura Coelho de Souza e Marcel Frajblat

Mestrando: Lincoln Bastos Farias Junior

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Banco de Sêmen do Rio de Janeiro. Av. Presidente Vargas, 590, sala 2109, Centro. Rio de Janeiro, RJ.

Programa de Pós Graduação do Pesquisador: Mestrado Profissional em Formação para Pesquisa Biomédica - UFRJ

Telefone para contato: (21) 972150250

E-mail: contato@bsrj.com.br

### INFORMAÇÕES SOBRE O PROJETO

O senhor está sendo convidado a participar da pesquisa “Definição de um protocolo de criopreservação seminal para o Banco de Sêmen do Rio de Janeiro” conduzida pelos pesquisadores: Paula Fontoura Coelho de Souza, Marcel Frajblat e Lincoln Bastos Farias Junior. Antes de decidir se participará, é importante que o senhor entenda porque o estudo está sendo feito e o que ele envolverá. Reserve um tempo para ler cuidadosamente as informações a seguir e faça perguntas se algo não estiver claro ou se quiser mais informações. Não tenha pressa de decidir se deseja ou não participar desta pesquisa.

O congelamento seminal tem permitido a preservação da fertilidade de pacientes que passam por tratamentos citotóxicos como quimioterapia ou cirurgias que afetem o potencial reprodutivo de alguma forma (como a vasectomia e a orquiectomia), além disso, permite o armazenamento de amostras de pacientes que tenham a intenção de realizar procedimentos de reprodução assistida. Porém, sem um agente protetor, o congelamento pode levar a choque térmico ou formação de cristais de gelo, inviabilizando a célula. A primeira substância encontrada com a capacidade de oferecer essa proteção foi o glicerol, que é uma substância utilizada até hoje. Todavia, com o avanço da ciência, outras substâncias têm sido utilizadas, criando uma grande variedade de crioprotetores no mercado. Sendo assim, estudos comparativos são importantes para a que a técnica de congelamento seja cada vez melhor. O objetivo do trabalho é comparar os crioprotetores *Spermfreeze*<sup>TM</sup> e *Spermfreeze SSP*<sup>TM</sup>, ambos da marca Fertipro® e o crioprotetor IngáSpermfreezing<sup>TM</sup> da marca Ingamed®, revelando as vantagens e desvantagens de cada técnica. Verificar se houve diferença nas taxas de motilidade, vitalidade e morfologia espermáticas após o descongelamento. Para isso será utilizado 3,0 mL de sêmen que será armazenado por um mês e descartado após o término da análise. Além do uso dos dados obtidos através de um questionário, sendo mantido sigilo absoluto das informações do participante.

Riscos: O único risco que apresentamos é de que o participante se sinta desconfortável durante a abordagem do uso das leituras para pesquisa e o tempo despendido na leitura deste documento. Nos casos de desconforto ou constrangimento por parte do participante, os profissionais envolvidos na pesquisa

oferecerão a assistência relacionada ao fornecimento de mais informações detalhadas, mostrar-se totalmente disponíveis não somente no recrutamento inicial do participante para a pesquisa, mas ao longo de todo o período necessário ao participante; conversar sobre a importância do estudo e, o mais importante, deixá-lo à vontade para não participar do estudo.

**Benefícios:** Este estudo pode beneficiar os pacientes que buscam a preservação da fertilidade masculina, trazendo melhora durante a execução de técnicas do congelamento seminal. Como consequência, estes benefícios contribuem também para a melhora na conduta dos profissionais especializados.

**Critérios de inclusão:** Participarão do estudo todos os participantes provenientes do Laboratório do Banco de Sêmen do Rio de Janeiro, que estejam realizando espermograma, e que estejam interessados em participar.

**Crítérios de exclusão:** Serão excluídos do estudo os participantes com diagnóstico de azoospermia ou oligospermia acentuada.

Rúbrica:



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Definição de um protocolo de criopreservação seminal para o Banco de Sêmen do Rio de Janeiro”

Pesquisadores: Paula Fontoura Coelho de Souza e Marcel Frajblat

Mestrando: Lincoln Bastos Farias Junior

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Banco de Sêmen do Rio de Janeiro. Av. Presidente Vargas, 590, sala 2109, Centro. Rio de Janeiro, RJ.

Programa de Pós Graduação do Pesquisador: Mestrado Profissional em Formação para Pesquisa Biomédica - UFRJ

Telefone para contato: (21) 972150250

E-mail: contato@bsrj.com.br

Eu, \_\_\_\_\_, fui devidamente informado e esclarecido sobre o projeto de pesquisa acima do qual me disponho fazer parte, como voluntário.

Estou ciente de que não terei direito a nenhuma remuneração, já que minha participação no projeto é voluntária e sem interesse financeiro.

Estou ciente da confidencialidade das informações geradas e de que a pesquisa trabalha com o anonimato. Também estou ciente de que esta pesquisa poderá ser publicada, em formato de artigo científico ou de apresentações científicas, assegurando-se a confidencialidade dos indivíduos nela envolvidos.

Aceito que as avaliações da taxa de motilidade, vitalidade e morfologia, pré e pós-congelamento, da minha amostra sejam submetidas a avaliação estatística.

A qualquer momento, terei o direito de conhecer os resultados da pesquisa, assim como, terei o direito de me retirar do projeto em qualquer fase da pesquisa, se assim o desejar.

Este documento é redigido em 2 vias, para o participante e para o pesquisador.  
Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do Participante)

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do Pesquisador)

## APÊNDICE II – Protocolo Operacional Padrão para o congelamento seminal no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro



### **Protocolo Operacional Padrão para Congelamento Seminal no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro**

#### **Introdução**

O congelamento seminal é um procedimento realizado para preservação da fertilidade em casos de pacientes que passarão alguma intervenção que possa afetar sua fertilidade ou em casos de doação de sêmen. As amostras passam por um processamento de adição de crioprotetores que preservam por tempo indeterminado a estrutura e função celulares durante o congelamento e descongelamento.

#### **Coleta**

A coleta seminal deve ser feita por meio da masturbação, respeitando o período de abstinência de 2 a 5 dias. As amostras devem ser coletadas em frascos estéreis e permanecer a 37°C por 30 minutos até liquefação.

#### **Congelamento Seminal com o meio Spermfreeze**

Após a liquefação, deve ser adicionado 0,7 mL de crioprotetor a cada 1 mL de sêmen. O crioprotetor deve ser adicionado de forma gotejante e lenta.


Após isso, o sêmen com crioprotetor deve ser dividido em palhetas de congelamento seminal. Cada palheta tem a capacidade de volume de 0,5 mL.

As palhetas devem ser acomodadas em raquis plásticas achatadas. As mesmas devem ficar por 10 minutos à temperatura ambiente.

Após esse tempo, a raqui, contendo as palhetas, devem ser colocadas em vapor de nitrogênio líquido por mais 15 minutos.

Após o período de 15 minutos no vapor de nitrogênio líquido, a raqui deve ser mergulhada em um tanque de nitrogênio líquido, completando assim, o congelamento seminal.


## APÊNDICE III – Ficha de elaboração de Protocolo Operacional Padrão

		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
<b>Nome do Processo:</b>			
<i>Protocolo de criopreservação seminal para o Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
<b>Objetivo Estratégico:</b>			
<i>Descrever o Protocolo Operacional Padrão (POP) para congelamento de sêmen no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
<b>Campo de aplicação:</b>			
<i>Criopreservação seminal</i>			
<b>Unidade responsável:</b>		<b>Versão:</b>	<b>Número de páginas:</b>
<i>Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>		<i>1</i>	<i>1/8</i>

### Sumário

I. Palavras-chave.....	2
II. Dicionário de termos e siglas.....	2
III. Resultados finais do processo.....	3
IV. Documentos de referência.....	3
V. Parâmetros para medição do desempenho do processo.....	4
VI. Procedimentos.....	5
VII. Condições de biossegurança.....	6
IX. Controle das alterações.....	8
X. Controle de aprovações para uso.....	8

<b>Elaborado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>	<b>Data aprovação:</b>
<i>Lincoln Bastos Farias Junior</i>	<i>Marcel Frajblat</i>	<i>10/12/2022</i>

		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:			
<i>Protocolo de criopreservação seminal para o Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
Objetivo Estratégico:			
<i>Descrever o Protocolo Operacional Padrão (POP) para congelamento de sêmen no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
Campo de aplicação:			
<i>Criopreservação seminal</i>			
Unidade responsável:		Versão:	Número de páginas:
<i>Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>		<i>1</i>	<i>2/8</i>


### I. Palavras-chave

Espermatozoide, congelamento seminal, fertilidade masculina

### II. Dicionário de termos e siglas

Termo/Sigla	Significado
Aal:	Espermatogônia <i>a-aligned</i>
ABP:	do inglês <i>androgen binding protein</i>
Anvisa:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ap:	Espermatogônia <i>a-paired</i>
BSRJ:	Banco de Sêmen do Rio de Janeiro
CNS:	Conselho Nacional de Saúde
FSH:	do inglês <i>follicle stimulating hormone</i>
GDNF:	do inglês, <i>Glial Cell Line-derived Factor</i>
GnRh:	do inglês <i>Gonadotropin hormone-releasing hormone</i>
HIV	do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>
IBGE:	Instituto Brasileiro de geografia e estatística
LH:	do inglês <i>Luteinizing hormone</i>
OMS:	Organização Mundial da Saúde
POP:	Protocolo operacional padrão
TCLE:	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFRJ:	Universidade Federal Do Rio de Janeiro

Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
<i>Lincoln Bastos Farias Junior</i>	<i>Marcel Frajblat</i>	<i>10/12/2022</i>

		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:			
<i>Protocolo de criopreservação seminal para o Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
Objetivo Estratégico:			
<i>Descrever o Protocolo Operacional Padrão (POP) para congelamento de sêmen no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
Campo de aplicação:			
<i>Criopreservação seminal</i>			
Unidade responsável:	Versão:	Número de páginas:	
<i>Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>	<i>1</i>	<i>3/8</i>	


### III. Resultados finais do processo

O resultado esperado seria definir, a partir da análise do custo benefício e da análise da motilidade, vitalidade e morfologia dos espermatozoides antes do congelamento e após o descongelamento, o protocolo que apresente mais vantagens nos parâmetros descritos. O resultado final foi definido a partir da análise laboratorial em comparação ao custo-benefício dos protocolos apresentado. E o protocolo operacional padrão de escolha para o Banco de Sêmen do Rio de Janeiro foi o Spermfreeze™ da Fertipro.

### IV. Documentos de referência

Referência	Descrição
Spermfreeze. [bula]. Bélgica: Fertipro. Disponível em: <a href="https://fertipro.com/inserts/SpermFreeze_2021.pdf">https://fertipro.com/inserts/SpermFreeze_2021.pdf</a> - Acesso em: 22/03/2023	Protocolo de congelamento seminal do meio Spermfreeze™ - Fertipro
Summary of Safety and Clinical Performance. Bélgica: Fertipro. Disponível em: <a href="https://fertipro.com/inserts/SpermFreeze_SSP_2021.pdf">https://fertipro.com/inserts/SpermFreeze_SSP_2021.pdf</a> - Acesso em: 22/03/2023	Resumo de Segurança e performance clínica do meio Spermfreeze™ - Fertipro

Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
<i>Lincoln Bastos Farias Junior</i>	<i>Marcel Frajblat</i>	<i>10/12/2022</i>

		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
<b>Nome do Processo:</b>			
<i>Protocolo de criopreservação seminal para o Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
<b>Objetivo Estratégico:</b>			
<i>Descrever o Protocolo Operacional Padrão (POP) para congelamento de sêmen no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
<b>Campo de aplicação:</b>			
<i>Criopreservação seminal</i>			
<b>Unidade responsável:</b>		<b>Versão:</b>	<b>Número de páginas:</b>
<i>Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>		<i>1</i>	<i>4/8</i>


Referência	Descrição
SpermFreeze Safety Data Sheet. Bélgica: Fertipro. Disponível em: <a href="https://fertipro.com/inserts/SpermFreeze_SSP_2021.pdf">https://fertipro.com/inserts/SpermFreeze_SSP_2021.pdf</a> - Acesso em: 22/03/2023	Documento detalhado com as substâncias presentes no meio Spermfreeze™ - Fertipro. Informando: suas propriedades físico-química, estabilidade e reatividade, informações toxicológicas, informações ecológicas e medidas de segurança.
WORLD HEALTH ORGANIZATION. <b>WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen</b> . 6th. Geneva: World Health Organization, 2021. xiv, 271 p.	Manual de análise e processamento seminal elaborado pela Organização Mundial da Saúde.

#### V. Parâmetros para medição do desempenho do processo

Após a liquefação da amostra de sêmen e antes do congelamento foi realizada análise dos parâmetros motilidade, vitalidade e morfologia espermáticas.

Após o descongelamento, foi repetida a análise dos parâmetros de motilidade, vitalidade e morfologia espermáticas, com o intuito de comparar com os resultados obtidos antes do congelamento seminal e depois do descongelamento seminal.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>	<b>Data aprovação:</b>
<i>Lincoln Bastos Farias Junior</i>	<i>Marcel Frajblat</i>	<i>10/12/2022</i>

		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
<b>Nome do Processo:</b>			
<i>Protocolo de criopreservação seminal para o Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
<b>Objetivo Estratégico:</b>			
<i>Descrever o Protocolo Operacional Padrão (POP) para congelamento de sêmen no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
<b>Campo de aplicação:</b>			
<i>Criopreservação seminal</i>			
<b>Unidade responsável:</b>		<b>Versão:</b>	<b>Número de páginas:</b>
<i>Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>		<i>1</i>	<i>5/8</i>

## VI. Procedimentos

### Spermfreeze™ - Fertipro:

O sêmen é coletado em frasco estéril e fica a temperatura ambiente por 30 minutos até sua liquefação.

Após a liquefação, é adicionado 0,7 mL de crioprotetor a cada 1 mL de sêmen. O crioprotetor é adicionado de forma gotejante e lenta.


Após isso, o sêmen com crioprotetor é dividido em palhetas de congelamento seminal. Cada palheta tem a capacidade de volume de 0,5 mL.

As palhetas são acomodadas em raquis plásticas achatadas. As mesmas ficam por 10 minutos à temperatura ambiente.

Após esse tempo, a raqui, contendo as palhetas, são colocadas em vapor de nitrogênio líquido por mais 15 minutos.

Após o período de 15 minutos no vapor de nitrogênio líquido, a raqui é mergulhada em um tanque de nitrogênio líquido, completando assim, o congelamento seminal.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>	<b>Data aprovação:</b>
<i>Lincoln Bastos Farias Junior</i>	<i>Marcel Frajblat</i>	<i>10/12/2022</i>

		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
<b>Nome do Processo:</b>			
<i>Protocolo de criopreservação seminal para o Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
<b>Objetivo Estratégico:</b>			
<i>Descrever o Protocolo Operacional Padrão (POP) para congelamento de sêmen no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
<b>Campo de aplicação:</b>			
<i>Criopreservação seminal</i>			
<b>Unidade responsável:</b>		<b>Versão:</b>	<b>Número de páginas:</b>
<i>Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>		<i>1</i>	<i>6/8</i>

## VII. Condições de biossegurança

Toda amostra de sêmen deve ser considerada potencialmente infectante. Por isso, laboratórios em que existe a manipulação desse fluido corporal tem o nível de biossegurança 2 (NB-2).


Sendo assim, todos os procedimentos, que envolvem o ejaculado, são realizados utilizando jaleco e luvas descartáveis, em cabine de segurança biológica classe II.

Todo material que entra em contato com o sêmen deve ser considera resíduo do tipo A (potencialmente infeccioso). Os resíduos secos (pipeta Pasteur, ponteiros, luvas, entre outros materias) devem ser descartados em saco branco leitoso com o símbolo de infectante e são recolhidos por uma empresa especializada no descarte desse material. O resto de sêmen que sobra após o exame é depositado em um recipiente de descarte. O conteúdo desse recipiente é descartado no expurgo de onde vai para o sistema de esgoto.

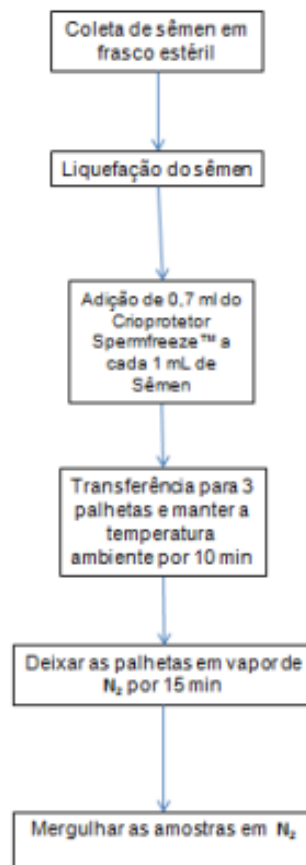
Os resíduos do grupo E (resíduos perfurocortantes), (como as lâminas de morfologia.) são acondicionadas em recipiente rígido do tipo Descarpack, respeitando o volume máximo (2/3 do volume). Esse recipiente é recolhido por empresa especializada em descarte.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>	<b>Data aprovação:</b>
<i>Lincoln Bastos Farias Junior</i>	<i>Marcel Frajblat</i>	<i>10/12/2022</i>




		<b>Universidade Federal do Rio de Janeiro</b> <b>Procedimento Operacional Padrão (POP)</b>	
<b>Nome do Processo:</b>			
<i>Protocolo de criopreservação seminal para o Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
<b>Objetivo Estratégico:</b>			
<i>Descrever o Protocolo Operacional Padrão (POP) para congelamento de sêmen no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
<b>Campo de aplicação:</b>			
<i>Criopreservação seminal</i>			
<b>Unidade responsável:</b>		<b>Versão:</b>	<b>Número de páginas:</b>
<i>Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>		<i>1</i>	<i>7/8</i>

### VIII. Fluxograma



<b>Elaborado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>	<b>Data aprovação:</b>
<i>Lincoln Bastos Farias Junior</i>	<i>Marcel Frajblat</i>	<i>10/12/2022</i>

		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:			
<i>Protocolo de criopreservação seminal para o Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
Objetivo Estratégico:			
<i>Descrever o Protocolo Operacional Padrão (POP) para congelamento de sêmen no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>			
Campo de aplicação:			
<i>Criopreservação seminal</i>			
Unidade responsável:		Versão:	Número de páginas:
<i>Banco de Sêmen do Rio de Janeiro</i>		<i>1</i>	<i>8/8</i>

#### IX. Controle das alterações

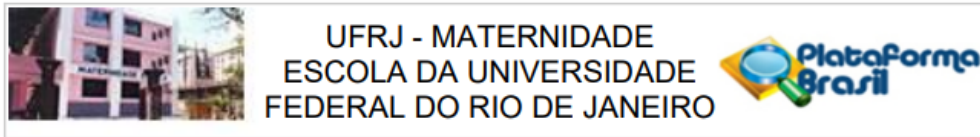
Nº da versão	Data	Tipo de alteração	Itens revisados	Responsável pela revisão
1	10/12/2022	Elaboração	Todos os itens	Lincoln Bastos Farias Junior

#### X. Controle de aprovações para uso

Data da aprovação	Nome do responsável pela aprovação	Unidade/subunidade aprovadora:
10/12/2022	Marcel Frajblat	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
<i>Lincoln Bastos Farias Junior</i>	<i>Marcel Frajblat</i>	<i>10/12/2022</i>

## ANEXO I – Aprovação do comitê de ética em pesquisa



Continuação do Parecer: 4.223.580

- elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- apresentar no relatório final que o projeto foi desenvolvido conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção
- apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;
- encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1516230.pdf	24/07/2020 10:21:41		Aceito
Outros	respostaapendenciascong.pdf	24/07/2020 10:20:48	Paula Fontoura Coelho de Souza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetocong.pdf	24/07/2020 10:20:04	Paula Fontoura Coelho de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcong.pdf	24/07/2020 10:19:31	Paula Fontoura Coelho de Souza	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoMarcel.pdf	18/05/2020 16:12:27	Paula Fontoura Coelho de Souza	Aceito
Declaração de concordância	cartaanuencia.pdf	24/02/2020 13:19:34	Paula Fontoura Coelho de Souza	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	demonstrativoinfraestrut.jpg	24/02/2020 13:14:52	Paula Fontoura Coelho de Souza	Aceito
Orçamento	orcamento.jpg	24/02/2020 12:58:55	Paula Fontoura Coelho de Souza	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

**Endereço:** Rua das Laranjeiras, 180  
**Bairro:** Laranjeiras **CEP:** 22.240-003  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2556-9747 **Fax:** (21)2205-9064 **E-mail:** cep@me.ufrj.br

## ANEXO II – Questionário para coleta do Banco de Sêmen do Rio de Janeiro

### QUESTIONÁRIO PARA COLETA DO SÊMEN



Nome: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Médico solicitante: \_\_\_\_\_ Data do exame: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

CPF: \_\_\_\_\_

Cadastro conferido? ( )

#### Recomendação de abstinência ejaculatória

**Espermograma:**  
Mínimo 2 dias e máximo de 7 dias (recomendação da OMS).

**Teste de Fragmentação do DNA espermático:**  
Mínimo 2 dias, máximo 3 dias.

#### Informações pessoais:

Tempo de abstinência ejaculatória \_\_\_\_\_ dias

Paciente relata peso \_\_\_\_\_ kg e altura \_\_\_\_\_ m

Ocupação profissional \_\_\_\_\_

Possui filhos biológicos? \_\_\_\_ Idades dos filhos \_\_\_\_\_ São de relacionamento atual ou anterior? \_\_\_\_\_

Consome bebida alcoólica? ( ) diariamente ( ) socialmente, fins de semana ( ) raramente ( ) nunca

( ) não ( ) sim - É fumante? Quantos cigarros por dia? \_\_\_\_ ( ) Já foi fumante: parou há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Faz uso de drogas entorpecentes? ( ) não ( ) sim. Qual? Frequência por semana? \_\_\_\_\_

→ Essa informação acima (sobre drogas entorpecentes) pode ir para o laudo médico? ( ) não ( ) sim.

( ) não ( ) sim - Pratica exercícios físicos regularmente? Qual? \_\_\_\_\_ Frequência semanal \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim - Está em uso de alguma medicação? Qual? \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim - Faz uso de Finasterida? Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ Se já usou, parou há quanto tempo? \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim - Faz uso de vitaminas ou suplemento alimentar? Quais? \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim - Já fez uso de anabolizantes/tratamento hormonal? Quais? \_\_\_\_\_ Por quanto tempo? \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim - Já realizou espermograma anteriormente? Quando? \_\_\_\_\_ Onde? \_\_\_\_\_

#### Histórico de doenças:

( ) não ( ) sim - Teve febre nos últimos dias? \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim - Apresenta secreção purulenta ou lesão peniana? \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim - Apresenta dor ou ardência ao urinar? \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim - É diabético? Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim - Tem pressão alta ou outra doença cardiovascular? Qual e há quanto tempo? \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim - Já fez tratamento para câncer? Quando? \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim - Já teve caxumba? ( ) na infância ( ) na idade adulta \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim - Já teve alguma infecção tratada por urologista? Qual? Quando? \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim - Tem diagnóstico de varicocele? \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim - Fez ultrassom de testículo? \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim - Já apresentou torção testicular ou dor muito forte? \_\_\_\_\_

Outras doenças (síndromes, doenças genéticas, cromossômicas, hormonais, etc) \_\_\_\_\_

#### Cirurgias anteriores:

Possui alguma cirurgia urológica e/ou genital (por exemplo: varicocelectomia, criptorquidia, hérnia inguinal, vasectomia, orquidectomia, prostatectomia e etc)? Quais e quando (ano aproximado)? \_\_\_\_\_

#### Estou ciente de que:

- Estas informações estarão contidas no laudo da análise seminal realizada na data deste exame.
  - Caso tenha alguma informação fornecida que o paciente não queira que conste no laudo, avisar ao profissional do laboratório.
  - Este laudo poderá ser enviado para o e-mail do meu médico.
  - O Banco de Sêmen do Rio de Janeiro realiza controle de qualidade do laboratório, portanto os resultados de exames contribuem para este trabalho. Os registros referentes aos procedimentos realizados no Banco de Sêmen do Rio de Janeiro poderão ser utilizados para fins didáticos, conferências, palestras médicas e publicações científicas, assim como para o registro de relatórios governamentais e de sociedades médico-científicas, desde que mantido o anonimato do paciente.
  - O líquido seminal que restar após análise seminal será descartado.
  - Confirmando o tipo de exame a ser realizado.
- Declaro que esta amostra foi por mim coletada.

Assinatura do paciente

#### Informações importantes sobre esta coleta:

Horário do término da coleta: \_\_\_\_ : \_\_\_\_

Houve perda na hora da coleta? ..... ( ) Não ( ) Sim

(Caso o paciente não saiba explicar sobre a perda por escrito, favor tentar explicar pelo telefone)

#### A perda do ejaculado foi:

( ) no início - ( ) residual ( ) pouco ( ) muito

( ) no Final - ( ) residual ( ) pouco ( ) muito